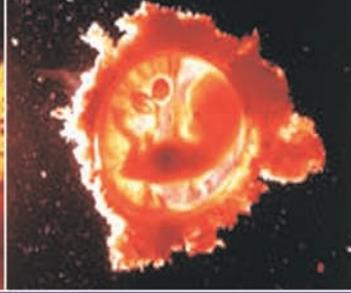
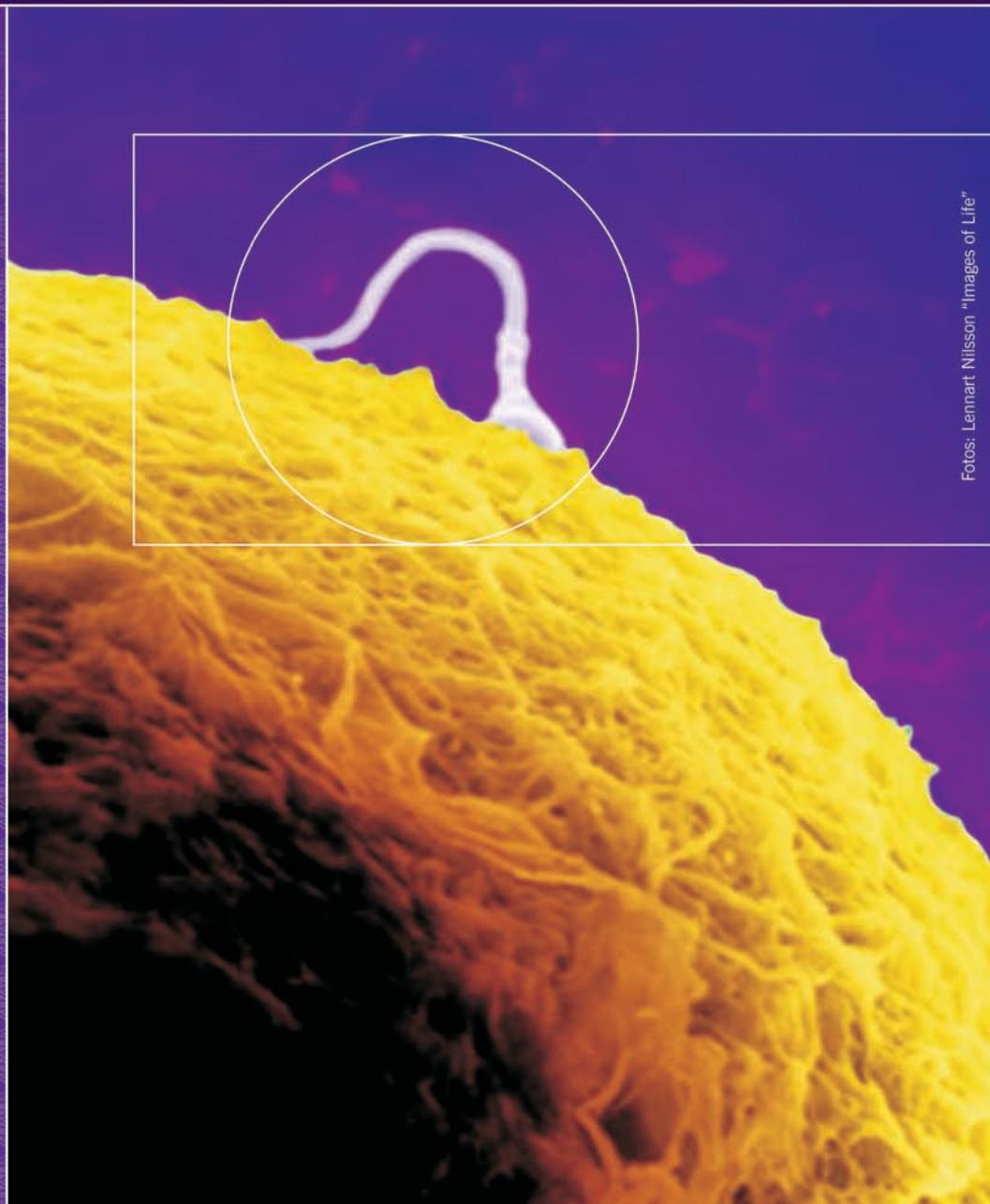


Volume 10
Número 3
Julho / Agosto / Setembro 2006
ISSN 1517-5693



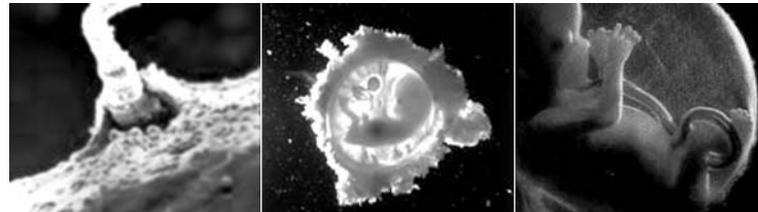
JBRA

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



Fotos: Lennart Nilsson "Images of Life"

ORGÃO DA
SOCIEDADE BRASILEIRA
DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA



JBR JORNAL BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA

CORPO EDITORIAL NACIONAL

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

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

CORPO EDITORIAL INTERNACIONAL

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

I – Informações Gerais

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

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

Os trabalhos devem ser enviados para:

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

II – Apresentação dos Trabalhos

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

Primeira Página

Título do artigo em português e inglês
 Nome do(s) autor(es)
 Afiliação dos autores
 Nome do serviço onde foi executado o trabalho
 Endereço, número do telefone, fax e internet do autor principal
 Indicação de financiamentos relacionados ao trabalho

Segunda Página

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

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

Key words / Palavras-chave: ver <http://decs.bvs.br>

Terceira e demais páginas

Texto

Artigos originais: São trabalhos resultantes de pesquisa científica apresentando dados originais de descobertas com relação a aspectos experimentais ou observacionais de característica médica, bioquímica e social, e inclui análise descritiva e ou inferências de dados próprios. Sua estrutura é a convencional que traz os seguintes itens: Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Resumo com unitermos e Referências. Os artigos originais que envolvem experimentação devem declarar aprovação prévia por Comitê de Ética.

Artigos de revisão: São trabalhos que têm por objetivo resumir, analisar, avaliar ou sintetizar trabalhos de investigação já publicados em revistas científicas. Apresenta síntese e análise crítica da literatura levantada e não deve ser confundido com artigo de atualização.

Artigos de atualização ou divulgação de autores convidados (opiniões) são trabalhos que relatam informações geralmente atuais sobre tema de interesse para determinadas especialidades, uma nova técnica ou método, por exemplo, e que tem características distintas de um artigo de revisão visto que não apresentam análise crítica da literatura.

Relatos de caso: São artigos que representam dados descritivos de um ou mais casos explorando um método ou problema através de exemplo. Apresenta as características do indivíduo estudado, com indicação de sexo, idade e pode ser realizado em humano ou animal. Devem obedecer a seqüência: Introdução, Descrição do caso, Discussão ou Conclusão, Resumo com unitermos e Referências.

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

Leitura recomendada aos autores - * BIREME – www.bireme.br

III – Referências

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

1. Artigos em periódicos

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

2. Capítulos de Livros

Simpson J. L. – Gonadal dysgenesis and sex abnormalities: phenotypic-karyotypic correlations. In: Vallet H. L. and Porter I. H. Genetic Mechanisms of Sexual Development. New York:Academic Press, p.365-377, 1979.

3. Livros

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

OBS: Não fazer citações das referências através de números. Exemplo: Na pesquisa o fator imunológico (1).

IV – Ilustrações

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

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

DIRETORIA DA SBRA - 2005/2006

Presidente: Maria do Carmo Borges de Souza

1º Vice-Presidente: Eduardo P. Passos

2º Vice-Presidente: Ricardo Baruffi

1º Secretário: João Batista Alcantara Oliveira

2º Secretária: Madalena Caldas

1º Tesoureiro: Assumpto Iaconelli Júnior

2º Tesoureiro: Luiz Fernando Dale

Departamento de Publicações

Editora: Maria do Carmo Borges de Souza

1º Secretária: Christina de Albuquerque da Rocha

2º Secretária: Fernanda Freitas de Oliveira Cardoso

Comissão de Atividades Internacionais

Marcos Sampaio

Departamento Científico

Adelino Amaral Silva

Newton Eduardo Busso

Comissão de Ética e Defesa de Prerrogativa

Bella Zaurner

Lídio Jair Ribas Centa

Dirceu Henrique M. Pereira

Comissão de Educação Continuada

Antonio Helio Oliani

Aroldo Camargos

Roberta Wonchocquier

Conselho Fiscal

Joaquim Roberto C. Lopes

Condesmar Marcondes Filho

Fabio Macedo

Luiz Eduardo Viana Diniz

Comissão de Cadastramento e Avaliação

Edson Borges

Jonathas Borges

Conselho Consultivo

Selmo Geber

Alvaro Petracco

Edson Borges

José Gonçalves Franco Júnior

Paulo Serafini

Roger Abdelmassih

Comissão de Comunicação

Lister de Lima Salgueiro

Lia Ferragut

Paulo Taitson

EDITORIAL**Prezados Colegas,**

Adelino Amaral Silva _____ 06

ARTIGO ORIGINAL**Análise Dopplerfluxométrica das Artérias Uterinas para Diagnóstico do Bloqueio da Função Hipofisária Após o Uso de Análogos do GnRH em Ciclos de Fertilização *In Vitro*.**

Selmo Geber, Marco Túlio Vaintraub, Marcos Sampaio ____07

Caracterização dos Sistemas-tampão Bicarbonato e HEPES nos Meios para Cultivo de Gametas e Pré-embriões Comercialmente Disponíveis: Análise do pH sob Diferentes Concentrações de Gás Carbônico (CO₂) e Variação Inter-incubadoras.

Sandro C. Esteves, Danielle T. Schneider, Sidney Verza Jr., Alecsandra P. Gomes _____ 11

“Assisted hatching” com Laser em Embriões CriopreservadosClaudia Guilhermino Petersen^{1,2}, Ana Lucia Mauri¹, Ricardo Luiz Razera Baruffi¹, João Batista Alcântara Oliveira¹, Valeria Felipe¹, Fabiana Cagnoto Massaro¹ and Jose Gonçalves Franco Jr¹. _____ 19**Efeitos da Criopreservação sobre os Componentes do Estroma do Córtex Ovariano: Uma Análise Histológica.**Adriana Bos-Mikich^{1*}, Marcelo O. Ferreira^{2,3}, Gerta N. Frantz², Norma P. Oliveira², Nilo Frantz². _____ 27**ARTIGO DE REVISÃO****Expressão Gênica Durante o Desenvolvimento Embrionário Pré-implantação**

Elielton R. Coelho, Marcello Valle, Marcos Sampaio, Selmo Geber _31

Associação entre Câncer Pediátrico e Técnicas de Reprodução Assistida de Alta Complexidade

Thais Fagnani Machado, Aparecida dos Santos Canha _____37

Morfologia do Espermatozóide Segundo o Critério Estrito

Cláudia C Viero, Luana Venturin Lara, Eleonora Bedin Pasqualotto, Fabio Firmbach Pasqualotto_____41

BREVE COMUNICADO**Nascimento de Bebê Após Congelamento de Óvulos**

Frantz N; Ferreira M; Oliveira N P; Frantz G; Höher M _____ 44

EVENTOS

_____ 45

Prezados Colegas,

Brasília foi escolhida para sediar o XI Congresso Brasileiro de Reprodução Assistida que se realizará no período entre 23 e 25 de agosto de 2007.

O evento deverá acontecer no Centro de Convenções Ulysses Guimarães, totalmente reformado e reinaugurado este ano.

Nossa cidade é destaque não só por ser o centro de decisões políticas do país, muitas vezes turbulentas, mas também por seu povo amável e hospitaleiro. Temos orgulho de Brasília, como Patrimônio Histórico da UNESCO. A arquitetura de Oscar Niemeyer manifesta-se em sua plenitude com belas construções e monumentos. O destaque das atrações turísticas fica por conta do Turismo Cívico com a visita às sedes dos Três Poderes, a passeios ecológicos

de grande beleza, a lugares místicos e históricos, a centros gastronômicos importantes, entre outros.

Recente relatório da Unesco colocou nossa cidade em primeiro lugar no índice de qualidade de vida da Nação.

Nossa malha viária é a melhor do país, com vôos diretos de todas as capitais, facilitando em muito a vida dos congressistas. A rede hoteleira fica muita próxima ao Centro de Convenções e o deslocamento é rápido.

A programação científica será formulada buscando atender às expectativas de todos.

Reserve esta data na sua agenda de 2007!

Adelino Amaral Silva

Presidente da Comissão Executiva

Análise Dopplerfluxométrica das Artérias Uterinas para Diagnóstico do Bloqueio da Função Hipofisária Após o Uso de Análogos do GnRH em Ciclos de Fertilização *In Vitro*.

Dopplerfluxometric Analysis of Uterine Arteries for the Diagnosis of Hypophysarian Blockage, After Using GnRH Analogies in IVF Cycles.

Selmo Geber
Marco Túlio Vaintraub
Marcos Sampaio

ORIGEN - Centro de Medicina Reprodutiva

Endereço para correspondência:
 Av. Contorno 7747 – Lourdes – CEP 30110120
 Belo Horizonte – MG - Tel 31 21026363 – FAX 31 21026334
 email:selmogeber@origen.com.br

RESUMO

Atualmente a maioria dos ciclos de fertilização *in vitro* são realizados utilizando-se análogos do GnRH com o protocolo longo. Esta prática tem como objetivo evitar o pico prematuro de LH e uma ovulação não programada, diminuindo desta forma, o risco de cancelamento dos ciclos. O diagnóstico do bloqueio hipofisário é realizado através da dosagem dos níveis séricos de E_2 e pela medida da espessura endometrial e identificação de cistos ovarianos através da ultrasonografia. Neste estudo, avaliamos a Dopplerfluxometria das artérias uterinas como método diagnóstico do estado hipoestrogênico provocado pelo bloqueio hipofisário após a administração de GnRH α em ciclos de FIV. Setenta pacientes que se submeteram a tratamento de Reprodução Assistida foram selecionadas. Dez dias após a administração de GnRH α foram feitas dosagens séricas de E_2 e ultrasonografia endovaginal para mensuração da espessura endometrial, avaliação da morfologia ovariana e Dopplerfluxometria das artérias uterinas. Considerando valores de E_2 <30 pg/ml como padrão ouro, a medida da espessura endometrial apresentou uma sensibilidade de 77,8 % e uma especificidade de 61,7 % já, com a Dopplerfluxometria, a sensibilidade foi de 72,2 % e a especificidade de 71%. Ao combinarmos os dois métodos, encontramos uma especificidade de 83,15%. Concluímos que o estudo Dopplerfluxométrico das artérias uterinas pode ser um instrumento importante no diagnóstico do estado hipoestrogênico em ciclos de reprodução assistida após o uso de GnRH α .

INTRODUÇÃO

As técnicas de reprodução assistida para o tratamento da infertilidade conjugal vem sendo cada vez mais utilizadas, não somente pelos melhores resultados que vem apresentando, como também pela maior facilidade e menores riscos. Os análogos do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH α) são utilizados com objetivo de impedir o pico endógeno do hormônio Luteinizante (LH) e conseqüentemente a ovulação prematura ou uma luteinização precoce (Geber et al., 2002). A partir da introdução de seu uso, ocorreu uma redução significativa no cancelamento de ciclos, um melhor sincronismo folicular e um aumento nas as taxas de gravidez ^{*1}. O principal efeito dos GnRH α é criar um bloqueio da função hipofisária, levando a um estado de hipopituitarismo e conseqüente hipoestrogenismo temporário, com níveis de estrogênios sérico semelhantes aos encontrados em mulheres na pós-menopausa^{2,3,4}.

Após o uso dos GnRH α , é fundamental que se confirme a sua ação antes do início do estímulo ovariano. A dosagem dos níveis de Estradiol (E_2) sérico é considerado o método padrão ouro, uma vez que determina diretamente a função ovariana. Outro método bastante utilizado é a medida da espessura endometrial através da ultrasonografia endovaginal que, associado com a avaliação da morfologia ovariana, tem sua sensibilidade e especificidade elevadas^{5,7,8,9}, uma vez que mede indiretamente a função ovariana.

A busca de um método seguro e simples para avaliar este estado de hipoestrogenismo é importante não só para as técnicas de reprodução assistida, mas também no seguimento de pacientes amenorréicas com ou sem falência ovariana selecionando aquelas que responderiam positivamente ou não ao teste da progesterona⁶.

Recebido em 09/05/2006
 Avalidado e aceito: 21/08/2006

Com o objetivo de desenvolver um novo método de elevada sensibilidade e especificidade, avaliamos o uso do estudo Dopplerfluxométrico das artérias uterinas como uma nova possibilidade de diagnosticar o bloqueio da função hipofisária, causado pela administração de GnRHa em ciclos de reprodução assistida. Assim poderíamos substituir a dosagem do estradiol sérico, por um método não invasivo e que não dependesse de um outro serviço especializado (laboratório de análises clínicas).

Esta proposição é proveniente da conhecida relação que existe entre níveis séricos de E_2 e a resistência vascular arterial, confirmada por diversos estudos, que avaliam o comportamento vascular através de exames Dopplerfluxométricos com determinação do índice de pulsatilidade (IP). O mecanismo desta relação se deve provavelmente à ação direta do estrogênio sobre os vasos arteriais ou indiretamente através da modulação da produção e liberação de substâncias vasoativas^{10,11,12}.

Desta forma o objetivo deste estudo é avaliar o uso da Dopplerfluxometria das artérias uterinas como método de diagnóstico da dessensibilização hipofisária e comparar tais achados com a dosagem dos níveis de E_2 e com a medida da espessura endometrial pela ultrasonografia endovaginal.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes e protocolo

Um total de 70 pacientes com idade entre 19 e 48 anos, com ciclos menstruais regulares e candidatas a tratamento por técnicas de Reprodução Assistida, foram selecionadas para este estudo prospectivo. Foram analisadas as seguintes variáveis: Dopplerfluxometria das artérias uterinas, medida da espessura endometrial, morfologia ovariana e níveis de estradiol sérico. Todas as avaliações foram feitas na mesma fase do ciclo, isto é, 10 dias após a administração do análogo do GnRH. Com objetivo de evitar variações intra observador, todos os exames de Dopplerfluxometria e ultrasonografia foram realizados pelo mesmo examinador¹⁴. No caso da dosagem do estradiol, para se evitar variações entre os Kits, todos os exames foram realizados pelo mesmo laboratório e na mesma série. Todas as pacientes foram submetidas à Fertilização *in vitro* (FIV) seja pela técnica clássica ou pela injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), utilizando seus próprios oócitos ou por doação de óvulos. Em todos os casos, as pacientes iniciaram o tratamento com a dessensibilização hipofisária, utilizando-se para isto a administração subcutânea de 3,6 mg de Acetato de Goserelina (Zoladex – Zeneca - Brasil), no segundo dia do ciclo menstrual.

Dosagem de Estradiol

Para a dosagem do estradiol sérico foram colhidas amostras de sangue na manhã do dia em que se realizava a avaliação Dopplerfluxométrica e ultrasonográfica (10 dias após a administração do GnRHa). Todas as amostras foram processadas pelo mesmo laboratório e na mesma série, utilizando-se a técnica de Radioimunoensaio. Esta medida foi considerada como padrão ouro para confirmação da dessensibilização hipofisária, quando os níveis estavam inferiores ou iguais a 30 pg/ml.

Avaliação ultrasonográfica

A avaliação da cavidade endometrial e da morfologia ovariana foi realizada através da ultrasonografia endovaginal utilizando-se um transdutor vaginal de 6,5 MHz (Toshiba SSA-340A – Japão). Todos os exames foram feitos pelo mesmo examinador de forma a evitar alterações de avaliação intra-observador, 10 dias após a administração do GnRHa. A medida da espessura

endometrial foi obtida através da mensuração da distância entre a lâmina endometrial anterior e a posterior, realizada num corte longitudinal perpendicular a linha endometrial no fundo uterino. Valores inferiores ou iguais a 5 mm foram considerados como indicativo de supressão estrogênica, secundária à hipofisectomia clínica causada pelo GnRHa. Os ovários foram avaliados com o objetivo de afastar a presença de cistos, que podem ser produtores de estrogênios e assim mascarar a função dos GnRHa.

Estudo Dopplerfluxométrico

Todos os exames de Dopplerfluxometria foram realizados no mesmo aparelho descrito acima, porém utilizando o efeito Doppler pulsátil colorido (Toshiba SSA-340A - Japão). Todos os exames foram realizados 10 dias após a administração do GnRHa, pelo mesmo examinador de forma a evitar alterações de avaliação intra-observador. A análise Dopplerfluxométrica era realizada rotineiramente antes da avaliação ovariana e da medida da espessura endometrial, de forma a evitar qualquer influência na avaliação. Foram avaliadas as artérias uterinas direita e esquerda, sendo a artéria uterina identificada através de um corte transversal ao nível do orifício interno do colo. A este nível, a artéria uterina aparece lateralmente na parede uterina onde se encontra numa posição ligeiramente anterior em comparação a uma linha imaginária que corta o útero em duas metades, anterior e posterior. A adição do modo Doppler colorido à sonda vaginal permite obter uma imagem do fluxo sanguíneo colorido arbitrariamente em azul ou vermelho em função da aproximação ou distanciamento deste fluxo em relação à sonda. O Doppler colorido nos permite um posicionamento mais preciso e judicioso da amostra sanguínea onde serão realizadas as medidas do sinal Doppler.

Utilizamos o índice de Pulsatilidade (IP) como índice Dopplerfluxométrico, uma vez que este se presta bem à avaliação da impedância vascular em vasos de alta resistência como é o caso das artérias uterinas. Foram avaliadas as artérias uterinas direita e esquerda com determinação do IP definido pela fórmula $S - D / \text{média}$ (sendo $S =$ pico sistólico e $D =$ pico diastólico), calculado eletronicamente pela máquina. O IP tem sido utilizado para refletir a impedância do fluxo arterial e pode ser usado quando o final da diástole é ausente ou reverso. Em todos os casos a avaliação foi realizada após repouso da paciente e esvaziamento vesical completo a fim de se evitar a influência de fatores externos. Para cada exame foram realizadas três medidas e então calculado uma média¹³. Não houve diferença estatística entre a avaliação Dopplerfluxométrica das artérias direita e esquerda, mesmo assim, a interpretação de cada artéria foi realizada separadamente.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando-se o teste t de Student não emparelhado. Para o cálculo utilizando as medianas foi utilizado o teste não paramétrico de Wald-Wolfowitz (Run test). Para o cálculo da Sensibilidade (S), Especificidade (E), Valor Preditivo Positivo (VPP) e Negativo (VPN) destes diversos métodos utilizamos tabelas 2x2. A diferença era considerada significativa quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

As 70 pacientes analisadas no estudo foram comparadas com relação aos níveis séricos de E_2 e espessura endometrial. Para o estudo Dopplerfluxométrico, 3 pacientes que apresentaram $IP > 4,50$ não foram consideradas, porque apesar de terem ocorrido em pequena proporção, mostraram índices muito distantes da média geral, que poderia prejudicar a confiabilidade da análise. A tabela 1 apresenta as pacientes agrupadas de acordo com os níveis de E_2 e espessura endometrial.

Das 36 pacientes com níveis de $E_2 \leq 30$ pg/ml, 28 apresentaram espessura endometrial ≤ 5 mm. Entre as 34 pacientes com $E_2 > 30$ pg/ml, 21 apresentaram uma espessura endometrial > 5 mm. Essa correlação demonstra uma sensibilidade de 77,8 % e uma especificidade de 61,7% com valor preditivo positivo de 68,2% e valor preditivo negativo de 72,5 % para a medida da espessura de endométrio.

As tabelas 2 e 3 mostram os valores médios, mínimo e máximos, mediana e média aparada do IP das artérias uterinas, classificados de acordo com os níveis de E_2 e medida da espessura endometrial.

Utilizando níveis de estradiol como padrão ouro e níveis de 30 pg/ml como ponto de corte, podemos observar um aumento dos índices de pulsatilidade associados com a queda do E_2 . Da mesma forma, observamos também um aumento no IP quanto menor for a espessura endometrial.

Quando comparamos as médias do IP entre as pacientes com $E_2 \leq 30$ pg/ml e as pacientes com $E_2 > 30$ pg/ml encontramos uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,005$). O mesmo ocorreu quando comparamos as medianas dos IP entre os estes dois grupos de pacientes ($p=0,014$).

Com relação à espessura endometrial, quando comparamos as médias do IP entre as pacientes com espessura endometrial ≤ 5 mm e as pacientes com espessura endometrial > 5 mm encontramos uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,004$). O mesmo ocorreu quando comparamos as medianas dos IP entre os estes dois grupos de pacientes ($p=0,003$).

Definindo um ponto de corte da medida do IP em 2,51, isto é, valores de IP $> 2,51$ como positivo e valores de IP $< 2,51$ como negativo, encontramos uma sensibilidade de 72,2% e uma especificidade de 71,0% para este método, utilizando-se como padrão os níveis séricos de E_2 .

Ao combinarmos os dois métodos, Dopplerfluxometria das artérias uterinas e espessura endometrial, em série encontramos uma sensibilidade de 58,8% e uma especificidade de 83,15%. Quando realizamos os mesmos cálculos, contudo, combinando estes dois testes em paralelo, a sensibilidade encontrada é de 94,11% e a especificidade de 41,9 %.

O presente estudo apresenta uma nova proposta para avaliação do estado estrogênico em ciclos de reprodução assistida com uso de GnRHa para bloqueio da função hipofisária, que seria evidenciado pelo aumento da resistência ao fluxo sanguíneo, avaliado pela Dopplerfluxometria das artérias uterinas, utilizando-se o índice de pulsatilidade.

Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar este aumento da resistência vascular arterial em estados hipoestrogênicos. O primeiro vem do achado de receptores para estrogênio nos vasos arteriais sugerindo uma ação direta deste hormônio sobre o tônus vascular^{10,15,16,17}. Além disso o estradiol teria uma ação moduladora sobre a produção de substâncias vasoativas como prostaglandinas e fatores endoteliais e atuaria em receptores muscarínicos e adrenérgicos^{18,19}.

Alguns estudos sugerem que o tromboxano pode estar envolvido na variação do tônus arterial e que o GnRHa induziria a uma modificação no balanço entre prostaciclina/tromboxane semelhante ao encontrado em estados pós menopáusicos^{18,19,20}.

Nossos resultados sugerem que um aumento dos valores do IP das artérias uterinas acompanham a diminuição dos níveis de estradiol e da espessura endometrial após o uso de GnRHa. Este método talvez possa também ser utilizado para avaliar pacientes amenorréicas ou na pós menopausa a fim de se avaliar níveis de estrogênio ou resposta ao teste de progesterona⁶.

No presente estudo, a sensibilidade, especificidade, VPP e VPN da medida da espessura endometrial como preditor do estado estrogênico se mostraram abaixo do relatado em publicações anteriores, talvez devido ao pequeno tamanho de nossa amostra. De fato, em um estudo realizado em nosso serviço em que foram avaliadas retrospectivamente 268 ciclos de FIV que fizeram uso de GnRHa a sensibilidade da medida da espessura endometrial em relação aos níveis de estradiol foi de 93%.

Nosso estudo demonstra pela primeira vez que a associação entre os dois métodos – medida da espessura endometrial e Dopplerfluxometria das artérias uterinas - pode ser utilizada com vantagens no diagnóstico do bloqueio hipofisário após o uso do GnRHa em ciclos de reprodução assistida. A utilização de um método de elevada sensibilidade como é a ultrasonografia para medida da espessura endometrial (93%) seguido do estudo Dopplerfluxométrico das artérias uterinas, demonstrou uma elevação significativa na especificidade (61,7% e 83,15%, respectivamente). Mais ainda, por ser um exame que pode ser realizado no mesmo tempo da ultrasonografia, e sem caráter invasivo, facilitando ainda mais a monitorização da supressão da função hipofisária, podendo assim substituir a dosagem rotineira do estradiol sérico.

Em resumo, podemos concluir que o estudo Dopplerfluxométrico das artérias uterinas pode ser um instrumento importante no diagnóstico do estado hipoestrogênico em ciclos de reprodução assistida após o uso de GnRHa.

TABELA 1. Distribuição das pacientes de acordo com os níveis séricos de estradiol e espessura endometrial.

Estradiol	Endométrio		Total
	≤ 5 mm	> 5 mm	
≤ 30 pg/ml	28	8	36
> 30 pg/ml	13	21	34
Total	41	29	70

TABELA 2. Correlação entre o índice de pulsatilidade das artérias uterinas e os níveis de Estradiol sérico.

IP	$E^2 \leq 30$ pg/ml	$E^2 > 30$ pg/ml	p
Média±DP	2,81±0,87	2,22±0,80	0,005 §
Mediana	3,10	2,10	0,014 *
Mínimo	1,00	1,31	
Máximo	3,14	4,05	
Média aparada	2,84	2,16	

§ teste t de student

* teste Wald-Wolfowitz

TABELA 3. Correlação entre o índice de pulsatilidade das artérias uterinas e a espessura endometrial.

IP	Endo ≤ 5 mm	Endo > 5 mm	P
Média±DP	2,79±0,86	2,17±0,79	0,004 §
Mediana	3,08	2,10	0,003 *
Mínimo	1,30	1,00	
Máximo	4,14	3,59	
Média aparada	2,79	2,15	

§ teste t de student

* teste Wald-Wolfowitz

REFERÊNCIAS

1. Hughes EG, Fedorkow DM, Daya S, Sagle MA, Van de Coppel P, Collins JA. The routine use of gonadotropin-releasing hormone agonists prior to *in vitro* fertilization and gamete intrafallopian transfer: a meta analysis of randomized controlled trials. *Fertil. Steril.*, 58:888,1992.
2. Tan SL, Balen A, Hussein E, Mills C, Campbell S, Yovich J, et al. A prospective randomized study of optimum timing of human gonadotropin administration after pituitary desensitization in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 57:1259-64,1992.
3. Tan SL. Simplifying in vitro fertilization therapy. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 6:111-4,1994.
4. Wikland M, Borg J, Hamberger L, Svalander P. Simplification of IVF: minimal monitoring and the use of subcutaneous highly purified FSH administration for ovulation induction. *Hum. Reprod.*, 9:1994.
5. Calhaz-Jorge C, Leal F, Cordiero I, Proença H, Barata M, Pereira-Coelho AM. Pituitary down-regulation in IVF cycles: is it necessary to use strict criteria? *J. Assist. Reprod. Genet.*, 12:615-9,1995.
6. Nakamura S, Douchi T, Oki T, Ijuin H, Yamamoto S, Nagata Y. Relationship between sonographic endometrial thickness and progesterin induced withdrawal bleeding. *Obstet. Gynecol.*, 87:722-5,1996.
7. Barash A, Weissman A, Manor M, Milman D, Bem Arie A, Shoram Z. Prospective evaluation of endometrial thickness as a predictor of pituitary down regulation after gonadotropin-releasing hormone analogue administration in an *in vitro* fertilization program. *Hum. Reprod.*, 69:496-9,1998.
8. Sampaio M, Serra V, Miro F, Calatayud C, Castellvi RM, Pellicer A. Development of ovarian cysts during gonadotropin-releasing hormone agonists (GnRHa) administration. *Hum. Reprod.*, 6: 194-7,1991.
9. Shulman A, Shulman N, Weissenglass L, Bahary C. Ultrasonic assement of the endometrium as a predictor of oestrogen status in amenorrhoeic patients. *Hum. Reprod.*, 4:616-9,1889.
10. de Ziegler D, Bessis R, Frydman R. Vascular resistance of uterine arteries: physiological effects of estradiol and progesterone. *Fertil. Steril.*, 55:775-9,1991.
11. Favre R, Bettahar K, Grange G, et al. Predictive value of transvaginal uterine Doppler assessment in an *in vitro* fertilization program. *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, 3:350-3,1993.
12. Tinkanen H, Kujansuu E, Laipalla P. The association between hormone levels and vascular resistance in uterine and ovarian arteries in spontaneous menstrual cycles: Doppler ultrasound study. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 74:297-1,1995.
13. Battaglia C, Artini PG, D`Ambrogio G, et al. Uterine and ovarin blood flow measurement. Does the full bladder modify the flow resistance? *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*,73:716-8,1994.
14. Steer CV, Wiliams J, et al. Intra-observer, interobserver, interultrasound transducer and intercycle variation in colour Doppler assessment of uterine artery impedence. *Hum. Reprod.*, 10:479-81,1995.
15. Battaglia C, Artini PG, Bencini S, et al.. Doppler analysis of uterine blood flow changes is spontaneous and medically induced menopause. *Gynecol. Endocrinol.*,9:,143-8,1995.
16. Bourne TH, Hillard TC, Whitehead MI,et al. Oestrogens, arterial status and postmenopausal women. *Lancet*, 335:1470-1,1990.
17. Gangar KF, Vyas S, Whitehead MI, et al. Pulsatility index in the internal carotid artery is influenced by transdermal oestradiol and time since menopause. *Lancet*, 338,839-42,1991.
18. Levin JH, Stanczyk FZ, Lobo RA. Estradiol stimulates the secretion of prostacyclin and tromboxane from endometrial stromal cells in culture. *Fertil. Steril.*, 58:530-6,1992.
19. Stjernquist M, Bodelsson G, Poulsen H. Vasoactive peptides and uterine vessels. *Gynecol. Endocrinol.*, 9:165-76,1995.
20. Harper MJK. Platelet activating factor: a paracrine factor in preimplantation stages of reproduction? *Biol. Reprod.*, 40:907-13,1989.

“Não recebo a revista.”

**Você é sócio?
Seu pagamento está em dia?
Seu endereço mudou?**

**Se há dúvidas, consulte o seu
cadastro e fale conosco**

www.sbra.com.br

Caracterização dos Sistemas-tampão Bicarbonato e HEPES nos meios para Cultivo de Gametas e Pré-embriões Comercialmente Disponíveis: Análise do pH sob Diferentes Concentrações de Gás Carbônico (CO₂) e Variação Inter-incubadoras.

Characterization of Bicarbonate and HEPES Buffer Systems in Commercially Available Culture Media for Gametes and Pre-embryos: pH Analysis under Varying Carbon Dioxide (CO₂) Concentrations and Inter-incubator Variation.

Sandro C. Esteves; Danielle T. Schneider; Sidney Verza Jr.; Alecsandra P. Gomes

Endereço para correspondência:
Prof. Dr. Sandro C. Esteves
ANDROFERT – Centro de Referência em Reprodução Masculina
Av. Dr. Heitor Penteado, 1464 – Taquaral
Campinas, São Paulo, Brasil
Cep 13075-460. Fone: (19) 3295-8877
s.esteves@androfert.com.br

RESUMO

Objetivo: Caracterizar os sistemas-tampão bicarbonato e HEPES de diversos meios comerciais para cultivo de gametas e pré-embriões, quando expostos a diferentes concentrações de gás carbônico (CO₂) e em incubadoras distintas.

Material e Método: Três experimentos foram realizados para simular as fases da cultura *in vitro* de gametas e pré-embriões. Para cada experimento, utilizaram-se concentrações de CO₂ de 5,0%, 5,5% e 6,0%, e duas incubadoras distintas. Os meios estudados foram Asp[®], Gamete[®], IVF[®] (Vitrolife, Suécia), Sperm buffer[®], Follicle flushing[®], Oocyte wash[®], Fertilization[®], Cleavage[®] (Cook, EUA) e modified HTF[®] (Irvine Scientific, EUA). As determinações do pH foram realizadas com pHmetro calibrado e aferido. No experimento 1, avaliou-se o pH dos meios após incubação por 12 horas num sistema aberto de cultivo. No experimento 2, mensurou-se o intervalo de tempo pelo qual o pH dos meios mantinha-se dentro dos níveis fisiológicos após exposição ao ar ambiente. No experimento 3, avaliou-se o tempo necessário de exposição à atmosfera de CO₂ para que o pH dos meios CO₂-dependentes retornasse para valores fisiológicos, uma vez expostos ao ar ambiente por um período de 5 minutos.

Resultados: No experimento 1, verificou-se relação inversa entre o aumento dos níveis de CO₂ da incubadora e o pH dos meios com tampão bicarbonato. Os meios com tampão HEPES, com exceção do Sperm buffer[®], Gamete[®] e Asp[®], não devem ser expostos à atmosfera de CO₂, pois acidificam

para níveis não-fisiológicos. No experimento 2, observou-se elevação do pH tempo-dependente para todos os meios com tampão bicarbonato, não-atenuada pela exposição prévia a concentrações de CO₂ mais elevadas, que atingiram níveis não-fisiológicos após 2,5 minutos de exposição ao ar ambiente. Os meios com HEPES, com exceção do Gamete[®] e Asp[®], podem ser expostos ao ar ambiente por tempo prolongado, sem que haja alteração significativa do pH. No experimento 3, verificou-se que o tempo para re-estabilização do pH em níveis fisiológicos, nos meios com tampão bicarbonato e HEPES CO₂-dependentes, variou entre 45-90 e 5-15 minutos, respectivamente. Não se observou diferença inter-incubadoras nos valores do pH dos meios estudados, nas três condições experimentais.

Conclusão: A caracterização dos meios de cultivo deve fazer parte do controle de qualidade do laboratório de fertilização *in vitro*. Tal sistemática facilita o entendimento do comportamento destes sistemas quando expostos às condições individuais de trabalho de cada serviço, e permite ajustes que irão otimizar as condições de cultivo dos gametas e pré-embriões.

Palavras-chaves: meios de cultivo, sistemas tampão, pH, incubadora de CO₂, controle de qualidade

ABSTRACT

Objective: To characterize the bicarbonate and HEPES buffer systems of commercially available culture media when exposed to different carbon dioxide (CO₂) concentrations and incubators.

Material and method: Three experiments have been performed

Recebido em 12/05/2006
Avaliado e aceito em 22/09/2006

to simulate *in vitro* culture of gametes and pre-embryos. For each experiment, CO₂ concentrations of 5.0%, 5.5%, and 6.0% have been tested using two different incubators. The following media were analyzed: 1) Asp[®], Gamete[®], IVF[®]: Vitrolife, Sweden; 2) Sperm buffer[®], Follicle flushing[®], Oocyte wash[®], Fertilization[®] and Cleavage[®]: Cook, USA; 3) modified HTF[®]: Irvine Scientific, USA. Measurements of pH were performed using a calibrated and certified pHmeter. Experiment 1 analyzed pH values after overnight CO₂ incubation in an open culture system model. Experiment 2 assessed the time interval in which CO₂-dependent media maintained pH within physiological range after ambient air exposure. Experiment 3 studied the CO₂ incubation period required for CO₂-dependent media to stabilize at physiological pH levels after 5-minute ambient air exposure.

Results: Experiment 1 demonstrated an inverse relationship between increased incubator CO₂ concentrations and pH levels. Exposure to CO₂ must be avoided to prevent acidification in HEPES-buffered media, with exception of Sperm buffer[®], Gamete[®] and Asp[®]. Experiment 2 showed a time-dependent increase in the pH levels of all CO₂-dependent media after ambient air exposure, which was not attenuated by incubation at increased CO₂ levels. All but Gamete[®] and Asp[®] HEPES-buffered media can be air exposed for long time periods without pH destabilization. Experiment 3 showed that bicarbonate and CO₂-dependent HEPES-buffered media required a 45-90 and 5-15-minute CO₂ incubation period for pH re-equilibration after ambient air exposure. Inter-incubator variation for pH was not observed for all tested media.

Conclusion: Characterization of commercially available culture media should be included in the *in vitro* fertilization laboratory quality control program. These procedures may help the embryologist to understand media behavior from distinct manufacturers at a work condition of a particular laboratory. Therefore, fine adjustments and/or protocol modifications can be made to optimize gamete and pre-embryos culture conditions.

Key-words: culture media, buffer systems, pH, CO₂ incubator, quality control

INTRODUÇÃO

O principal sistema tampão nos seres humanos é o bicarbonato/ácido carbônico (HCO₃⁻/ H₂CO₃), que é utilizado para manter o pH fisiológico entre 7,3 e 7,4, evitando assim variações do pH que podem levar à morte celular ou danos subletais irreversíveis. Por sua semelhança com o sistema tampão fisiológico no sangue, o tampão bicarbonato é o escolhido para compor os meios de cultivo de gametas e pré-embriões *in vitro*. Sob condições laboratoriais, é a concentração de gás carbônico (CO₂) da incubadora que irá determinar o pH dos meios de cultivo, conforme a equação de Henderson-Hasselbach (Figura I). No sangue, este sistema tampão consiste de 24mM de bicarbonato que está em equilíbrio com o gás carbônico, este encontrado nos pulmões sob pressão parcial de cerca de 40mmHg. Esta pressão parcial corresponde a 5%. O CO₂ nas fases líquida e gasosa está em equilíbrio (Figura I). Este equilíbrio é atingido gradualmente e, por este motivo, é necessário que os meios de cultivo permaneçam incubados sob atmosfera de CO₂ por tempos prolongados antes do uso. Quanto mais CO₂ for fornecido à atmosfera na qual está o meio de cultivo, mais ácido carbônico será produzido, aumentando desta forma a acidez. O inverso ocorre quando a concentração do CO₂ diminui ou chega próximo ao zero, como no ar ambiente (0,03% de CO₂), pois diminuindo a concentração do ácido carbônico no meio de cultivo, ocorre elevação do pH.

Além do tampão bicarbonato, outros tampões não-fisiológicos podem ser encontrados em alguns meios de cultivo, como o tampão HEPES (N-hydroxyethylpiperazine-N-ethanesulfonate), que não depende do CO₂, e mantém o pH constante quando um meio com tampão bicarbonato é exposto ao ar ambiente. No entanto, a concentração de HEPES e de bicarbonato não é a mesma em todos os meios prontos para uso disponíveis no mercado (Quadro I). Sendo assim, a força do sistema tampão pode variar entre meios de diferentes fabricantes, os quais podem apresentar características distintas quando expostos à atmosfera de CO₂ e ao ar ambiente.

Embora a maioria dos laboratórios utilize como rotina concentrações de CO₂ entre 5,0% e 6,0%, é importante determinar, nas condições de trabalho de cada laboratório, qual o pH dos meios de cultivo utilizados frente à concentração de CO₂ escolhida. Isto se deve ao fato de que diversas variáveis, como a altitude onde o laboratório está instalado em relação ao nível do mar, diferenças entre os diversos meios de cultivo disponíveis comercialmente, além de diferenças entre os equipamentos (incubadoras) onde as culturas são realizadas, podem interferir no pH final.

OBJETIVO

Caracterizar os sistemas tampão bicarbonato e HEPES de diversos meios de cultivo prontos para uso, existentes no mercado brasileiro, quando expostos a diferentes concentrações de CO₂ e em incubadoras distintas.

MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se um estudo experimental simulando as fases da cultivo *in vitro* de gametas e pré-embriões, utilizando meios de cultivo comerciais, expostos a diferentes concentrações de CO₂. Três experimentos foram realizados em duplicata utilizando incubadoras distintas equipadas com jaqueta de água, sendo uma delas equipada com sensor de umidade, oito portas internas e dispositivo para recuperação rápida dos níveis de CO₂ após abertura e fechamento das portas (ThermoForma modelo 3110 série II), e outra sem sensor de umidade, com 3 portas internas e sem dispositivo de recuperação rápida dos níveis de CO₂ (Forma Scientific modelo 3546). Para cada experimento, utilizou-se 3 diferentes concentrações de CO₂: 5,0%, 5,5% e 6,0%. Os experimentos foram realizados num laboratório situado a 854 metros acima do nível do mar.

Meios de cultivo avaliados

Os seguintes meios de cultivo, adquiridos de diferentes fornecedores, foram estudados: 1) Asp[®], Gamete[®], IVF[®]: Vitrolife, Suécia; 2) Sperm buffer[®], Follicle flushing[®], Oocyte wash[®], Fertilization[®] e Cleavage[®]: Cook, Australia; 3), modified HTF[®]: Irvine Scientific, EUA (Quadro I). Os meios de cultivo foram alíquotados em tubos de 14mL (Falcon 352001) e tampados frouxamente, seguindo o modelo de cultivo no sistema aberto.

Leitura do pH

As aferições do pH foram realizadas utilizando pHmetro calibrado e aferido (Digimed, Brasil). A calibração do pHmetro era realizada antes de cada dia de trabalho com tampões de pH conhecidos, 7,00 e 10,01. Cada leitura era realizada imediatamente após a imersão da membrana do

Figura I. Equação de Henderson-Hasselbach. Sistema tampão bicarbonato-ácido carbônico.



eletrodo no tubo contendo o meio a ser estudado, juntamente com o termocompensador, seguindo as orientações técnicas do fabricante.

Experimento 1

Neste experimento, avaliou-se o pH dos diversos meios de cultivo após incubação por 12 horas num sistema aberto, sob concentrações de CO₂ de 5,0%, 5,5% e 6,0%. Para tanto, 2mL de cada meio de cultivo a ser estudado foram acondicionados em 2 tubos de 14 mL, sendo cada tubo colocado numa das duas incubadoras utilizadas, mantidas sob concentração fixa de CO₂ por um período de 12 horas. As leituras do pH foram realizadas imediatamente após a remoção de cada tubo da incubadora, e repetidas seguindo-se a mesma sistemática até que as três concentrações de CO₂ fossem testadas. O objetivo deste experimento foi simular o preparo dos meios de cultivo, que geralmente é realizado no dia anterior a sua utilização, e determinar o valor do pH destes no dia do uso, quando expostos a diferentes concentrações de CO₂. Além disto, objetivou-se verificar se existe variação de pH entre incubadoras distintas.

Experimento 2

Neste experimento, mensurou-se o intervalo de tempo pelo qual o pH dos meios com tampão bicarbonato ou bicarbonato/HEPES, após 12 horas de incubação sob atmosfera de CO₂, mantinha-se dentro dos níveis fisiológicos (~7,45), uma vez expostos ao ar ambiente. Para tanto, os tubos contendo os meios de cultivo a serem avaliados foram inicialmente incubados por 12 horas sob concentração fixa de CO₂, nas duas incubadoras testadas. A seguir, cada tubo com o meio a ser avaliado foi removido da incubadora, e procederam-se

leituras consecutivas do pH em intervalos de 2,5 minutos, até o tempo máximo de 15 minutos. As avaliações foram repetidas até que as três concentrações de CO₂ fossem testadas. O objetivo deste experimento foi avaliar o tempo máximo que os meios com tampão bicarbonato podem ser mantidos fora da incubadora, sem prejuízo para o sistema de cultivo de gametas e pré-embriões.

Experimento 3

Neste experimento, avaliou-se o tempo de recuperação, ou seja, o intervalo de tempo de exposição à atmosfera de CO₂ necessário para que o pH dos meios com tampão bicarbonato ou bicarbonato/HEPES CO₂-dependentes retornasse para valores fisiológicos, uma vez expostos ao ar ambiente por um período de 5 minutos (Figura II). Para tanto, após incubação nas diferentes concentrações de CO₂ por um período de 12 horas, os meios estudados foram expostos ao ar ambiente por 5 minutos, sendo realizada a mensuração do pH e a divisão do meio em alíquotas. Os tubos contendo as alíquotas eram recolocados nas incubadoras, mantidos sob condições ideais de cultivo, sendo então novamente retirados após 2,5, 5,0, 15, 30, 45 e 90 minutos de incubação, para nova leitura do pH. O objetivo deste experimento foi simular uma rotina de trabalho laboratorial com gametas ou pré-embriões fora da incubadora (estabelecendo-se o tempo médio de 5 minutos, suficientes para a realização da maioria das etapas do processo laboratorial da fertilização *in vitro*), ou seja, mantendo-se o tubo/placa com meio de cultivo exposto ao ar ambiente e, em seguida, retornando-o para a incubadora. Verificou-se o tempo que seria necessário para o pH estabilizar em níveis fisiológicos, permitindo que o tubo/placa com o meio de cultivo pudesse ser novamente retirado da incubadora.

QUADRO I. Características e indicações de uso dos meios de cultivo de gametas e pré-embriões analisados no presente estudo.

Meios	Fabricante	Tampão bicarbonato de sódio	Tampão HEPES	Indicação
Asp®	Vitrolife, Suécia	sim*	sim*	Lavagem dos folículos na aspiração oocitária
Gamete®	Vitrolife, Suécia	sim*	sim*	Manipulação dos gametas sob ar ambiente
IVF®	Vitrolife, Suécia	sim*	não	Fertilização, cultura embrionária e transferência embrionária
Sperm buffer®	Cook, EUA	sim*	sim*	Lavagem seminal
Follicle flushing®	Cook, EUA	sim*	sim*	Lavagem dos folículos na aspiração oocitária
Oocyte wash®	Cook, EUA	sim*	sim*	Lavagem do complexo cumulus oocitário. Pode ser utilizado durante a ICSI e para lavagem seminal
Fertilization®	Cook, EUA	sim*	não	Após o complexo cumulus-oocitário ter sido lavado ou eliminado enzimaticamente, o oócito é colocado neste meio, onde a inseminação vai ocorrer. Também utilizado após a ICSI até a verificação da fertilização no dia seguinte. É designado para promover um ambiente apropriado para espermatozóides e óvulos durante o processo de fertilização
Cleavage®	Cook, EUA	sim*	não	Cultura do dia 1 ao dia 3 (estágio de até 8 células). Meio formulado para proporcionar aos pré-embriões os substratos metabólicos necessários para o desenvolvimento.
Modified HTF®	Irvine Scientific, EUA	sim (4 mM)	sim (21 mM)	Lavagem folicular, lavagem do complexo cumulus-oocitário, lavagem sêmen

* Concentração não-fornecida pelo fabricante; HEPES: N-hydroxyethylpiperazine-N-ethanesulfonate

Análise estatística

Os dados apresentados referem-se ao registro de pH de uma unidade amostral avaliada ao longo do tempo. Cada condição experimental, dada pela combinação de um meio de cultivo e de uma concentração de CO₂, foi aplicada a uma única unidade experimental que foi avaliada ao longo do período de estudo. Os dados foram apresentados apenas descritivamente, pois a aplicação de testes estatísticos requer um conjunto de medidas para que haja variabilidade.

RESULTADOS

Experimento I

Os valores do pH dos meios de cultivo incubados por 12 horas, sob diferentes concentrações de CO₂, e nas duas incubadoras utilizadas, estão descritos na Tabela I. A diferença nos valores do pH dos meios com tampão bicarbonato e com tampão HEPES entre as duas incubadoras, quando expostos às mesmas concentrações de CO₂, variou de 0,0-0,13. Houve ligeiro decréscimo do pH dos meios de cultivo estudados em resposta ao aumento das concentrações de CO₂ em ambas as incubadoras (Tabela I). Observou-se que os meios de cultivo HTF modificado®, Follicle flushing® e Oocyte wash®, ambos contendo HEPES, não devem ser expostos à atmosfera com CO₂ entre 5% e 6%, pois acidificam para níveis não-fisiológicos (Tabela I). Em contrapartida, os meios Sperm buffer®, Gamete® e Asp®, que também contêm HEPES, mantêm-se sob níveis fisiológicos de pH quando expostos à atmosfera com CO₂ entre 5% e 6% (Tabela I).

Experimento II

Após remoção da incubadora, observou-se elevação tempo-dependente do pH dos meios com tampão bicarbonato, não-atenuada pela exposição prévia a concentrações de CO₂ mais elevadas (gráficos I a III). Para todos os meios com tampão bicarbonato estudados, observou-se que o pH atingiu níveis ao redor de 7,5 após exposição ao ar ambiente por apenas 2,5 minutos, havendo elevação subsequente (gráficos I a III). Os meios de cultivo com tampão bicarbonato/HEPES

apresentaram resultados variáveis em relação à força do sistema-tampão: (a) o meio Sperm buffer® apresentou excelente capacidade tampão, mantendo-se com pH em níveis fisiológicos tanto sob atmosfera de CO₂ entre 5,0-6,0%, quanto sob ar ambiente, não se observando variação inter-incubadoras (gráfico IV); (b) embora os meios Follicle flushing®, Oocyte wash® e HTF modificado® não devam ser expostos à atmosfera de CO₂, pois acidificam (experimento 1, Tabela I), estes podem ser expostos ao ar ambiente por tempo prolongado, sem que haja alteração significativa do pH (gráfico 5); (c) os meios Asp® e Gamete®, apesar de possuírem tampão HEPES, mostraram-se CO₂-dependentes, sofrendo um aumento nos valores de leitura do pH em relação ao tempo de exposição ao ar ambiente. Observou-se que após cerca de 5 minutos de exposição ao ar ambiente, o pH destes meios atingiu níveis ao redor de 7,5, elevando-se subsequentemente (Gráfico VI). Estes resultados foram observados nas 3 concentrações de CO₂ estudadas e não se observou diferença considerável inter-incubadoras.

Experimento III

O tempo mínimo para a re-estabilização do pH dos meios de cultivo com tampão bicarbonato ou com tampão HEPES/bicarbonato CO₂-dependentes (Asp® e Gamete®), após exposição ao ar ambiente por 5 minutos, variou conforme o fabricante e o tipo de tampão contido (Gráfico VII), sendo de aproximadamente 5 e 15 minutos para os meios Gamete® e Asp®, respectivamente, que possuem tampão bicarbonato/HEPES, e de cerca de 45-90 minutos para os meios tamponados com bicarbonato (Fertilization®, Cleavage® e IVF®). Não se observou variação inter-incubadoras para o tempo de recuperação. Não se observou aceleração no tempo de recuperação com o aumento da concentração de CO₂ na faixa entre 5,0% e 6,0% utilizada no presente estudo.

DISCUSSÃO

O desenvolvimento dos meios de cultivo para a fertilização *in vitro* (FIV) em humanos assemelha-se a outros aspectos das técnicas de reprodução assistida, como a estimulação

Tabela I. Mensuração dos níveis do pH nos diversos meios de cultivo estudados após gaseificação por 12 horas, sob concentrações de CO₂ de 5,0%, 5,5% e 6,0%, nas duas incubadoras testadas.

Sistema tampão	Meios de cultivo	Incubadoras					
		Thermo Forma modelo 3110 serie II			Forma Scientific modelo 3546		
		CO ₂ 5,0%	CO ₂ 5,5%	CO ₂ 6,0%	CO ₂ 5,0%	CO ₂ 5,5%	CO ₂ 6,0%
bicarbonato	<i>Fertilization</i> ®, Cook	7,45	7,44	7,40	7,42	7,42	7,39
	<i>IVF</i> ®, Vitrolife	7,45	7,45	7,44	7,40	7,38	7,32
	<i>Cleavage</i> ®, Cook	7,49	7,43	7,38	7,43	7,43	7,42
bicarbonato/HEPES	<i>Follicle flushing</i> ®, Cook	7,06	7,00	6,86	7,12	7,07	6,99
	<i>Gamete</i> ®, Vitrolife	7,38	7,33	7,30	7,42	7,34	7,31
	<i>Asp</i> ®, Vitrolife	7,41	7,41	7,41	7,40	7,40	7,39
	<i>Oocyte wash</i> ®, Cook	7,12	7,04	6,96	7,08	7,05	7,03
	<i>HTF modificado</i> ®, Irvine	6,92	6,92	6,88	6,93	6,86	6,82
	<i>Sperm buffer</i> ®, Cook	7,35	7,33	7,33	7,34	7,33	7,30

ovariana controlada, os procedimentos de micromanipulação dos gametas e a avaliação genética dos pré-embriões. Os meios de cultivo inicialmente utilizados para a FIV eram aqueles destinados à incubação de células somáticas (Ham F-10, Earle) ou aqueles destinados às células somáticas, mas adaptados para a FIV e cultura embrionária animal (Tyrode's T6, WM1). O primeiro meio desenvolvido especificamente para a FIV humana foi o Fluido Tubário Humano (HTF – *human tubal fluid*) (Quinn, Kerin, Warnes, 1985), baseado na composição química do fluido da tuba uterina, incluindo ainda fatores efetivos para a cultura de embriões de ratos (ex. piruvato e lactato) (Lippes, Enders, Pragay et al. 1972; Borland, Biggers, Lechene et al, 1980). O HTF tornou-se muito popular e largamente utilizado para o cultivo de pré-embriões humanos em todo o mundo. Nos últimos anos, melhoramentos na formulação original do HTF foram realizados, que incluíram principalmente a adição de aminoácidos e a remoção/diminuição da glicose e do fosfato, além de correções nos níveis de bicarbonato (Quinn, 1995; Gardner, Lane, Calderon et al., 1996). Apesar destas mudanças, o HTF é categorizado como um meio do tipo simples.

Com o passar do tempo, novos meios surgiram, incorporando novos elementos aos meios do tipo simples, como sais inorgânicos, substratos energéticos, vitaminas, aminoácidos, além de outros co-fatores, tornando-se bem mais complexos. Estes novos meios, ditos complexos, contêm os elementos necessários para suportar a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial *in vitro*, de forma mais efetiva do que os meios simples (Bavister, 1995). Paralelamente ao desenvolvimento dos meios complexos, observou-se, a nível mundial, uma mudança conceitual, pois até então muitos laboratórios preparavam os próprios meios (meios simples) a partir dos sais, ao passo que com a introdução dos meios complexos, tal prática diminuiu sobremaneira por diversos fatores relacionados principalmente à necessidade de um controle de qualidade cada vez mais rigoroso, além da necessidade da manutenção da mesma qualidade dos meios lote-a-lote.

Deste modo, diversos fabricantes passaram a comercializar meios para cultivo de gametas e pré-embriões humanos, prontos para uso, e testados seguindo normas de biossegurança internacionais. Até o momento, não existem evidências científicas suficientes que permitam dizer que um meio é superior ao outro para os procedimentos rotineiros de FIV. A escolha por um determinado meio tem se baseado em fatores como controle de qualidade, tipo de teste biológico para avaliar o nível de endotoxinas e a eficiência da cultura embrionária, a experiência pessoal, custo, e a existência de um fornecedor que garanta um fornecimento constante, respeitando os prazos de validade dos diversos meios.

Embora os fabricantes dos meios de cultivo prontos para uso forneçam certificados de análise para cada lote produzido, que inclui informações sobre o pH do meio em determinada concentração de CO₂, nível de endotoxinas e taxa de formação de pré-embriões de 2 células ou blastocistos, é importante que cada laboratório caracterize os meios utilizados nas suas condições de trabalho. Isto é importante, pois as formulações químicas dos meios variam conforme o fabricante, e existem fatores locais, como a altitude do laboratório, por exemplo, que pode influenciar no pH final dos mesmos. Além disto, existem laboratórios que trabalham com incubadoras de CO₂ com múltiplas portas, que minimizam as alterações na atmosfera de CO₂ interna, ao passo que outros utilizam incubadoras com porta única, cuja alteração da concentração do CO₂ é significativamente maior (Abramczuk & Lopata, 1986). Outros trabalham com várias incubadoras, dividindo entre elas as fases da cultura embrionária, ao passo que alguns utilizam poucas incubadoras, o que aumenta o número de

Gráfico I. Curva de pH dos meios com tampão bicarbonato *Cleavage*[®], *IVF*[®] e *Fertilization*[®] expostos ao ar ambiente, após incubação por 12 horas sob atmosfera de 5,0% de CO₂

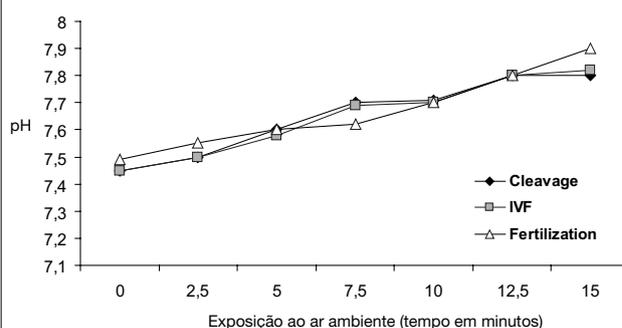


Gráfico II. Curva de pH dos meios com tampão bicarbonato *Cleavage*[®], *IVF*[®] e *Fertilization*[®] expostos ao ar ambiente, após incubação por 12 horas sob atmosfera de 5,5% de CO₂

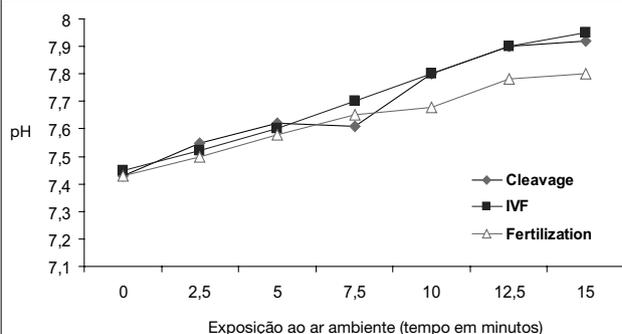
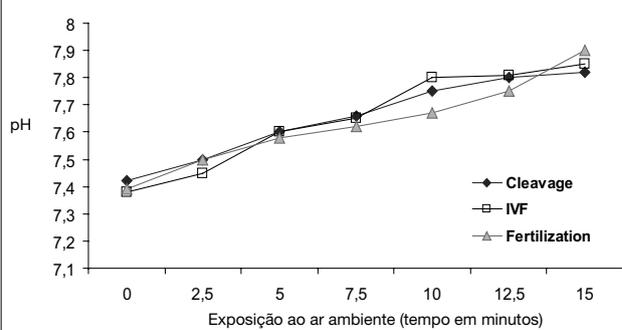


Gráfico III. Curva de pH dos meios com tampão bicarbonato *Cleavage*[®], *IVF*[®] e *Fertilization*[®] expostos ao ar ambiente, após incubação por 12 horas sob atmosfera de 6,0% de CO₂



abertura de portas e, conseqüentemente, aumenta a chance de alteração na cultura embrionária.

No sistema de cultivo embrionário *in vitro*, é a concentração de CO₂ da incubadora que irá determinar o pH dos meios de cultivo, conforme a equação de Henderson-Hasselbach. A maioria dos laboratórios utiliza concentrações de CO₂ ao redor de 5,0% para o cultivo embrionário. Tal sistemática se baseia no fato de que o pH do sangue situa-se ao redor de 7,4, e neste fluido o sistema tampão é o bicarbonato presente na concentração de 24mM. O bicarbonato está em equilíbrio com o gás carbônico, este presente nos pulmões sob pressão parcial de cerca de 40mmHg, que corresponde a 5%.

GRÁFICO IV. Curva de pH do meio *Sperm buffer*[®], exposto ao ar ambiente, após incubação por 12 horas sob atmosfera de CO₂ de 5,0%, 5,5% e 6,0%

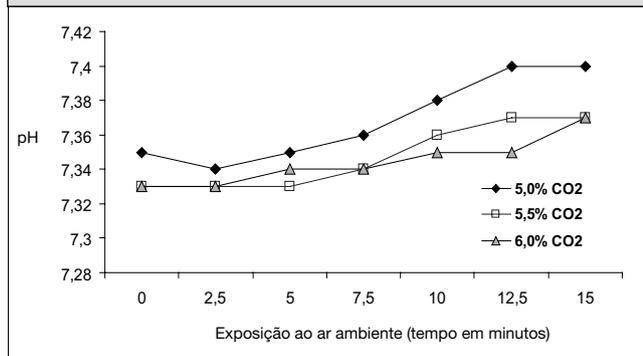


GRÁFICO V. Curva de pH dos meios tamponados com HEPES: *Oocyte wash*[®], *Follicle flushing* e *HTF modificado*[®], quando expostos ao ar ambiente, sem exposição prévia à atmosfera de CO₂

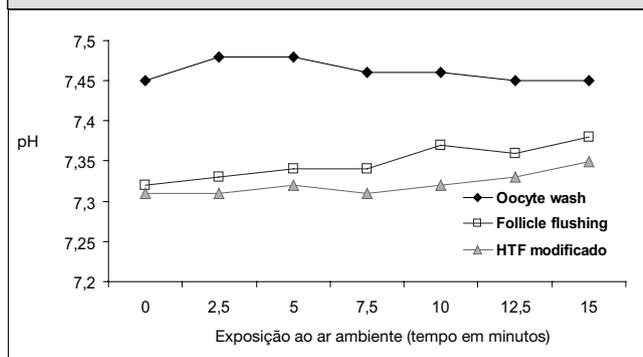
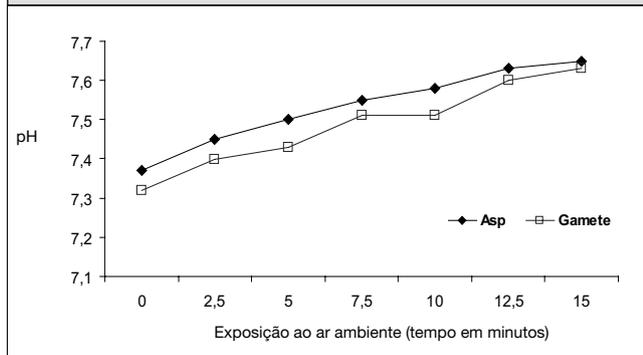


Gráfico VI. Curva de pH dos meios tamponados com HEPES: *Asp*[®] e *Gamete*[®], quando expostos ao ar ambiente, após incubação por 12 horas sob atmosfera de CO₂ de 5,5%



Entretanto, a concentração exata de bicarbonato existente nos meios comerciais geralmente não é informada, além do fato de existirem outros tampões fracos que podem alterar o pH final sob determinada atmosfera de CO₂. Para exemplificar, basta que a concentração de bicarbonato de sódio do meio seja 1mM maior, ou seja, 25mM ao invés de 24mM, para que a concentração necessária de CO₂ para se obter um pH de 7,4 mude de 5,0% para 5,8%, sem considerar outros fatores como a altitude onde se localiza o laboratório. Não se sabe ao certo de que forma o pH do meio de cultivo afeta o pH intracelular (pHi). Porém, tem-se observado que a manutenção do pH do meio de cultivo ao redor de 7,4 otimiza o desenvolvimento embrionário. A manutenção da

Gráfico VII. Tempo necessário para re-estabilização do pH dos meios de cultivo para níveis fisiológicos, após exposição ao ar ambiente por 5 minutos e re-incubação sob atmosfera de CO₂

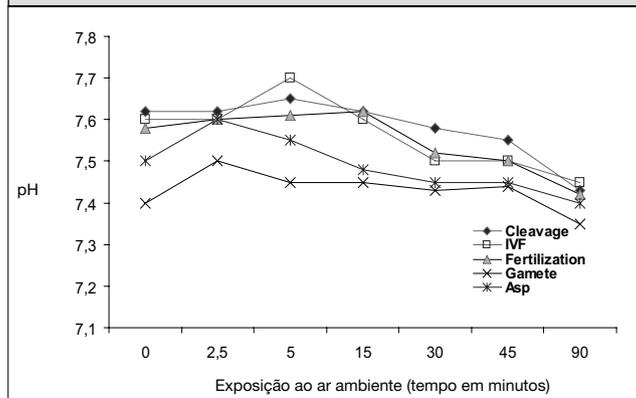
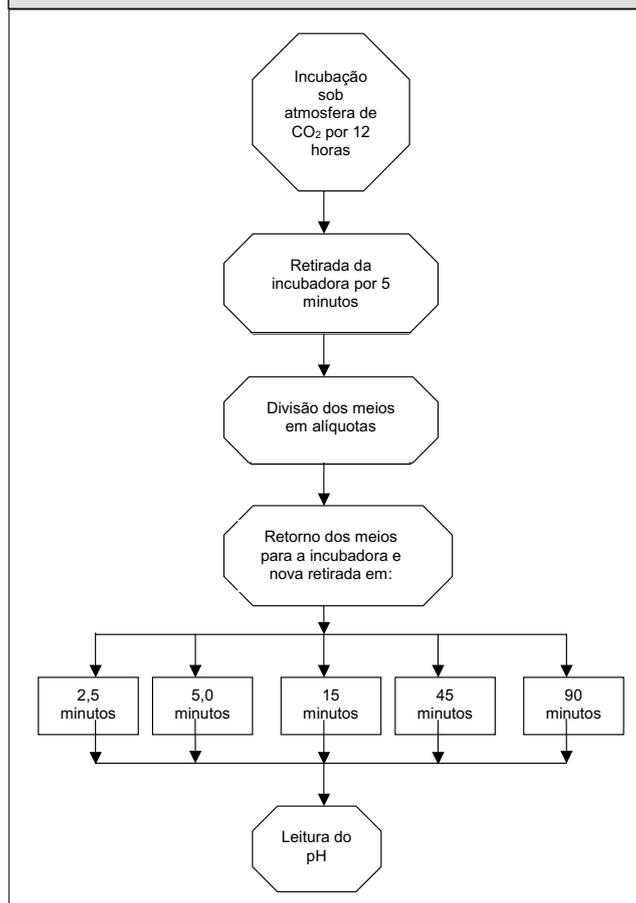


Figura II. Desenho do estudo para análise do tempo necessário de re-incubação em atmosfera de CO₂ para recuperação dos níveis fisiológicos de pH dos meios de cultivo avaliados (Experimento 3).



estabilidade do pH do meio também é um fator que interfere no desenvolvimento embrionário. Khabani et al. (2003) concluíram que o pH do meio tem um impacto significativo sobre as taxas de implantação e gravidez, sendo que a faixa de pH ótima ficou entre 7,3-7,4, com taxas de 32% e 48%, respectivamente, versus 25% e 30% para o valor de pH de 7,2. Por outro lado, Adaniya (2005) demonstrou que

o aumento da concentração de CO₂ da incubadora resultou em um decréscimo significativo do pH do meio, porém sem repercussão para o desenvolvimento embrionário e taxas de gravidez. Quinn & Cooke (2004) ajustaram a concentração de bicarbonato de sódio do meio HTF por eles idealizados, para permitir a manutenção de pH similar em atmosferas contendo 5% ou 6% de CO₂, e obtiveram taxas similares de fertilização e desenvolvimento embrionário.

Embora a equação de Henderson-Hasselbach seja extremamente útil do ponto de vista conceitual, sua acurácia para o cálculo direto do pH dos meios é limitada, pois vários ácidos fracos e os sais correspondentes, em constante associação e dissociação, fazem parte da formulação dos meios de cultivo, e causam um efeito iônico que altera o equilíbrio do pH e a força tampão do bicarbonato. Além disto, a adição de proteínas, como a albumina, além de atuar como quelante, age como tampão sendo importante para minimizar as flutuações do pH dos meios quando expostos ao ar ambiente, principalmente nas culturas realizadas num sistema aberto. A adição de aminoácidos e proteínas pode melhorar a capacidade tampão dos meios e minimizar as variações do pH intracelular dos pré-embriões (Edwards, Williams & Gardner, 1998). O efeito de outras proteínas, como a α - e β -globulinas, e macromoléculas, como o álcool polivinílico, o hialuronato e as glicosaminoglicanas, sobre o pH dos meios de cultivo ainda não está bem elucidado.

Abramczuk & Lopata (1986) observaram que a frequência da abertura das portas da incubadora de CO₂ tem relação direta com a velocidade de clivagem de pré-embriões, e atribuíram tal fato à desestabilização dos níveis de CO₂ no ar da incubadora, com conseqüente repercussão no pH do meio, além da alteração da temperatura. É observação freqüente no laboratório de fertilização *in vitro* que os níveis de CO₂ levam certo tempo para recuperar após a abertura e o fechamento da porta da incubadora, e que a velocidade de recuperação varia entre modelos diferentes de incubadoras (Scholtes & Zeilmaker, 1996). No presente estudo, realizamos os experimentos em duplicata, utilizando duas incubadoras de modelos diferentes, sendo uma delas mais antiga, cuja velocidade de recuperação dos níveis de CO₂ é mais lenta, e outro modelo moderno, equipado com dispositivo para recuperação rápida dos níveis de CO₂. Entretanto, para os meios de cultivo estudados nas condições experimentais testadas, não observamos diferenças entre elas quanto aos valores de pH obtidos após incubação, ou diferenças na velocidade de recuperação do pH após remoção dos meios da incubadora (experimento 3). A faixa de pH dos meios com tampão bicarbonato estudados, expostos à atmosfera de CO₂ entre 5,0% e 6,0%, foi de 7,38-7,49 para a incubadora equipada com dispositivo de recuperação rápida de CO₂ e múltiplas portas internas, e de 7,32-7,43 para a incubadora não equipada com estes recursos. Além disso, verificamos que o tempo para re-estabilização do pH, nos meios com tampão bicarbonato avaliados, após terem sido expostos ao ar ambiente, situou-se ao redor de 45 minutos para que atingissem pH ao redor de 7,5, e de 90 minutos para pH ao redor de 7,4, em ambas as incubadoras.

Os meios de cultivo contendo HEPES possibilitam a manipulação dos gametas fora da atmosfera de CO₂, pois mantém o pH dos meios com tampão bicarbonato estável quando expostos ao ar ambiente. Existe consenso na literatura sobre a utilização dos meios contendo tampão HEPES para a manipulação dos gametas logo após a aspiração oocitária e para o preparo dos espermatozoides (Quinn et al., 1985; Ozawa et al., 2006). Entretanto, existe controvérsia com relação a potencial toxicidade do HEPES para os pré-embriões. Alguns estudos demonstram que o HEPES altera a atividade dos canais iônicos presentes na membrana plasmática dos pré-embriões, sendo embriotóxico (Morgia et al., 2006),

enquanto outros afirmam que não há prejuízo para o desenvolvimento embrionário (Behr et al., 1990). Estes últimos, avaliando embriões de camundongos, demonstraram ser possível estender toda a cultura embrionária com meios de cultivo que utilizam tampão HEPES, sem que houvesse estímulo à partenogênese. Embora a maioria dos fabricantes não descreva a concentração de HEPES utilizada em cada meio, é interessante notar as diferenças entre os meios contendo HEPES de diferentes fabricantes em relação à capacidade tamponante, que podem refletir concentrações distintas de HEPES entre eles, possivelmente com o intuito de minimizar os potenciais efeitos deletérios do mesmo. No presente estudo, quando avaliamos o meio HTF com HEPES observamos que o mesmo apresenta pH estável sob ar ambiente por tempo prolongado. O mesmo ocorre com os meios Sperm buffer® e Oocyte wash® e Follicle flushing®. Entretanto, ao avaliar os meios Gamete® e Asp®, observamos que os mesmos são CO₂-dependentes, pois há elevação progressiva do pH quando expostos ao ar ambiente, embora de forma mais lenta do que os meios que não contém HEPES. Assim sendo, especulamos que a concentração de HEPES nestes últimos deva ser inferior a 4mM, que é a concentração descrita pelo fabricante para o HTF modificado (Quadro I). Tais diferenças aqui apontadas devem ser de conhecimento daqueles que trabalham no laboratório de fertilização *in vitro*.

Para o uso correto dos meios de cultivo comercialmente disponíveis, os laboratórios deveriam incluir como rotina nos procedimentos de controle de qualidade um exercício laboratorial denominado "caracterização dos meios de cultivo", previamente à introdução de um meio novo na rotina laboratorial. A caracterização dos meios visa responder três questões básicas: (1) qual o pH do meio que utilizo, na incubadora que utilizo, após incubação por um determinado período de tempo e sob determinada concentração de CO₂? (2) qual o tempo máximo que posso manter uma placa de cultura contendo meio com tampão bicarbonato fora da incubadora, sem que haja alteração significativa do pH do mesmo? (3) após trabalhar com uma placa de cultivo contendo meio com tampão bicarbonato fora da incubadora, por quanto tempo a mesma deve ser mantida na incubadora para a estabilização do pH em níveis fisiológicos, permitindo nova retirada? As respostas destas questões permitem estabelecer estratégias de trabalho no laboratório e otimizar a cultura embrionária, o que significa em alguns casos trabalhar com várias placas do mesmo meio para que o mesmo não permaneça por tempos prolongados fora da incubadora, ou então que permaneça por tempo inadequado gaseificando.

No presente estudo, apresentamos o método e os resultados de três experimentos que visaram caracterizar vários meios de cultivo, prontos para uso, e comercialmente disponíveis no Brasil. O intuito do presente estudo não foi o de analisar todos os meios existentes no mercado, mas principalmente os meios de cultivo com registro junto ao Ministério da Saúde, e cujos fabricantes possuam distribuidores no Brasil que fornecem lotes sucessivos de forma sistemática. A ferramenta utilizada para a caracterização dos meios foi a mensuração do pH dos mesmos, que pode ser facilmente realizada utilizando equipamento de bancada ou portátil, de baixo custo. No primeiro experimento, verificamos que após exposição por 12 horas à atmosfera de CO₂ houve relação inversa entre o aumento dos níveis de CO₂ no ar da incubadora e os valores do pH, que situaram-se na faixa de 7,40-7,49, 7,38-7,45 e 7,32-7,44 para as concentrações de CO₂ de 5,0%, 5,5% e 6,0%, respectivamente. Além disto, observamos que os meios com tampão HEPES apresentaram características distintas quando expostos à atmosfera de CO₂, havendo meios que não podem ser expostos à atmosfera de CO₂, pois acidificam para níveis não-fisiológicos, enquanto outros (Gamete®, Asp®) são CO₂-dependentes, devendo ser expostos

ao CO₂ antes do uso. Portanto, a conduta laboratorial adotada por muitos de colocar os meios na incubadora na véspera do caso de fertilização deve levar em consideração as diferenças existentes entre os diversos meios com tampão HEPES.

No segundo experimento, verificamos que os meios com tampão bicarbonato, num sistema aberto, não devem ficar expostos ao ar ambiente por mais de 2,5 minutos, pois ao final deste período já atingem pH ao redor de 7,5, que se eleva subsequentemente. Ainda, observamos que os meios com tampão HEPES variam quanto à capacidade tampão uma vez expostos ao ar ambiente, sendo que os meios deste tipo fabricados pela Irvine Scientific e Cook mantêm pH estável, em níveis fisiológicos, mesmo quando expostos ao ar ambiente por tempo prolongado. Em contrapartida, os meios com tampão HEPES fabricados pela Vitrolife são dependentes do CO₂, havendo elevação do pH para níveis não-fisiológicos após cerca de 5 minutos de exposição ao ar ambiente. Assim sendo, ao se utilizar estes últimos, deve-se respeitar estas características e adequar a estratégia de trabalho, como por exemplo, aumentar o número de placas e segmentar os procedimentos de forma a utilizar cada placa por no máximo 5 minutos. Por fim, no terceiro experimento, observamos que os meios com tampão bicarbonato e bicarbonato/HEPES CO₂-dependentes devem ser reincubados sob atmosfera de CO₂ por 45-90 minutos e 5-15 minutos, respectivamente, para estabilizarem em níveis fisiológicos de pH após exposição ao ar ambiente. Assim sendo, as placas/tubos contendo estes meios de cultivo devem ser gaseificadas apropriadamente, pela exposição por tempos adequados à atmosfera de CO₂, antes de serem removidas novamente da incubadora, evitando-se assim oscilações do pH e alcalinização excessiva.

Os resultados dos experimentos realizados no presente estudo devem ser interpretados com cautela, pois simulam fases da manipulação de gametas e cultivo de pré-embriões segundo o modelo aberto de cultivo. Neste sistema, as oscilações do pH dos meios CO₂-dependentes são mais acentuadas quando os mesmos são expostos ao ar ambiente. Da mesma forma, as oscilações de osmolaridade também são mais marcantes, devido à rápida evaporação principalmente quando se trabalha com pequenos volumes. A cultura em sistema fechado, que utiliza óleo (mineral ou de parafina) sobre a superfície do meio, confere uma barreira física que minimiza a taxa de evaporação, e consequentemente, as alterações de osmolaridade. Além disto, diminui a velocidade das trocas gasosas, reduzindo desta forma a perda de CO₂, e a consequente elevação do pH quando os meios são expostos ao ar ambiente. Embora o sistema fechado permita o cultivo dos pré-embriões em condições ótimas, tal sistema é inadequado do ponto de vista prático durante as fases de manipulação dos gametas, como no processamento do sêmen, na identificação dos oócitos pós-captação e durante o tratamento enzimático para a remoção das células do *cumulus* nos casos de FIV envolvendo a injeção intracitoplasmática do espermatozóide (ICSI) (Milker, Goldberg & Collins, 1994). Concluindo, a caracterização dos sistemas-tampão dos meios de cultivo prontos para uso comerciais, quando expostos às condições individuais de trabalho de cada serviço, facilita o entendimento do comportamento destes sistemas, e permite ajustes que irão otimizar as condições de cultivo dos gametas e pré-embriões. Tal sistemática deve fazer parte do controle de qualidade de um laboratório de fertilização *in vitro*.

REFERÊNCIAS

Abramczuk J.W., Lopata A. - Incubator performance in the clinical *in vitro* fertilization program: Importance of temperature conditions for the fertilization and cleavage of human oocytes. *Fertil. Steril.*, 46:132-134, 1986.

- Adaniya G.K.-The effect of increasing CO₂ concentration on the development of early cleaving embryos in *in vitro* fertilization cycles. *Fertil.Steril.*, 84, suppl 1:448, 2005.
- Bavister B.D. - Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum.Reprod. Update*, 1:91-148, 1995.
- Behr B.R., Stratton C.J., Foote W.D., Knutzen V., Sher G.-*In vitro* fertilization (IVF) of mouse ova in HEPES-buffered culture media. *J inVitro Fert.Embryo Transf.*, 7:9-15, 1990.
- Borland R.M., Biggers J.D., Lechene C.P., Taymor M.L. - Elemental composition of fluid in the human fallopian tube. *J. Reprod. Fertil.*, 58:479-482, 1980.
- Edwards L.E., Williams D.A., Gardner D.K. - Intracellular pH of the mouse preimplantation embryo: amino acids act as buffers of intracellular pH. *Hum. Reprod.*, 13:3441-3448, 1998.
- Gardner D.K., Lane M., Calderon I., Leeton J. - Environment of the preimplantation human embryo *in vivo*: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil. Steril.*, 65:349-353, 1996.
- Khabani A., Scott L., Tufts K., Craig L., Soules M., Kan M.- The impact of media pH on the development of human embryos. *Fertil. Steril.*, 80, suppl.3:117, 2003.
- Lippes J., Enders R.G., Pragay D.A., Bartholomew W.R. - The collection and analysis of human fallopian tubal fluid. *Contraception*, 5:85-103, 1972.
- Miller K.F., Goldberg J.M., Collins R.L. - Covering embryo cultures with mineral oil alters embryo growth by acting as a sink for an embryotoxic substance. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 11:342-345, 1994.
- Morgia F., Torti M., Montigiani M., Piscitelli C., Giallonardo A., Schimberni M, Giannini P., Sbracia M. Use of a medium buffered with N-hydroxyethylpiperazine-N-ethanesulfonate (HEPES) in intracytoplasmic sperm injection procedures is detrimental to the outcome of *in vitro* fertilization. *Fertil. Steril.*, 85:1415-1419, 2006.
- Ozawa M., Nagai T., Kaneko H., Noguchi J., Ohnuma K., Kikuchi K.-Successful pig embryonic development *in vitro* outside a CO₂ gas-regulated incubator: Effects of pH and osmolality. *Theriogenology*, 65:860-869, 2006.
- Quinn P. - Enhanced results in mouse and human embryo culture using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 12:97-105, 1995.
- Quinn P., Cooke S.-Equivalency of culture media for human *in vitro* fertilization formulated to have the same pH under an atmosphere containing 5% or 6% carbon dioxide. *Fertil. Steril.*, 81:1502-1506, 2004.
- Quinn P., Kerin J.F., Warnes G.M. - Improved pregnancy rate in human *in vitro* fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil. Steril.*, 44:493-498, 1985.
- Quinn P., Warnes G.M., Kerin J.F., Kirby C.-Culture factors affecting the success rate of *in vitro* fertilization and embryo transfer. *Ann N Y Acad Sci*, 442:195-204, 1985.
- Scholtes M.C.W., Zeilmaker G.H. -A prospective, randomized study of embryo transfer results after 3 or 5 days of embryo culture in *in vitro* fertilization. *Fertil. Steril.*, 65:1245-1248, 1996.

“Assisted hatching” com laser em embriões criopreservados

Laser assisted hatching on frozen-thawed embryos

Claudia Guilhermino Petersen¹⁻²;
Ana Lucia Mauri¹; Ricardo Luiz
Razera Baruffi¹; João Batista
Alcântara Oliveira¹; Valeria Felipe¹;
Fabiana Cagnoto Massaro¹ and Jose
Gonçalves Franco Jr¹.

¹-Centre for Human Reproduction Prof Franco Junior - Ribeirão Preto, SP, Brazil.

²-Correspondence to: Claudia G Petersen
 Centre for Human Reproduction Prof Franco Junior
 Av. Prof. João Fiusa 869 - CEP 14025-310
 Ribeirão Preto, SP - Brazil
 Phone: 55-16-3911.1100
 Fax: 55-16-3911.1100
 E-mail: petersenclaudia@crh.com.br
 s.esteves@androfert.com.br

ABSTRACT

INTRODUCTION

The objective of the present study was to evaluate the efficacy of quarter-laser zona thinning assisted hatching (qLZT-AH) in improving the implantation rate of cryopreserved-thawed (CT) embryos.

MATERIAL AND METHODS

A total of 258 patients who participated in and ICSI program and had their embryos cryopreserved were divided into two groups: Group I (n = 220), patients who had all their supernumerary embryos cryopreserved, independently of their morphology and Group II (n = 38), patients with risk of ovarian hyperstimulation syndrome (SHO) who had all their embryo cryopreserved. Patients were randomized to be included in the group where qLZT-AH was performed (experimental group) or not (control group) in both population, at the moment of embryo transfer. The population characteristics: age, number of previous transfers, etiology, infertility duration, number of embryo frozen; the embryo factors: survival, cleavage, embryo ZP thickness, embryo quality and the outcomes: implantation and pregnancy rates were evaluated. The transfers were performed by two different protocols: artificial and natural protocols.

RESULTS

Embryo implantation of the hatched embryos did not demonstrated significant difference in relation to the implantation of not hatched embryos in both patients population (Group I: qLZT-AH = 7.8%, Control = 7.9; Group II: qLZT-AH = 28.8%, Control = 14.2%). The patients who frozen all their embryos (Group II) presented significant higher pregnancy and implantation rates compared to the patients who had exceeding embryos cryopreserved (Group I) (39.5% and 21.3%; 18.2% and 7.8%, respectively). Patients of the Group I who transferred intact embryos in artificial cycles showed higher pregnancy and implantation rates compared to the patients who transferred intact embryos in natural cycles (27.1% and 7.8%; 12.2% and 2.9%, respectively).

CONCLUSION

The present data shown that the qLZT-AH methodology is not efficient to improve implantation rates of cryopreserved embryos.

Keywords: quarter laser zona thinning, cryopreserved thawed embryos, implantation.

RESUMO

INTRODUÇÃO

O objetivo deste estudo randomizado foi avaliar a eficácia do hatching assistido por afinamento de 1/4 da zona pelúcida (ZP) através de diodo laser na melhora da implantação de embriões congelados e descongelados.

Recebido em 17/05/2006
 Avaliado e aceito em 14/08/06

MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 258 pacientes que participaram do programa de ICSI e tiveram seus embriões congelados foram distribuídas em dois grupos: Grupo I (n=220), pacientes que congelaram todos os embriões excedentes independente da qualidade embrionária e Grupo II (n=38), pacientes com risco de síndrome de hiperestimulação ovariana (SHO) que congelaram todos os embriões. As pacientes em cada grupo foram randomizadas, para realizar (grupo experimental) ou não (controle) o afinamento de 1/4 da ZP por laser, no momento da transferência. As características das populações: idade, número de ciclos prévios, etiologia, duração da infertilidade, números de embriões congelados; fatores embriológicos: sobrevivência, clivagem, espessura da ZP do embrião, qualidade embrionária e resultados: implantação e gravidez foram analisados. As transferências foram realizadas em dois esquemas: ciclo natural e ciclo artificial.

RESULTADOS

A implantação de embriões com ZP afinada por laser não mostrou diferença significativa em relação a implantação dos embriões com ZP intacta em ambos os grupos de pacientes (grupo I: laser = 7.8% , não laser = 7.9% ; grupo II: laser = 28.8% , não laser = 14.2%). O grupo de pacientes que congelaram todos embriões (Grupo II) obteve maior taxa de gravidez e implantação comparado com o grupo de pacientes que congelaram apenas os embriões excedentes (Grupo I) (39.5% e 21.3% ; 18.2 e 7.8% , respectivamente). Pacientes do grupo I que transferiram embriões intactos em ciclo substitutivo obtiveram maiores taxas de gravidez e implantação comparado com pacientes que transferiram intactos embriões em ciclo natural (27.1% e 7.8 % ; 12.2 % e 2.9% , respectivamente).

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra que o método de afinamento de 1/4 da ZP por laser não é eficaz para melhorar a implantação dos embriões criopreservados.

Palavras chaves: afinamento de uma quarto da zona pelúcida com laser, embriões criopreservados, implantação.

INTRODUCTION

Embryo cryopreservation has been a successful part of assisted reproductive technologies, but the results appear to indicate a reduction in pregnancy and implantation rates compared to fresh embryos. It has been suggested that immersion in cryoprotectants and temperature changes during the process of cryopreservation may affect the physicochemical characteristics of the zona pellucida (ZP) by hardening it and consequently may impair the natural process of blastocyst hatching (Schalkoff et al., 1989; Vicente et al., 1990; Carroll et al., 1990). Assisted hatching (AH) has been used to promote the embryo's ability to undergo hatching following the cryopreservation procedures (Cohen et al., 1991). Comparative studies applying mechanical and chemical AH methodologies to cryopreserved embryos after thawing have been reported to be effective (Tucker et al., 1991, Check et al., 1996, Tao and Tamis., 1997, Vanderzwalmen et al., 2003; Gabrielsen et al., 2004) or not (Edirisinghe et al., 1999) in improving pregnancy and implantation rates. In the last 6 years, the use of non-contact infrared diode laser has become more frequent compared with previous AH methodologies since it allows a rapid, controlled and safe microdissection of the ZP (Rink et al., 1996; Benjamin et al., 2003). Several centers are applying this methodology for AH

to fresh embryos and are also using it for embryo biopsies (Veiga et al., 1997; Mantoudis et al., 2001; Baruffi et al., 2000; Petersen et al., 2002; Nagy et al., 2002; Petersen et al., 2005). However, a few randomized studies using laser methodology for cryopreserved-thawed (CT) embryos have failed to show improvement in the implantation rate (Primi et al 2004; Ng et al 2005). The objective of the present study was to evaluate in a randomized manner the implantation and pregnancy rates of CT embryos submitted to quarter-laser zona thinning assisted hatching (qLZT-AH) methodology.

MATERIAL AND METHODS

Patients

The study was conducted on cryopreserved-thawed (CT) embryos from patients who were admitted to an intracytoplasmic sperm injection (ICSI) program. A prospective randomized study of 258 frozen-embryo cycles was performed at the Human Reproduction Center – Prof Franco Junior. According to a protocol approved by the Institutional Ethics Committee, two patient populations were included in this study. Population I: patients who had all their surplus embryos frozen, independently of the embryo morphology (no. of cycles = 220); Population II: patients with risk of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) who had all of their embryos cryopreserved (no. of cycles = 38).

For both populations, whether a patient would be included in the qLZT-AH group or in the control group (no qLZT-AH) was determined by first using a randomized table previously elaborated for the study and then a second randomization by drawing lots at the time the patients were receiving their embryos, i.e. at the time of the transfer cycles. All transfers were performed by a single physician. An identifying code number was assigned to each patient at the time of randomization in order to maintain anonymity.

The primary outcome measure was the evaluation of implantation rates and was defined as the number of gestational sacs seen by transvaginal ultrasound examination divided by the total number of embryos transferred. Clinical pregnancy, abortion, and deliveries were calculated for each subgroup in both patients groups (qLZT-AH and control). A pregnancy test was performed on the 14th day after treatment and clinical pregnancy was determined based on the presence of a gestational sac and fetal heart beat by ultrasound scanning 4 weeks after transfer.

ICSI and embryo culture

All patients were submitted to the routine scheme of controlled ovarian stimulation (Franco Jr et al, 2001). Oocyte retrieval was performed 36 hours after hCG by transvaginal ultrasound-guided aspiration. ICSI was performed according to the method of Svalander et al (1995). Oocytes were examined after 17-20 hours to assess fertilization and those with two distinct pronuclei were considered to be normal zygotes. Twenty-five to 27 hours after injection, on the 1st day of culture, early cleavage was evaluated and 2-cell embryos were separated for transfer (Petersen et al., 2001). For population I, embryo transfers were carried out on day 2 or day 3, according to the number of 4-cell embryo stages with equal regular blastomeres (grade I embryo) available on day 2. Day 2 embryo transfers were performed when ≤ 3 grade I embryos were available on day 2. On the other hand, if > 3 grade I were available on day 2, embryo transfers were carried out on day 3 in order to enhance embryo selection. However, for population II, all fresh embryos were cryopreserved on day 2.

Freezing procedure

Embryo cryopreservation was performed using a freezing media kit (Irvine Scientific, USA) which contained the following solutions: PBS, 1.5 M propanediol (PROH) and 1.5 M PROH + 0.1 M sucrose. The material was cooled in a programmable freezer (Cryologic CL-863, Australia) with a starting temperature of 24°C. Cooling rate was 2°C per minute until -6°C, when manual seeding was performed. The temperature was then reduced 0.3°C per minute until -35°C, followed by a free fall to -150°C, after which the straws were transferred to liquid nitrogen.

Thawing procedure

For the thawing process, an embryo thaw media kit (Irvine Scientific) was used. Embryos were thawed by removing the straw from storage, exposure to air for 30 s and immersion in a water bath at 30°C for 40 s. The embryos were successively added to different PROH solutions (1.0 M PROH/0.2 M sucrose, 5 min; 0.5 M PROH/0.2 M sucrose, 5 min) followed by 0.2 M sucrose for 10 min. Rehydration was completed by transferring the embryos to PBS medium for 5 min at room temperature and to PBS stabilized at 37°C in the presence of 5% CO₂ for a further 5 minutes (Mauri et al., 2001). The criterion for the evaluation of morphological survival was that the thawed embryo would have at least one intact blastomere and no signs of damage to the zona pellucida (Lai et al., 1996). Surviving embryos were transferred to 50 µl microdroplets of P1/10% HSA or blastocyst medium/10%HSA (Irvine Scientific) in falcon dishes, depending on the day they were frozen, and were placed in culture for 24 hours at 37°C/5.5%CO₂. Frozen-thawed embryo transfer was performed after assessment of embryo cleavage, when the division of at least one of the blastomeres was observed after 24 hours of culture (Van der Elst et al., 1997). Embryos that presented a continuation of the embryo cleavage process were preferentially transferred. However, when it was not available, embryos with no continuation of the cleavage were also transferred. On the other hand, exceeding cleavage embryos were leave in culture and refrozen in a blastocyst stage when available.

Embryo quality was assessed at the time of transfer for all patients according to the following criteria: grade 1, embryos with 8 cells by day 3 or the morula stage by day 4 without fragmentation and with all their blastomeres intact after thawing; grade 2, embryos without 8 cells by day 3 and/or no morula stage by day 4 with ≤25% of their blastomeres intact after thawing and/or with ≤25% fragmentation; grade 3, embryos without 8 cells by day 3 or no morula stage by day 4 with >25% of their blastomere intact after thawing and/or >25% fragmentation.

Transfer cycles

Two different protocols were used for transfer:

1 - In the natural cycle, follicular development was monitored by serial vaginal ultrasonography starting on the 10th day of the cycle. A 10000 IU dose of hCG was administered when a follicle of ≥ 17 mm was observed. Thawing was routinely performed on the fifth or sixth day after hCG (day of hCG injection = day 0) and embryos were transferred on the sixth or seventh day after hCG, depending on the day on which they were frozen.

2 - In the artificial cycle, estradiol valerate (Postoval, Wyeth, São Paulo, SP, Brazil) was administered from the first to the 14th day of the cycle at a daily dose of 6 mg. Progesterone (Utrogestan, Besins International, France) was also introduced on the 14th day at a dose of 400 mg/day by the vaginal route, as long as endometrial thickness was ≥ 6 mm (Oliveira et al., 1997) and was increased to a daily dose of 800 mg on the day

of embryo transfer. Thawing was performed on the fifth or sixth day of progesterone treatment and embryos were transferred on the sixth or seventh day, depending on the day on which they were frozen.

Assisted hatching procedure

The embryos were positioned for the assessment of ZP thickness before laser manipulation and transfer. ZP thickness measurements were performed at four points (9, 12, 3 and 6 o'clock positions), using an inverted Eclipse TE 300 microscope (Nikon Instrument, NY, USA) equipped with a Hoffman lens and an ocular micrometer. qLZT-AH was performed with a 1.48 µm wavelength (infrared) diode laser (Fertilase™ system, Medical Technologies Montreux, Lausanne, Switzerland) with a pilot laser light that operated through a 40x microscope objective mounted on an inverted Eclipse TE 300 microscope with displacement heated stage. The embryos were treated directly in their original dish containing 50 µl microdroplets of culture medium, a Falcon 1006 Petri dish (Becton Dickinson, Denmark). qLZT-AH was performed by thinning the ZP to a depth of 50-80% of its thickness starting at one point and continuing until 25% of the ZP was irradiated, i.e. laser thinning was initiated at the 9 o'clock position and consecutive irradiations were generated until the 12 o'clock position, with an irradiation time of 9 ms to reach a total length of approximately 80 µm.

Data Analysis

Data are reported as means ± standard deviation and were analyzed using the InStat 3.0 program for Macintosh (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The Mann-Whitney test and Fisher exact test were used when appropriate. The level of significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

A total of 350 laser-thinned CT embryos were compared with 352 intact CT embryos. The patient characteristics such as age at embryo freezing, age at embryo thawing, infertility duration, primary and secondary infertility, etiology, number of cycles, number of frozen embryos, number of previous transfers did not differ between the qLZT-AH and control groups or between populations I and II (Tables 1 and 2, respectively).

Embryo factors such as survival and cleavage rates of CT embryos, mean number of embryo transferred and ZP thickness were the same for the qLZT-AH and control groups and for population I and II (Tables 3 and 4, respectively).

For Population I, a total of 20 clinical pregnancies (18.2%) and an implantation rate of 7.8% were achieved with the use of AH. This did not differ from the control group in which the thawed embryos were transferred with an intact zona (18.2% and 7.9%, respectively) (Table 3).

However, for population II, more patients achieved pregnancy when qLZT-AH was applied, although the rate was not statistically different from the control group (47.4% and 31.6%, respectively). We also observed a higher implantation rate for laser-thinned embryos compared to control, but without statistical significance (28.8% and 14.2%, respectively) (Table 4). Deliveries and abortions were similar for the qLZT-AH and control groups and for both populations.

Embryo quality after thawing was evaluated in both populations. Figures 1 and 2 show the percentage of grade 1, grade 2 and grade 3 embryos in population I and population II, respectively. No significant difference was observed between the qLZT-AH and control groups.

Two different schemes of transfer (natural and artificial) were used for both the qLZT-AH and control groups and both populations (I and II). In population I of the control group,

TABLE 1 - Characteristics of population I: comparison between the qLZT-AH group and the control group.

	QLZT-AH	Control	
Patients	110	110	
Patient age at embryo freezing (mean ± SD)	31.7 ± 4.8	32.5 ± 4.4	Ns
Patient age at embryo thawing (mean ± SD)	32.3 ± 4.0	33.4 ± 4.6	Ns
Infertility duration (years)	3.9 ± 2.7	4.7 ± 3.4	Ns
Primary infertility	62%	57%	Ns
Secondary infertility	48%	43%	Ns
Etiology			
Male	29%	38%	Ns
Female	44%	38%	
Mixed	19%	17%	
Idiopathic	8%	7%	
Number of previous cycles			
=0	10%	11%	Ns
=1	44%	41%	
=2	20%	22%	
≥3	26%	26%	
Mean of previous cycles	2.2 ± 1.7	2.1 ± 1.5	Ns
Mean number of embryos frozen	6.7 ± 3.9	6.5 ± 3.9	Ns

Ns = non-significant

TABLE 2 - Characteristics of population II: comparison between the qLZT-AH group and the control group.

	QLZT-AH	Control	
Patients	19	19	
Patient age at embryo freezing (mean and ±SD)	32.1 ± 3.9	30.1 ± 4.3	Ns
Patient age at embryo thawing (mean ± SD)	32.5 ± 4.0	30.5 ± 4.4	Ns
Infertility duration (years)	4.1 ± 2.5	4.8 ± 2.9	Ns
Primary infertility	47%	74%	Ns
Secondary infertility	53%	26%	Ns
Etiology			
Male	26%	26%	Ns
Female	42%	53%	
Mixed	16%	5%	
Idiopathic	16%	16%	
Number of previous cycles			
=0	47%	74%	Ns
=1	32%	16%	
=2	16%	5%	
≥3	5%	5%	
Mean of previous cycle	1.5 ± 0.7	1.6 ± 0.8	Ns
Number of embryos frozen(mean ± SD)	15.9 ± 6.1	15.0 ± 6.0	Ns

Ns = non-significant

TABLE 3 - Outcomes of population I: comparison between the qLZT-AH group and the control group.

	qLZT-AH	Control	
Thawed transfer cycles	110	110	
No. of embryos thawed	448	457	
Survival rate after thawing	87%	88%	Ns
Cleavage rate after 24 h culture	64%	68%	Ns
No. of embryos transferred(mean \pm SD)	2.69 \pm 0.8	2.75 \pm 0.7	Ns
Scheme of transfer			
Natural	45%	55%	
Artificial	55%	45%	Ns
ZP thickness (μ m)(mean \pm SD)	17.1 \pm 3.0	17.2 \pm 2.7	Ns
Clinical pregnancy/transfer	18.2%	18.2%	Ns
Clinical pregnancy/scheme of transfer	18% ^a	7.8% ^b	Ns
Natural	18.3% ^{a1}	27.1% ^{b1}	Ns
Artificial			
Implantation rates/transfer	7.8	7.9%	Ns
Implantation rates/scheme of transfers	7.4% ^c	3.0% ^d	Ns
Natural	8.0% ^{c1}	14.3% ^{d1}	Ns
Artificial			
Abortion	4	4	
Deliveries	16	16	

Ns=non-significant, axa1= ns, bxb1=p=0.01, cxc1=ns, dxd1=p=0.003.

TABLE 4 - Outcomes of population II: comparison between the qLZT-AH group and the control group.

	qLZT-AH	Control	
Thawed transfer cycles	19	19	
N° of embryos thawed	97	86	
Survival rate after thawing	91%	87%	Ns
Cleavage rate after 24 h culture	70%	70%	Ns
Mean no. of embryos transferred	2.9 \pm 0.6	2.6 \pm 0.7	Ns
Scheme of transfers			
Natural	11%	22%	Ns
Artificial	89%	78%	Ns
Mean ZP thickness (μ m) of th embryos transferred	16.8 \pm 3.1	17.2 \pm 2.6	Ns
Clinical pregnancy/transfer	47.7%	31.6%	Ns
Clinical pregnancy/scheme of transfer	33.3%	50%	Ns
Natural	5.4%	27%	Ns
Artificial			
Implantation rates	28.8%	14.2%	Ns
Implantation rates/scheme of tranfer			
Natural	18.2%	16.7%	Ns
Artificial	10.5%	33.3%	Ns
Abortion	2	1	
Deliveries	7	5	

Ns = non-significant

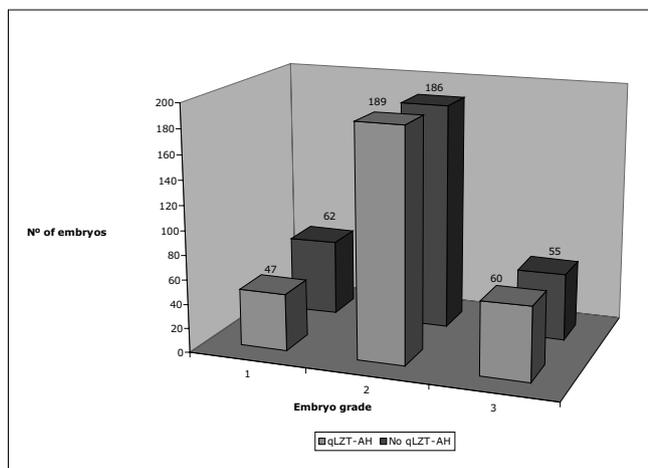


FIGURE 1- Population I: Quality of the embryos transferred.

	qLZT-AH47	No-qLZT-AH62	p
Grade 1	47 (15.9%)	62 (20.5%)	ns
Grade 2	189 (63.8%)	186 (61.3%)	ns
Grade 3	60 (20.3%)	55 (18.2%)	ns

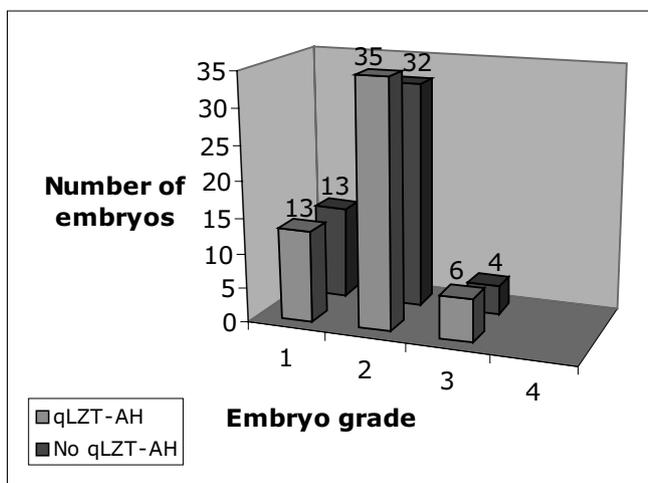


FIGURE 2- Population II: Quality of the embryos transferred.

	qLZT-AH13	No-qLZT-AH	p
Grade 1	13 (24%)	13(26.5%)	ns
Grade 2	35 (64.8%)	32(65.3%)	ns
Grade 3	6 (11.2%)	4(8.2%)	ns

more pregnancies were achieved when the embryos were transferred in an artificial cycle (27.1%) compared with natural cycles (7.8%), ($p < 0.05$). However, this significant difference was not observed in the qLZT-AH group. In population II there was not difference in implantation pregnancy rate between the laser and control subgroup either for artificial or natural transfer cycles (Table 3).

DISCUSSION

One of the reasons that have been suggested to explain the general lower implantation rates after transfer of CT embryos compared with fresh embryos is the alterations that occur in

the glycoprotein matrix (zona pellucida) during the freezing-thawing process, causing the embryo to have 'exacerbated abnormal zona hardness' which results in failure of embryonic zona pellucida rupture, a prerequisite for implantation (Cohen et al., 1991, Tucker et al., 1991). AH has been used as a method for improving the implantation potential of these CT embryos with a 'harder zona' since it may improve the chances of the embryo attaching to the womb by allowing earlier contact and dialogue between the embryo and the endometrium.

Conflicting information regarding the impact of AH on CT embryos exists in the literature. AH in CT human IVF embryos was first performed mechanically by Tucker et al, (1991) who reported a trend towards an improved implantation rate with the use of the partial ZP dissection methodology. Other groups later showed that chemical AH using acidic Tyrode solution is an effective method for the improvement of implantation and pregnancy rates in thawed embryo transfers (Check et al., 1996; Tao and Tamis, 1997 and Gabrielsen et al., 2004).

In contrast to the chemical AH method, for which only beneficial effects have been demonstrated, the effect of mechanical hatching on CT embryos has been reported to be beneficial (Vanderzwalmen et al., 2003) or not (Edirisinghe et al., 1999).

On the other hand, AH laser methodology has been successfully applied for the last decade in fresh embryo transfers (Antinori et al., 1996; Petersen et al., 2005). It permits a controlled and rapid microdissection of the ZP and its safety has been proved in both animals (Germond et al., 1995) and humans (Germond et al., 2000). Laser irradiation produces photolytic ablation of the ZP without alteration of the cytoplasmic structure. Although it has been much applied to fresh embryos, its use for CT embryos has been described only in the last two years in two reports (Primi et al., 2004 and Ng et al., 2005).

Primi et al. (2004), in a multicenter study, were the first to perform AH with a diode laser in CT embryos. The study was carried out at four IVF centers in which AH was performed on 405 embryos by opening their ZP in a single breach in patients coming for the first or third transfer cycle of CT embryos. For patients undergoing their first CT embryo transfer cycle, significantly lower pregnancy ($1.6 \times 15.1\%$; $p=0.01$) and implantation ($1.6\% \times 10\%$; $p=0.01$) rates were obtained when they received laser-drilled embryos and no immunosuppressive/antibiotic treatment compared to control. In addition, patients coming for the third transfer cycle did not benefit from the use of laser methodology.

Recently, Ng et al. (2005), in a randomized study using the same methodology as used in our study, did not show improvement in implantation or pregnancy rates after transferring 188 laser-thinned CT embryos (9.0% and 12.5%, respectively) compared to control (6.8% and 15%, respectively), suggesting that laser AH should not be performed routinely in all CT embryos.

The data obtained in this prospective and randomized study failed to show a significant improvement in the implantation rate of CT embryos after using the qLZT-AH methodology in patients who had their surplus or all embryos cryopreserved. The present study agrees with the two previous studies using laser methodology. However, both previous studies showed an important bias that could affect the interpretation of the outcomes. In the study of Primi et al (2004), patients submitted to pseudo-randomization based on historical control were used as control for the group of patients who were coming for the third transfer.

Furthermore, in the report of Ng et al (2005) the randomization was not efficient in producing two groups (AH and control) with similar numbers of embryos transferred, suggesting that the clinical criteria defining the number of embryos to be

transferred were not the same for the AH and control groups. Thus, both the historical control group (Primi et al., 2004) and the imbalance in embryo number (Ng et al., 2005) could affect the interpretation of the outcomes.

The quality of the embryo is a factor that can affect the outcomes. To freeze all of the exceeding embryos independently of their morphology is an important factor that should be considered in evaluating the results. In Brazil, it is not permitted to discard poor quality embryos and to freeze them could impair the results.

For this reason, the quality of the CT embryos transferred was evaluated in both populations. Our data showed no significant difference in the quality distribution of CT embryos (grades I, II and III) in the qLZT-AH and control subgroups for either population I or II. Patients of population I received 16% and 20.4% of grade I CT embryos in the qLZ-AH and control groups, respectively, and patients of population II received 24% and 26.5% of grade I CT embryos in the qLZT-AH and control groups, respectively.

CT embryo transfers have been successfully performed in natural cycles following spontaneous ovulation and in cycles in which the endometrium is artificially prepared with exogenous steroids. Studies in the literature have compared the outcome of natural CT embryo transfers to artificial cycles, with conflicting results. Some groups have shown no difference in pregnancy rates using or not artificial cycles (Sathanantam et al., 1991; Al-Shawaf et al., 1993; Gelbaya et al 2006), while others have shown higher clinical pregnancy rates in women who underwent artificial CT embryo transfer cycles (Schmidt et al., 1989; Muasher et al., 1991; Davies et al., 1991).

In our study, for those patients who had their exceeding embryos cryopreserved a significantly higher pregnancy and implantation rate was obtained in artificial transfer cycles compared to natural transfers (27.1% x 7.8% and 12.2% x 2.9%, respectively, $p < 0.05$) when control CT embryos were transferred. The same was not observed for the qLZT-AH group, for which the pregnancy and implantation rates were similar for artificial and natural transfer cycles (18.3% x 8.0% and 18% x 7.4%, respectively), showing no effects on outcomes with the use of qLZT-AH and artificial transfer cycles for this specific subgroup. For patients who froze all their embryos, the data showed no difference in outcome between artificial and natural cycles but the number of transfers in natural cycles were too small to permit any conclusion.

On the other hand, pregnancy and implantation rates were statistically different between populations I and II. Patients who froze all their embryos showed significant higher implantation ($p = 0.005$) and pregnancy ($p = 0.0001$) rates compared to patients who had only exceeding embryos cryopreserved (39.5% and 21.3%; 18.2% and 7.8%, respectively).

One interpretation for this fact could be the large number of oocytes collected from this population, making this population favorable. In addition, in population II there was a high incidence of patients with chronic anovulation and 83% of the transfers of this population had to be performed in artificial schemes. This fact may also have helped improve the results for this specific population, at least for the control group.

In the literature, few randomized studies evaluating the efficacy of qLZT-AH on CT embryos with a large number of data are available. There is only one study assessing a total of 188 CT embryos. Our data show the results of 350 microdissected embryos and can be helpful to evaluate the real efficacy of qLZT-AH for CT embryos.

In conclusion, qLZT-AH was not efficient regarding CT embryo cleavage either for patients who had supernumerary embryos or for those with all their embryos cryopreserved and should not be routinely used in an IVF program for cryopreserved embryos.

REFERENCES

- 1-Al Shawaf T, Yang D, Al-Magid Y, Seaton A, Iketuosin F, Craft I 1993 Ultrasound monitoring during replacement of frozen-thawed embryos in natural and hormone replacement cycles. Human Reproduction 8,2068-2074.
- 2-Antinori S, Selman HA, Caffa B, Panci C, Dani G, Versaci C 1996 Zona opening of human embryos using a non-contact UV laser for assisted hatching in patients with poor prognosis of pregnancy. Human Reproduction 11,2488-2492.
- 3- Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Ferreira RC, Coelho J, Franco Jr JG 2000 Zona thinning with noncontact diode laser in patients aged < or =37 years with no previous failure of implantation: a prospective and randomized study. Journal of Assisted Reproduction and Genetics 17,557-560.
- 4- Benjamin C W, Boyd C A, Lanzendorf S E 2003 randomized controlled study of human zona pellucida dissection using the zona infrared laser optical system: evaluation of blastomere damage, embryo development, and subsequent hatching. Fertility Sterility 80, 1249-1254.
- 5- Caroll J, Depypere H, Matthews CD 1990 Free-thaw-induced changes of the zona pellucida thinning and alternative approach to assisted hatching. Human Reproduction, 16, 1859-1964.
- 6- Check JH, Hoover L, Nazari A, O'Shawghnessy A, Summers D 1996 The effect of assisted hatching on pregnancy rates after frozen embryo transfer. Fertility and Sterility 65, 254- 257.
- 7-Cohen J (1991) Assisted hatching of human embryos. Journal In Vitro Fertility Embryo Transfer 8,179-190.
- 8- Davies DW, Jenkins JM, Anthony FW, Gadd SC, Watson RH, Sakhrani LR, Masson GM 1991 Biochemical monitoring during hormone replacement therapy cycles for transfer of cryo-preserved embryos in patients with functional ovaries Human Reproduction 6,934-938.
- 9-Edirisinghe WR, Ahnonkitpanit V, Promviengchai S, Suwanajakorn S, Pruksananonda K, Chinpilas V, Virutamasen P 1999 A study failing to determine significant benefits from assisted hatching: patients selected for advanced age, zona thickness of embryos, and previous failed attempts. Journal of Assisted Reproduction and Genetics 16, 294-301.
- 10-Franco Jr JG, Baruffi RLR, Coelho J, Mauri AL, Petersen CG, Chufallo JE, Felipe V, Gaberllini E 2001 Prospective randomized comparison of ovarian blockade with nafarelin versus leuprolide during ovarian stimulation with recombinant FSH in an ICSI program. Journal of Assisted Reproduction and Genetics 18,593-597.
- 11-Gabrielsen A, Agerholm I, Toft B, Hald F, Petersen K, Aagaard J, Feldinger B, Lindenberg S, Felder J 2004 Assisted hatching improves implantation rates on cryopreserved-thawed embryos. A randomized prospective study. Human Reproduction 19, 2258-2262.
- 12-Gelbaya TA, Nardo LG, Hunter HR, Fitzgerald CT, Horne G, Pease EE, Brison DR, Lieberman AB 2006 Cryopreserved-thawed embryo transfer in natural or down-regu-

- lated hormonally controlled cycles: a retrospective study *Fertility and Sterility* 85,603-609.
- 13-Germond M, Nocera D, Senn A, Rink K, Delacretaz G, Fakan S 1995 Microdissection of mouse and human zona pellucida using a 1.48-microns diode laser beam: efficacy and safety of the procedure *Fertility and Sterility* 64,604-611.
- 14-Germond M, Primi MP, Senn A, Rink K, Descloux L, Delacretaz G 2000 Diode laser for assisted hatching. In Wyss P, Tadir Y, Tromberg BJ, and Haller U *Photomedicine in Gynecology and Reproduction*, pp 352-365.
- 15- Lai AC, Lin BP, Chang CC, Tsai HD, Hwang VW, Lo HY 1996 Pregnancies after transfer of ultrarapid frozen human embryos *Human Reproduction* 13,625-628.
- 16- Mantoudis E, Podsiadly BT, Gorgy A, Venkat G, Craft IL 2001 A comparison between quarter, partial and total laser assisted hatching in selected infertility patients. *Human Reproduction* 16,2182-2186.
- 17-Mauri AL, Petersen CG, Baruffi RLR, Ferreira RC, Franco Jr JG 2001 Comparison of the cryopreservation of human embryos obtained after intracytoplasmic sperm injection with slow cooling or ultrarapid cooling procedure. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 18,257-261.
- 18-Muasher SJ, Kruihoff C, Simonetti S, Oehninger S, Acosta AA, Jones GS 1991 Controlled preparation of the endometrium with exogenous steroids for the transfer of frozen-thawed pre-embryos in patients with anovulatory or irregular cycles *Human Reproduction* 6,443-445.
- 19-Nagy ZP, Oliveira SA, Abdelmassih V, Abdelmassih R 2002 Novel use of laser to assisted ICSI for patients with fragile oocytes: a case report. *Reproductive BioMedicine Online* 4,27-31.
- 20-Ng EHY, Naveed F, Lau EYLL, Yeung WSB, Cahn CCW, Tang OS, Ho C 2005 A Randomized double-blind controlled study of the efficacy of laser-assisted hatching on implantation and pregnancy rates of frozen-thawed embryo transfer at the cleavage stage *Human Reproduction* 20,979-985.
- 21- Oliveira JBA, Baruffi RLR, Mauri AL, Petersen CG, Borges MC, Franco Jr JG 1997 Endometrial ultrasonography as predictor of pregnancy in an in-vitro fertilization programme after ovarian stimulation and gonadotrophin-releasing hormone and gonadotrophins. *Human Reproduction* 12,2515-2518.
- 22-Petersen CG, Mauri AL, Ferreira R, Baruffi RL, Franco Junior JG 2001 Embryo selection by the first cleavage parameter between 25 and 27 hours after ICSI. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 18,209-212.
- 23-Petersen CG, Mauri AL, Baruffi RL, Pontes A, Franco Jr 2002 Zona thinning with noncontact diode laser in ICSI embryos from women of advanced age. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 19,512-516.
- 24-Petersen CG, Mauri AL, Baruffi RL, Oliveira JBA, Massaro FC, Elder K, Franco Jr JG 2005 Implantation failures: success of assisted hatching with quarter-laser zona thinning *Reproductive BioMedicine Online* 10,224-229.
- 25-Primi MP, Senn A, Montag M, Van der Ven H, Mandelbaum J, Veiga A, Barri P, Germond M 2004 A European multicenter prospective randomized study to assess the use of assisted hatching with diode laser and the benefit of an immunosuppressive/antibiotic treatment in different patient populations. *Human Reproduction* 19, 2325-2333.
- 26-Rink K, Delacretaz G, Salathe RP, Senn A, Nocera D, Germond M, De Grandi P, Fakan S 1996 Non-contact micro-drilling of mouse zona pellucida with an objective-delivered 1.48 microns diode laser. *Laser Surg Med* 18,52-62.
- 27-Sathanantham M, Macnamee MC, Rainsbury P, Wick K, Brinsden P, Edwards RG 1991 Replacement of frozen-thawed embryos in artificial and natural cycles: a prospective semi-randomized study. *Human Reproduction* 6,685-687.
- 28-Schmidt CL, de Ziegler D, Gagliardi CL, Mellon RW, Taney FH, Kuhar MJ, Colo JM, Weiss G 1989 Transfer of cryo-preserved/thawed embryos: the natural cycle versus controlled preparation of the endometrium with gonadotropin-releasing hormone agonist and exogenous oestradiol and progesterone (GEEP) *Fertility and Sterility* 54,609-616.
- 29- Schalkoff ME, Oskowitz SP, Powers RD 1989 Ultrasonographic observation of human and mouse oocyte treated with cryopreservatives *Biology Reproduction* 40,379-393.
- 30-Svalander P, Forsberg AS, Jakobsson AH, Wikland M (1995) Factors of importance for the establishment of a successful program of intracytoplasmic sperm injection treatment for male infertility. *Fertility and Sterility* 63,828-837.
- 31-Tao J and Tamis R 1997 Application of assisted hatching for 2 day old frozen-thawed embryo transfer in poor prognosis population. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 14, 128-130.
- 32-Tucker MJ, Cohen J, Massey JB, Mayer MP, Wiker SR, Wright G 1991 Partial dissection of the zona pellucida of frozen-thawed human embryos may enhance blastocyst hatching, implantation and pregnancy *American Journal of Obstetric and Gynecology* 165,341-344.
- 33-Van der Elst, Van den Abbeel E, Vitrier S, Camus M, Devroy P, Van Steirghem AC 1997 Selective transfer of cryopreserved human embryos with further cleavage after thawing increases delivery and implantation rates. *Human Reproduction* 12,1513-1521.
- 34-Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche Ch, Standaert V, Bollen N, Roosendaal E, Vandervorst M, Shoyman R, Zech N 2003 Vitrification of human blastocyst with the Hemi-Straw carrier: application of assisted hatching after thawing *Human Reproduction* 18,1504-1511.
- 35-Veiga A, Sandalinas M, Benkhalifa M, Boada M, Carrera M, Santalo J, Barri PN, Menezo Y 1997 Laser blastocyst biopsy for preimplantation diagnosis in the human. *Zygote* 5,351-355.
- 36-Vicente C, Pickering SJ, Johnson MH 1990 The zona hardening effect of dimethylsulphoxide on mouse zona pellucida requires the presence of an oocyte and is associated with a reduction in the number of cortical granules present *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 17, 253-259.

Efeitos da Criopreservação sobre os Componentes do Estroma do Córtex Ovariano: Uma Análise Histológica.

The effects of Cryopreservation on the Stromal Components of the Ovarian Cortex: A Histological Analysis.

Adriana Bos-Mikich^{1*}; Marcelo O. Ferreira^{2,3}; Gerta N. Frantz²; Norma P. Oliveira²; Nilo Frantz².

¹ARU, Maternity Hospital, Foresterhill, Aberdeen, AB252ZL, Scotland, UK. Tel: 0044-1224552879; fax: 1224-551072; e-mail: ogy414@abdn.ac.uk

² Centro de Reproducao Humana Nilo Frantz, Porto Alegre, Brasil.

³ Gestare Centro de Reproducao Humana, Novo Hamburgo, Brasil.

ABSTRACT

The preservation of fertility in young women facing premature ovarian failure, particularly those with cancer, has augmented the interest in ovarian tissue cryopreservation. To evaluate the effects of one slow freezing and thawing protocol on the stromal components of the ovarian cortex, we performed specific histology staining techniques to collagen fibers and carbohydrates. Fresh and frozen-thawed sections of one bovine ovary were stained using Mallory's phosphomolybdic acid hematoxylin for collagen fibers, Schiff's periodic acid for carbohydrates and hematoxylin and eosin for control. The organization of collagen fibers, follicular basal membrane and chromatin condensation aspect of stromal cells nuclei were analysed after staining. In the frozen-thawed tissue, collagen fibers presented a disrupted thread-like pattern, leaving large spaces between them throughout the ovarian cortex, follicular basal membrane was detached from the surrounding stroma in 33.4% of follicles classified as "shrunken" and the nuclei of the stromal cell population were mostly pycnotic with condensed chromatin and irregular shape. Our results show that cryopreservation causes damages to stromal elements of the ovarian cortex which may impair follicular survival, growth and ovulation after transplantation.

Key-words: cryopreservation, ovarian stroma, histological staining

RESUMO

A preservação da fertilidade em mulheres jovens que correm o risco da menopausa precoce, particularmente aquelas com câncer tem aumentado o interesse na criopreservação de

tecido ovariano. Para avaliar os efeitos de um protocolo de congelamento lento e descongelamento sobre os componentes do córtex ovariano, nos realizamos colorações histológicas específicas para fibras colágenas e carbo-hidratos. Cortes histológicos de tecido fresco e congelado/descongelado de um ovário bovino foram corados pelas técnicas de hematoxilina acida de Mallory para as fibras colágenas, acido periódico de Schiff para carbo-hidratos e hematoxilina e eosina para controle. Foram analisados a organização das fibras colágenas, a membrana basal folicular e o estado de condensação da cromatina dos núcleos das células do estroma. No tecido congelado/descongelado as fibras colágenas apresentaram um aspecto filamentosso desorganizado deixando grandes espaços entre elas ao longo do córtex ovariano, a membrana basal folicular apresentou-se separada do restante do estroma em 33.4% dos folículos classificados como "colabados" e os núcleos das células do estroma apresentaram-se na maioria picnóticos com a cromatina condensada e formato irregular. Nossos resultados mostram que a criopreservação causa danos aos elementos do estroma do córtex ovariano os quais podem diminuir a sobrevivência e crescimento folicular e ovulação apos transplante.

INTRODUCTION

The recent surge of interest in ovarian tissue banking reflects the importance and the need of fertility conservation for many women facing premature ovarian failure, particularly those with cancer. Survival rates for cancers that occur in young girls and women of reproductive age have improved dramatically in the last years. However, the treatment is associated with long-term effects, as severe depletion of the follicular store and premature menopause (Wallace et al., 1989; Meiwor, 1999). Therefore, preservation of fertility in these women has become a relevant concern.

Several potential options are available to preserve the fertility of these patients (Meiwor, 1999). More recently, greater attention

Recebido em 16/05/2006
Avaliado e aceito em 01/09/2006

has been focused on the preservation of ovarian fragments or whole ovaries for future transplantation (Picton et al., 2000). Ovarian tissue cryopreservation is still an experimental procedure, which may be a feasible option to preserve fertility in prepubertal girls and women, which cannot wait to undergo ovarian stimulation. Several studies have reported the damage caused to the follicular population after cryopreservation of ovarian grafts (Cortvrindt et al., 1996; Nisolle et al., 2000; Demirci et al., 2002; Lucci et al., 2004; Gandolfi et al., 2006) and a second key ovarian component, the cortical stroma, has received little attention. However, follicular survival, growth and ovulation after transplantation will depend, among other factors, on the efficient re-establishment of angiogenesis by the stromal elements of the ovarian cortex (Dissen et al., 1994).

The ovarian cortex is the peripheral zona containing follicles in various stages of development embedded in a loose connective tissue. A thick connective tissue layer the tunica albuginea lies immediately beneath the surface epithelium. It is formed by well-organized dense collagen fibers, which become disrupted by the growth of ovarian follicles and corpus luteum (Dellmann & Eurell, 1998). Fibroblasts, which synthesize and export the collagen fibers into the extra cellular matrix and the fibers themselves, play a key role in ovulation. The ovarian stroma is also well endowed with angiogenic factors synthesized by the stromal cells under gonadotrophic control (Dissen et al., 1994). It has been reported that more primordial follicles die of ischemia than of freezing injury after cryopreservation (Falconi et al., 2004), possibly due to an impaired or deficient angiogenesis caused by degeneration of stromal elements.

Basal laminas are important sheets of specialized extracellular matrix containing high quantities of glycoproteins, which form part of the reticular fibers that underlie and surround groups of cells, such as epithelia or endothelia, enabling these cells to orientate their basal/apical polarity and creating a microenvironment for them. Ovarian follicles are surrounded by a basal membrane from the early stages of primary follicle to the pre-ovulatory antral stage. Following ovulation the follicular basal lamina is degraded, but it may also participate on corpus luteum formation (Irving-Rodgers et al., 2004).

The objective of the present study was to evaluate by means of specific histological staining methods the alterations induced by cryopreservation in stromal components of the ovarian cortex, particularly the collagen fibers, the follicular basal membrane and stromal cells.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of ovarian tissue

One bovine ovary (2-4 years old female) showing different stages of follicular development and a corpus luteum was obtained from an abattoir 30 minutes after slaughtering and transported in saline solution at 4°C to the laboratory within 3 hours.

Initially, the whole ovary was split into two halves and most of the underlying medulla of each half-ovary was removed leaving a 3mm-thick cortex. Each half was processed into thin sheets of 2mm, which were then cut into small sections of 10mm. Fresh fragments were fixed immediately after trimming in Bouin's fixative and were used as controls. The remaining pieces of tissue were frozen.

Freezing

The freezing protocol was similar to that described by Lucci and colleagues (2004) for cryopreservation of bovine ovarian tissue. The cryoprotectant solution consisted of 1.5 M propanediol (PROH) (Sigma Chemical, St. Louis MO, USA)

prepared in Medium 199 (supplemented with HEPES and Hank's salts; Cultilab, Campinas, SP, Brazil) containing 0.1M sucrose (S-188, Sigma Chemical, St. Louis MO, USA) and 0.4% bovine serum albumine (BSA, Sigma Chemical, St. Louis MO, USA).

Ovarian cortex pieces were placed into 1.2ml cryogenic vials (Corning) containing 1ml of the cryoprotectant solution. Each vial received one piece of tissue. Vials were equilibrated at 20°C for 20 minutes and then cooled from 20°C to -7°C at 1°C/minute and held at this temperature for 10 minutes. At this point vials were manually seeded and then cooled at 0.3°C/minute to -30°C. The vials were plunged into liquid nitrogen at -196°C and stored for three weeks before thawing.

Thawing

Vials were warmed in air at room temperature (approximately 25°C) for 30 seconds and then immersed in water at 38°C until the ice melted. Tissues were removed from the vials and washed three times (5 minutes each), twice in M 199+ containing decreasing concentrations of the cryoprotectant (0.75M and 0.375M) and sucrose (0.1M) and once in pure M199+.

Histological procedures

After thawing fragments were fixed in Bouin's fixative for histology. Three different frozen/thawed tissue fragments and one fresh control were sectioned at 6 µm thickness.

Histological stainings

Mallory's phosphomolybdic acid hematoxylin

Collagen fibers were stained by Mallory's phosphomolybdic acid hematoxylin (Mallory, 1942). Briefly, sections were deparaffinized in an alcohol gradient and exposed to Zenker's fluid for 20 minutes. After removal of the mercury precipitate by placing in alcoholic iodine solution for 5 minutes slides were cleared of iodine in 5% sodium thiosulfate (Merk, Germany) solution for further 5 minutes. After washing in tap water, slides were stained in phosphomolybdic acid hematoxylin for 3 hours at room temperature. Washing in tap water terminated the reaction. Slides were differentiated in alcohol 95% and dehydrated with 2 changes in alcohol 95%, and alcohol 100% and finally cleared with 2-3 changes of xylene before mounted in balsam of Canada (Reagen, São Paulo, Brasil). Analysis was made under an Olympus light microscope.

Periodic Acid Schiff Reaction

Follicular basal membrane was stained by the Periodic Acid-Schiff (PAS) reaction (MacManus, 1948) for carbohydrates. In brief, slides were exposed to the periodic acid solution (Merk, Germany) for 5 minutes and washed in distilled water. Slides were placed in Schiff's leuco-fuchsin for 15 minutes, washed in tap water for 10 minutes and counterstained in Mayer's hematoxylin for 5 minutes. Primordial, primary and pre-antral follicles were classified as "normal" or "shrunken" when they have a round or collapsed shape, respectively. The alterations on stromal components were described without any quantitative analysis as our aim was to detect elements of the cortical stroma using specific staining techniques. No description of the follicles themselves and the oocytes within them was made as that was part of another study.

RESULTS

The Mallory's staining revealed bluish-gray collagen fibers with a thread-like organization leaving large spaces between them on the cortical surface of the frozen-thawed ovarian tissue. Overall, the cortical layer beneath the surface and the tunica albuginea looked vacuolated and disorganized compared with

fresh controls. Collagen fibers presented a similar pattern in different sections of the three cryopreserved fragments analyzed.

Follicular basal membrane stained bright pink in all follicles from primordial to growing and antral ones. Only primordial, primary and secondary follicles were analyzed. When the follicular structure was not round, what we called "shrunken follicles", PAS staining revealed a detachment of the basal membrane together with the follicular cells, from the surrounding stroma. This finding was clearly observed in 33.4% (34/101) shrunken follicles analyzed in frozen-thawed tissues. Similar follicular abnormality was observed in 6.6% (7/105) of the follicles in the fresh samples.

The nuclear morphology of stromal cells in fresh and cryopreserved tissues was analyzed after hematoxylin-eosin staining. Frozen-thawed ovarian samples presented elongated and pycnotic nuclei beneath the cortical surface. Control tissues presented elliptical-shaped nuclei, typical of fibroblasts with dispersed chromatin along the ovarian cortex .

DISCUSSION

The present study describes histological alterations on the ovarian cortex after cryopreservation. Our objective was to analyse stromal components of the ovarian cortex using specific staining techniques to evaluate the effects of one cryopreservation method, namely, the slow freezing/ rapid thawing in 1,2 propanediol. Mallory's stain demonstrated that the slow freezing and thawing protocol used causes profound alterations on collagen fibers, which become thin, thread-like and apart from each other. The nuclei of fibroblasts among the collagen fibers showed a more pycnotic staining pattern than controls, indicative of cell damage, possibly cell death. Follicle basal membranes were detached from the surrounding stroma, together with the granulosa cells in follicles that were considered damaged in the frozen/thawed samples.

It would be interesting to know whether a culture period after thawing and before transplantation would have a positive effect specifically on collagen fibers and stromal cells allowing them to recover and to return to their original shape and organization. However, a recent work involving ovarian tissue culture after cryopreservation (Kim et al., 2004) reported that the apoptotic rate of stromal cells was higher in frozen/thawed ovarian tissue compared with the fresh group after different incubation periods, indicating that cryopreservation may have caused irreversible injury to the ovarian cortex leading to cell death.

A previous study described the histological findings on human ovarian cortex after cryopreservation in 1,2 propanediol under various conditions (Gook et al., 1999). The authors assessed ovarian sections by light and electron microscopy and performed a detailed description of the observed follicular and oocyte abnormalities using one standard staining method with methylene blue. No mention was made on the collagen fibers organization although the pictures presented in the article show clear differences in their structure very similar to our data after freezing and thawing .

Collagen fibers form part of the loose connective tissue and the tunica albuginea of the ovarian cortex and play a fundamental role during follicle growth and ovulation (Dellman & Eurell, 1998). The extracellular matrix of connective tissue participates in a multitude of cell functions, including morphogenesis, survival, migration, proliferation, communication, metabolism and response to external stimuli. More important, recent reports based on histological and immunohistochemical findings suggest that components for new human primordial follicles, follicular cells and germ cells, differentiate sequentially

and de novo from mesenchymal progenitor cells residing in the stroma of the ovarian tunica albuginea (Bukovsky et al, 2004; 2005). If these findings appear really true, the preservation of ovarian stromal components during cryopreservation is of fundamental importance to compensate for the follicular loss of a significant portion of the follicular pool after freezing and thawing and may ensure a longer reproductive lifespan than currently observed after transplantation of frozen/thawed ovarian fragments.

Damaged follicles and oocytes are the more common abnormality described in histological studies on the effects of cryopreservation in ovarian tissues. The present study focused on the follicular basal membrane and demonstrated by specific glycoprotein staining that part of the observed follicular abnormalities observed involves the basal membrane and may represent an irreversible damage to the follicular structure. Detachment of the follicular basal membrane from the surrounding stroma was also observed in 6.6% of the follicles in fresh samples. This observation suggests that this abnormality may not only be caused by the freezing/thawing procedure. However, this type of follicular damage was far more frequent in the cryopreserved samples indicating possibly an increased fragility of the tissue after cryopreservation. Considering the role that the basal membrane may play on the endothelial-mesenchymal transition of granulosa cells into luteal cells (Irving-Rodgers et al., 2004) the maintenance of its correct position and attachment to both granulosa and stromal cells is fundamental for subsequent ovarian function.

Antioxidant treatments have been proposed to improve follicular survival in fresh (Bukovsky et al, 2004) and frozen (Kim et al., 2004) ovarian grafts. Ascorbic acid, a cofactor for several hydroxylase enzymes and involved in collagen synthesis was efficient in decreasing apoptosis detected by TUNEL staining on stromal cells of fresh and frozen/thawed ovarian specimens incubated for 24 hours (Kim et al., 2004). We did not use a specific cell death staining technique, but the pycnotic nuclei observed among the altered collagen fibers may well represent dead fibroblasts observed immediately after thawing. Actually, the picture presented by Kim et al., (2004) in their study on apoptosis in frozen/thawed ovarian tissue shows a very similar pattern of cortical stroma to the one we observed in the present work after specific staining for the collagen elements. Considering that collagen fibers and angiogenic factors responsible for the neovascularization of the ovarian grafts are synthesized by fibroblasts, the preservation of their integrity is of paramount importance while developing new cryotechnologies for the human ovary.

In conclusion, our results show that stromal components are profoundly damaged by the slow freezing/thawing procedure here employed, which may impair follicular survival and ovarian function after transplantation. Our findings extend the knowledge on the effects of cryopreservation on ovarian tissue.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Prof Dr Matilde Achaval for allowing access to the Histology Laboratories of the Department of Morphological Sciences of the University of Rio Grande do Sul and for her expert advise. We are also thankful to Mrs. Eudira Luz da Silva for her technical support.

REFERENCES

- Bukovsky A., Caudle M.R., Svetlikova M., Upadhyaya N.B.
- Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol* 2: 20, 2004.

- Bukovsky A., Sletlikova M., Caudle M.R. - Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3: 17-29, 2005.
- Cortvrindt R., Smitz J., Steirteghen A.C. Van – A morphological and functional study of the effect of slow freezing followed by complete in vitro maturation of mouse ovarian follicles. *Hum Reprod* 11: 2648-2655, 1996.
- Dellmann D., Eurell J -Female Reproductive System. In: Williams & Wilkins Text Book of Veterinary Histology p 345-367, 1998.
- Demirci B., Sale B., Frappart L., Franck M., Guerin J.F., Lomage J.- Morphological alterations and DNA fragmentation in oocytes from primordial and primary follicles after freezing-thawing of ovarian cortex in sheep. *Fertil Steril* 77: 595-600, 2002.
- Dissen G.A., Lara H.E., Fahrenbach W.H., Costa M.E., Ojeda S.R. - Immature rat ovaries become revascularized rapidly after autotransplantation and show a gonadotropin-dependent increase in angiogenic factor gene expression. *Endocrinology* 134:1146-1154, 1994.
- Falcone T., Marjan Attaran M., Bedaiwy, M., Goldberg J.- Ovarian function preservation in the cancer patient. *Fertil Steril* 81: 43-57, 2004.
- Gandolfi F., Paffoni A., Brambilla E.P., Bonetti S., Pharm T.A.L.B.D., Ragni G. Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. *Fertil Steril* 85: 1150-1156, 2006.
- Gook D.A., Edgar D.H., Stern C - Effect of cooling rate and dehydration regimen on the histological appearance of human ovarian cortex following cryopreservation in 1,2-propanediol. *Hum. Reprod.* 14: 2061-2068, 1999.
- Irving-Rodgers H.F., Harland M.L., Rodgers R.J. - A novel basal lamina matrix of the stratified epithelium of the ovarian follicle. *Matrix Biol.* 23: 207-217, 2004.
- Kim S.S., Yang W., Kang H.G., Lee H.H., Lee H.C., Ko D.S., Gosden R.G.- Quantitative assessment of ischemic tissue damage in ovarian cortical tissue with or without antioxidant (ascorbic acid) treatment. *Fertil Steril* 82: 679-685, 2004.
- Lucci C.M., Kacinskis M.A., Lopes L.H., Rumpf R., Bao S.N. - Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. *Theriogenology* 61: 1101-1114, 2004.
- MacManus J.F.-Periodic acid Schiff's reaction for carbohydrates. *Stain Technology*, 23: 99,1948.
- Mallory F.B. In: Pathological Techniques, W.B. Saunders Co, Philadelphia, p47,1942.
- Meirow D. Ovarian injury and modern options to preserve fertility on female cancer patients treated with high dose radio-chemoterapy for hemato-oncological neoplasias and other cancers. *Leuk Lymphoma* 33:65-76, 1999.
- Nisolle M., Casanas-Roux F., Jianping Q., Motta P., Donnez J Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen thawed human ovarian xenografts in nude mice. *Fertil Steril* 74: 122-129, 2000.
- Picton H.M., Kim S.S., Gosden R.G.- Cryopreservation of gonadal tissue. *Br Med Bull* 56: 603-615, 2000.
- Wallace W.H.B., Shalet S.M., Hendry J.H. Ovarian failure following ovarian irradiation in childhood. The radiosensitivity of human oocyte. *Br Radiol* 62: 995-998, 1989.

“Não recebo a revista.”

Você é sócio?
Seu pagamento está em dia?
Seu endereço mudou?

Se há dúvidas, consulte o seu cadastro e fale conosco

www.sbra.com.br

Expressão Gênica durante o Desenvolvimento Embrionário Pré-implantação

Gene Expression during Preimplantation Embryo Development

**Elielton R. Coelho, Marcello Valle;
Marcos Sampaio; Selmo Geber**

Endereço para correspondência:
Origen Centro de Medicina Reprodutiva
Rua das Laranjeiras – 445 – Laranjeiras - RJ
Contato: elielton@predialnet.com.br

INTRODUÇÃO

Os genes têm papel fundamental na coordenação homeostática, metabólica e fisiológica dos organismos durante toda a vida. Até mesmo nas fases mais iniciais do desenvolvimento embrionário, a ativação ou repressão de determinados genes é crucial para o perfeito funcionamento celular. No que se refere à fase pré-implantação, o controle preciso da atividade gênica é particularmente importante, uma vez que durante este período o embrião deixa de ser dependente de RNAs provenientes do óvulo e passa a utilizar seu próprio genoma. Além disso, durante o desenvolvimento pré-implantação ocorrem os primeiros passos na diferenciação celular, que guiarão o desenvolvimento de variados tecidos e tipos celulares presentes no organismo.

Mas como é que um óvulo fertilizado se desenvolve em centenas de tipos celulares diferentes? Como se dá o processo de especialização celular iniciado ainda nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário? Que genes estão envolvidos neste processo de especialização celular e na formação de embriões de boa qualidade?

Questões como essas envolvem diversas áreas de pesquisa e têm sido alvo de enorme volume de trabalhos científicos. Além de permitir o entendimento de um passo crítico no desenvolvimento embrionário, a busca por estas respostas também está relacionada a um tema de primeira ordem nas discussões científicas e médicas dos últimos anos: as células-tronco embrionárias.

Para entender como uma célula se especializa em exercer determinada função é necessário entender qual foi a programação genética desencadeada nesta célula durante sua formação, ou seja, que genes foram expressos, em que momento e em que intensidade. Se, no futuro, conseguirmos entender a atividade gênica durante os passos iniciais do desenvolvimento embrionário, será possível entender como se

formam as células-tronco embrionárias, e a partir daí, entender como se dá sua diferenciação em outros tipos celulares. Além das vantagens evidentes que este conhecimento trará à medicina de forma geral, enormes avanços também poderão ser desencadeados na medicina reprodutiva, aumentando a qualidade dos embriões produzidos, e conseqüentemente melhorando as taxas de sucesso nos ciclos de reprodução assistida. Tudo isso poderá ser possível através da manipulação genética das células.

Nos últimos anos, grande parte da informação contida em nosso DNA tem sido decifrada, sobretudo graças ao Projeto Genoma Humano. Dados sobre quantos e quais são os nossos genes, e principalmente, como e quando eles são utilizados pelas células podem ajudar a compreender uma série de distúrbios que atualmente permanecem obscuros e que são ainda hoje um importante problema de saúde no mundo. A etapa mais difícil deste processo é justamente a análise da função e do controle da atividade de cada gene, que geralmente demanda diversos experimentos práticos e que pode levar anos de pesquisa até ser elucidada. Além disso, este processo torna-se ainda mais complicado quando se considera que o produto da maioria de nossos genes apresenta mais de uma função e pode atuar em conjunto com diversos outros, formando assim uma intrincada rede de interações que dificulta seu perfeito entendimento.

No que diz respeito às técnicas utilizadas no estudo da expressão gênica embrionária, recentes avanços têm permitido análises cada vez mais refinadas do material genético extraído de pequena quantidade de células. Metodologias como a construção de bibliotecas de cDNA representativas de diferentes fases do desenvolvimento embrionário pré-implantação, análise por microarray, PCR em tempo real, entre outras, aliadas a modernas ferramentas de bioinformática, têm proporcionado a disponibilização de uma enorme quantidade de dados na literatura científica. Robson (2004) descreve algumas das técnicas mais modernas utilizadas no estudo do transcriptoma embrionário (conjunto de transcritos – RNAs – presentes no embrião).

Recebido em 27/12/2005
Avaliado e aceito em 28/02/2006

Neste artigo, nosso objetivo é descrever os dados disponíveis na literatura acerca da caracterização e análise da modulação da expressão gênica no embrião humano pré-implantação. Serão enfatizados os trabalhos descrevendo genes envolvidos em processos marcantes do desenvolvimento embrionário inicial, como as primeiras divisões mitóticas, a compactação do embrião, a diferenciação celular e formação do blastocisto, bem como os genes conhecidamente importantes para a manutenção celular, como fatores de transcrição, genes de resposta ao estresse e genes envolvidos no metabolismo energético. Serão também citados alguns genes cuja função ainda não é muito clara, mas demonstraram ser importantes para o desenvolvimento embrionário e, finalmente, serão considerados os efeitos nocivos do desenvolvimento embrionário *in vitro* sobre o controle da expressão gênica.

Palavras-chave: expressão, genes, regulação, embrião, pré-implantação

FUNCIONAMENTO DOS GENES: UMA VISÃO GERAL

Em primeiro lugar, é fundamental compreendermos o que se entende por expressão gênica, ou seja, de que maneira as células controlam e utilizam as informações presentes no DNA. O estudo da expressão gênica envolve a análise de regiões do DNA – genes – que são ativadas, em geral para a produção de proteínas, em tecidos e em momentos específicos, bem como os mecanismos que regulam esta ativação. Neste tópico serão descritas, sucintamente, as principais etapas envolvidas no fluxo da informação gênica e a maneira como ele pode ser modulado.

De maneira geral, a informação genética presente no DNA deve ser processada – ou decodificada – até que as proteínas, produtos finais de grande parte de nossos genes, sejam produzidas. Os dois principais processos envolvidos nesta decodificação da informação genética são a transcrição, durante o qual diferentes RNAs são produzidos a partir do DNA, e a tradução, onde as informações presentes nos RNAs mensageiros são utilizadas para guiar a síntese de (Alberts *et al.*, 2004).

Em qualquer momento ao longo desta via, as células podem alterar o fluxo das informações, definindo que genes serão transcritos em determinado momento, modificando ou mesmo interrompendo a transcrição, produzindo diferentes RNAs a partir do mesmo gene, controlando a meia-vida destes RNAs no citoplasma, a intensidade com que serão traduzidos ou determinando alterações nas proteínas recém-sintetizadas. Desta forma, é possível controlar quais genes serão expressos em determinado momento e consequentemente quais proteínas serão produzidas, e por quanto tempo elas estarão disponíveis dentro das células. Essa enorme capacidade de modulação na expressão gênica permite que células que contenham exatamente o mesmo DNA se tornem extremamente diferentes, através da utilização de conjuntos de genes diferentes, em períodos diferentes.

Diversas são as estruturas envolvidas neste controle da expressão gênica, e podem estar relacionadas à estrutura da cromatina (regiões do DNA mais empacotadas são mais dificilmente transcritas) ou a seqüências presentes no próprio DNA, como os promotores de transcrição, operadores, repressores e *enhancers*, ou outras moléculas, sobretudo proteínas, que atuam como fatores de transcrição, iniciadores, diferentes RNA polimerases, ribossomos, e muitas outras (Alberts *et al.*, 2004).

Estimativas realizadas a partir do Projeto Genoma Humano mostram que nosso DNA encerra algumas dezenas de milhares de genes (<http://www.ornl.gov/sci/techresources/>

[Human_Genome/faq/genenumber.shtml](http://www.ornl.gov/sci/techresources/)). É a combinação variada destes genes durante diferentes fases do desenvolvimento que permite a formação de nossos mais de 200 tipos celulares diferentes. O início deste processo de diferenciação e especialização celular ocorre ainda na fase embrionária pré-implantação. Algumas informações a respeito da expressão gênica e sobrevivência embrionária durante esta fase foram reunidas em Levy (2001).

Primeiro ciclo celular - A mãe como provedora

Após a fertilização e até o fim da primeira divisão mitótica, toda a biossíntese de proteínas do embrião independe da transcrição gênica, pois todos os RNAs, ribossomos e demais fatores necessários ao processo de tradução neste período são provenientes do oócito, e desta forma têm origem exclusivamente materna. A ativação do genoma embrionário, chamado de “transição maternal-zigótica” (MZT), varia entre diferentes espécies, e só ocorre, em humanos, no estágio de 4 a 8 células.

Até este momento, a atividade gênica nos pró-núcleos permanece bastante reduzida, sobretudo no feminino. Foi mostrado que a transcrição gênica no pró-núcleo masculino é cerca de 5 vezes maior do que no pró-núcleo feminino. Esta diferença se deve, provavelmente, a diferenças na estrutura da cromatina, uma vez que durante este período ocorre no pró-núcleo paterno a troca de protaminas por histonas (proteínas envolvidas no envelhecimento do DNA), o que não ocorre no pró-núcleo materno. Isso permite um afrouxamento temporário do DNA paterno, o que facilita o acesso das proteínas responsáveis pela transcrição. Foi demonstrado também que a ativação de genes do cromossomo Y ocorre nas fases iniciais do desenvolvimento pré-implantação e sugere-se que a atividade gênica no pró-núcleo masculino seja fundamental para a formação do nucléolo após a fusão dos pró-núcleos (Tesarik, 2005). Alguns autores argumentam ainda sobre o papel de RNAs do espermatozóide no desenvolvimento embrionário inicial. Além disso, o cálcio proveniente do espermatozóide é um dos fatores responsáveis pela ativação do genoma embrionário. Uma boa revisão sobre a influência paterna no desenvolvimento do embrião no período pré-implantação pode ser encontrada em Tesarik (2005).

Em termos de alterações no padrão de expressão gênica, a MZT marca alguns pontos fundamentais. O primeiro deles é a destruição de RNAs oócito-específicos, que em geral se inicia ainda durante a maturação folicular. A destruição destes transcritos e das respectivas proteínas restringe seu período de atuação. Um exemplo é a proteína MSY2 (e o correspondente mRNA), que figura dentre as mais abundantes no oócito, mas já não é detectada em embriões de 2 células.

Um segundo ponto fundamental da MZT diz respeito à substituição dos transcritos envolvidos em processos básicos de manutenção celular, como a actina. Os mRNAs de actina de origem materna são degradados em mais de 90% até o estágio embrionário de 2 células, entretanto, como esta é uma proteína fundamental para a sobrevivência celular, a degradação dos RNAs maternos é concomitante à produção de novos RNAs provenientes do genoma embrionário.

O terceiro ponto é a extensa reprogramação do padrão de expressão gênica, através da ativação de genes que não são expressos no oócito. Todo este processo é coordenado, sobretudo, por remodelamento da cromatina, embora os fatores de transcrição maternos também sejam fundamentais.

Foi demonstrado que inibidores da RNA polimerase II – responsável pela transcrição de RNAs mensageiros – interrompem as divisões mitóticas no embrião, mesmo na presença de transcritos e proteínas maternas. Esta observação demonstra que o correto

prosseguimento da clivagem é dependente de transcrição no genoma embrionário. Por outro lado, alguns trabalhos já demonstraram que durante as primeiras divisões mitóticas, mesmo que alguns genes estejam sendo transcritos, somente os RNAs maternos são traduzidos. Em Schultz (2002) há uma extensa revisão sobre a expressão gênica anterior à ativação do genoma embrionário, sobretudo em embriões de apenas 1 célula.

Também foi analisada a influência das proteínas leptina e STAT3 de oócitos de camundongos e humanos sobre o desenvolvimento embrionário inicial e a distribuição destas proteínas nas fases de mórula e blastocisto. A leptina tem papel fundamental no metabolismo e deposição de lipídeos, e STAT3 é membro de uma família de transdutores de sinais e ativadores de transcrição. Foi mostrado que estas proteínas se encontram polarizadas no oócito, e apresentam uma distribuição desigual nos blastômeros durante a fase de mórula, num padrão que se mantém nas etapas seguintes. Os autores sugerem que a distribuição destas proteínas no óvulo influencia sua expressão e distribuição nos blastômeros, e desta forma estaria envolvida na formação dos eixos / polaridade do embrião.

Ativação do genoma embrionário: criando identidade própria

No que diz respeito à ativação inicial do genoma embrionário, um dos principais questionamentos diz respeito a quais são os primeiros genes transcritos. Zeng & Schultz (2005) realizaram a análise de RNAs produzidos em embriões de camundongos de 2 células, estágio em que nesta espécie ocorre a MZT. Estes autores demonstraram que genes envolvidos na transcrição e metabolismo de RNAs, biossíntese e montagem de ribossomos e síntese de proteínas representam grande maioria entre aqueles identificados. Estes resultados sugerem que a ativação inicial do genoma embrionário se relacione principalmente à substituição de moléculas de origem materna por outras que possam sustentar o fluxo de informações gênicas a partir de então. De uma forma mais simples, esta ativação gênica inicial prepararia os blastômeros para controlar a expressão dos próprios genes (Zeng & Schultz, 2005) nas etapas seguintes.

De acordo com outra linha de pensamento, dois principais pontos de alteração no padrão de expressão gênica ocorrem durante o desenvolvimento embrionário pré-implantação em camundongos. A transição de óvulo fertilizado para embrião de 2 células seria o primeiro destes momentos, e corresponde à ativação do genoma embrionário (ZGA – *zygotic genome activation*). A passagem de 4 para 8 células seria o segundo momento, e marca a passagem para as fases de mórula / blastocisto. Esta mudança no padrão de expressão gênica no estágio entre 4 e 8 células seria uma preparação para as enormes alterações morfológicas dos estágios seguintes, e conseqüentemente, para a diferenciação celular inicial. Através da análise de mais de 20.000 seqüências foram identificados genes expressos em cada fase do desenvolvimento embrionário pré-implantação, desde o óvulo fecundado até o blastocisto. Estes resultados apontaram cerca de 3.500 genes cuja expressão é aumentada durante a ZGA. Alguns deles, como Gata6 (membro de uma importante família de fatores de transcrição) e Rab1 (envolvido em tráfego intracelular) mantêm sua expressão em níveis constantes nos períodos subseqüentes. Outros, como gdf3 (um fator de crescimento / diferenciação celular, freqüentemente alterado em teratocarcinomas) e L-myc (um proto-oncogene envolvido em proliferação / diferenciação celular), têm seu pico de expressão nas fases de 2 e 4 células, e depois declinam. Entretanto, a maioria dos genes analisados não tem função conhecida, tornando difícil uma discussão acerca do papel de sua ativação no desen-

volvimento embrionário. De forma geral, genes relacionados com ribossomos, complexos ribonucleoprotéicos, transporte de íons, metabolismo de ATP, ligação a RNA e proteossomas demonstraram um aumento contínuo na expressão durante todo o período pré-implantação.

Uma meta-análise da expressão gênica em embriões de camundongos através do estudo de bibliotecas de cDNA, desde o óvulo fertilizado até a fase de blastocisto, permitiu a identificação de mais de 11.000 genes expressos durante o desenvolvimento pré-implantação, dos quais mais de 1.500 não são expressos em qualquer outro tipo celular. Os autores não se prendem à descrição dos genes analisados, mas apresentam em uma tabela os dados referentes à abundância de transcritos provenientes de vários destes genes em cada etapa do desenvolvimento embrionário. Desta forma, através deste trabalho é possível avaliar a variação da expressão destes genes ao longo do desenvolvimento pré-implantação.

Genes envolvidos no controle do ciclo celular

As MAP quinases (MAPK - *mitogen-activated protein kinases*) representam uma família de proteínas que regulam o ciclo celular através da fosforilação / ativação de outras proteínas. Uma vez que cascatas de sinalização mitogênicas são deflagradas, as MAPK são translocadas do citoplasma para o núcleo e passam a regular a ligação de fatores de transcrição ao DNA. A superfamília gênica MAPK compreende pelo menos três subgrupos envolvidos em cascatas de sinalização celular: as quinases c-Jun (ou quinases ativadas por estresse), as quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK – *extracellularly-regulated kinases*) e os grupos p38 e p45 de MAP quinases.

Natale *et al.* (2004) demonstraram que membros da família MAPK p38 são expressos durante todo o desenvolvimento pré-implantação, e que a inibição de p38 causa o bloqueio do desenvolvimento embrionário, sobretudo devido à regulação da formação de filamentos de actina no estágio de 8 células. Sabe-se que p38 α e β regulam um grupo de proteínas designadas PRAP ou MK5, que por sua vez ativam a proteína HSP27 (do grupo das chamadas proteínas de choque térmico), que finalmente regula a formação de filamentos de actina. Desta forma, p38 seria um dos ativadores iniciais de uma importante cascata envolvida na compactação e no desenvolvimento do embrião pré-implantação.

Diversos trabalhos analisaram a expressão de genes envolvidos no processo de apoptose – ou morte celular programada – por embriões no período pré-implantação, e sua correlação com o bloqueio no desenvolvimento de alguns destes embriões. A análise da expressão de um gene mitocondrial que codifica uma proteína chamada Smac/DIABLO, mostrou que durante a apoptose ela é liberada para o citoplasma e bloqueia a atividade de proteínas anti-apoptóticas. Isso permite a ativação de proteínas como as caspases, características do processo de apoptose. Tanto o mRNA de Smac/DIABLO quanto a própria proteína foram detectados em oócitos e embriões pré-implantação de camundongos. Entretanto, a liberação de Smac/DIABLO para o citoplasma foi observada em embriões que se tornaram naturalmente fragmentados e naqueles em que a apoptose foi induzida. Estes resultados sugerem que esta proteína está envolvida na fragmentação e bloqueio do desenvolvimento de embriões pré-implantação.

A expressão de outros genes relacionados à manutenção do ciclo celular e à apoptose, como BRCA1 E 2, ATM, TP53, RB1, MAD2, BUB1, APC e β -actina, foi analisada em embriões pré-implantação. Em geral, estes genes são responsáveis por manter a integridade do DNA e o correto prosseguimento do ciclo celular e, quando mutados, são responsáveis por grande parte dos cânceres humanos. Alguns autores defendem a idéia de que a proporção de genes anti- e pró-apoptóticos expressos

é responsável pela regulação do desenvolvimento embrionário. De forma geral, mRNAs correspondentes a estes genes foram observados em oócitos não fertilizados e intensamente degradados após a fertilização. Após o estágio de 4 a 8 células estes transcritos voltaram a ser produzidos, em concordância com a ativação do genoma mitocondrial, e a maioria deles teve seu pico de expressão apenas no estágio de blastocisto. Sugere-se que a rápida proliferação celular durante a fase de clivagem propicie a ocorrência de lesões no DNA, e a expressão destes genes nesta fase garantiria a manutenção de sua integridade. Jurisicova & Acton (2004) apresentam uma extensa revisão sobre o papel de genes relacionados a apoptose no desenvolvimento de embriões humanos pré-implantação.

Efeitos do cultivo *in vitro* sobre a impressão genômica

Da mesma forma que a ativação de determinados genes é fundamental para o perfeito desenvolvimento celular, a inativação de determinadas regiões do DNA também é uma importante forma de controle da expressão dos genes presentes nestas regiões. Neste sentido, alterações epigenéticas, ou seja, causadas por fatores não-genéticos, podem afetar o correto funcionamento do DNA, sobretudo no que diz respeito ao *imprinting* genômico (ou impressão genômica), um fenômeno genético que determina se um gene específico será expresso ou não de acordo com sua origem parental. Desta forma, a regulação de vários genes presentes no genoma passa pela inativação de seu alelo materno ou paterno através deste processo. O processo de impressão genômica é regulado através do padrão de metilação do DNA, associado à organização das histonas. Durante a fertilização, o DNA do espermatozoide é demetilado e suas protaminas (proteínas responsáveis pela condensação de seu DNA) são substituídas por histonas. Posteriormente, durante o desenvolvimento embrionário pré-implantação, ocorre uma completa reorganização no padrão de metilação e na organização das histonas no genoma embrionário, originando o padrão de impressão (*imprinting*) necessário ao perfeito desenvolvimento do indivíduo.

Resultados semelhantes obtidos em camundongos, bovinos e humanos demonstraram que alterações epigenéticas no padrão de impressão genômica dos embriões resulta em crescimento fetal aberrante, além de outros efeitos de longo prazo no desenvolvimento e comportamento dos indivíduos. Muitas evidências mostram que o cultivo de embriões *in vitro* é um dos fatores que altera o padrão de impressão genômica e desta forma pode causar alterações fenotípicas a curto e longo prazo. Muitos trabalhos têm demonstrado que embriões cultivados em meios suplementados com soro apresentam expressão anormal de genes “impressos” (*imprinted*). Uma extensa revisão a respeito dos efeitos epigenéticos do cultivo de embriões *in vitro* pode ser encontrada Morgan *et al.* (2005).

Regulação molecular da formação de blastocistos

Foi analisada a expressão de GnRH e receptores de GnRH em embriões humanos pré-implantação. A presença de GnRH já foi demonstrada em diferentes espécies, e acredita-se que também em embriões humanos ele apresente um importante papel no desenvolvimento e na implantação. O que ficou demonstrado é que tanto os mRNAs quanto as proteínas correspondentes a estes genes são detectados em todos os blastômeros até a fase de mórula, e também nas células do trofoectoderma e na massa celular interna. Entretanto, pode-se argumentar que estes dados podem não ser representativos de condições normais, uma vez que os embriões analisados neste estudo derivavam de poliesper-

mia, apresentando 3 pró-núcleos. Alguns autores defendem a hipótese de que exista um blastômero destinado a originar o trofoectoderma, e para tanto este blastômero possuiria grandes quantidades das proteínas leptina e STAT3 maternas e altos níveis de beta-HCG e beta-LH embrionários.

Diversos trabalhos descrevem o papel de um gene chamado Ped – *preimplantation development* – que codifica a proteína QA-2, um MHC de classe I envolvido na regulação do desenvolvimento embrionário inicial e sobrevivência do embrião. Este gene possui dois alelos, chamados Ped-fast e Ped-slow. O alelo Ped-fast é dominante e leva à produção de QA-. Embora não se saiba exatamente ainda qual é a função desta proteína, foi observado que embriões de camundongos homocigotos para este alelo se desenvolvem a uma velocidade consideravelmente maior e apresentam melhores taxas de sobrevivência durante a gestação, em comparação a embriões homocigotos Ped-slow, que não produzem QA-2.

A expressão do gene hipoxantina fosforibosil-transferase (HPRT) foi investigada em embriões humanos em diferentes fases do desenvolvimento pré-implantação e os dados obtidos foram correlacionados com o sexo dos embriões. O gene HPRT, ligado ao cromossomo X, é responsável pela manutenção de funções celulares básicas (*house-keeping*), e alterações neste gene estão relacionadas à síndrome de Lesch-Nyhan. Foi observado que, em embriões de quatro células os níveis de mRNA de HPRT decaem cerca de cinco vezes em relação àqueles observados nos oócitos não-fertilizados, sugerindo um intenso mecanismo de destruição pós-fertilização. Até o segundo dia após a fertilização não foram observadas diferenças entre embriões masculinos e femininos, entretanto, no terceiro dia os níveis de HPRT eram consideravelmente maiores nos embriões femininos do que nos masculinos. Esta diferença nos níveis encontrados entre embriões de diferentes sexos é relacionada ao fato de ambos os cromossomos X ainda estarem ativos nos embriões femininos nesta fase. De acordo com os autores, estes resultados sugerem que a inativação do cromossomo X nas células femininas ocorra por volta do estágio de 8 células do desenvolvimento embrionário (Latham, 2005).

A expressão dos receptores TGF β (transforming growth factor) tipos I e II, e as proteínas Smad 2 e 3 foi analisada em diferentes fases do desenvolvimento embrionário pré-implantação. Foi demonstrado que altos níveis de TGF β no fluido folicular estão relacionados ao aumento do número de células em embriões de camundongos, numa interação mediada por receptores de TGF β presentes na membrana do oócito e do embrião pré-implantação. Os receptores de TGF β atuam em sua porção intracelular fosforilando as proteínas da família Smad, envolvidas em sinalização intracelular. Foi observado que embriões de 4 e 8 células possuem as proteínas Smad 2 e 3, mas não os receptores de TGF β . Entretanto, no estágio de blastocisto tanto as proteínas Smad quanto os receptores de TGF β tipos I e II são expressos. Por outro lado, demonstrou-se que fêmeas de camundongos expressam os receptores tipo I e II de TGF β no oviduto e no útero, e também os embriões, desde o estágio de 1 célula até o de blastocisto. Foi demonstrado também que o próprio TGF β é expresso em embriões de camundongos a partir do estágio de 2 células, aumentando gradualmente até o estágio de 8 células e decaindo após o estágio de mórula.

O gene Oct-4 (também conhecido como OCT-4, OCT-3, OCT-3/4, POU5F1, OTF3 OU NF-A3) codifica um fator de transcrição associado à manutenção da totipotência pelas células do. Em humanos, a proteína OCT-4 é codificada pelo gene OTF3, e é expressa em todos os estágios do embrião pré-implantação. Em blastocistos, a expressão de OCT-4 foi demonstrada no trofoectoderma, e em maiores níveis, na massa celular interna. A partir da análise de mais de uma centena de oócitos e embriões

pré-implantação em diferentes fases do desenvolvimento, foi observado que em oócitos e embriões em fase de clivagem a expressão de OCT-4 é variável, e a localização da proteína é essencialmente citoplasmática. Entretanto, após a compactação, a expressão se estabiliza e a proteína passa a ser detectada no núcleo, indicativo de atividade biológica. Além disso, alguns autores sugerem que exista uma variação na localização das isoformas de OCT-4 em diferentes pontos da célula, sugerindo que elas apresentem diferentes funções.

Uma importante classe de genes expressos em todos os tipos celulares dos mais variados organismos são as *heat shock proteins* (HSPs) ou proteínas de choque térmico, responsáveis por garantir que outras proteínas adquiram sua exata conformação. Embora não haja muitos dados acerca da expressão de HSPs em embriões pré-implantação, expressão espontânea de hsp70 foi observada em camundongos no momento da ativação do genoma embrionário, e novamente nos estágios de mórula e blastocisto inicial.

Outra questão fundamental para o desenvolvimento embrionário pré-implantação e que está diretamente relacionada a alterações na expressão de determinados genes, diz respeito ao metabolismo energético. Sabe-se que até o estágio de duas células, embriões de mamíferos são capazes de utilizar apenas o piruvato como fonte de energia. Após este estágio, passam a ser capazes de utilizar também o lactato, e somente após o estágio de 8 células os embriões humanos se tornam capazes de metabolizar a glicose. Esta restrição nas vias de produção de energia nos diferentes estágios do desenvolvimento embrionário se deve à não expressão de genes envolvidos no metabolismo da glicose nas primeiras fases do desenvolvimento. Johnson *et al.* (1997) analisaram a expressão de genes para hexoquinase (HX) e glicose-fosfato isomerase (GPI) em embriões de camundongos nos estágios de mórula e blastocisto. A HX catalisa o primeiro passo enzimático da glicólise, utilizando ATP para converter a glicose em glicose-6-fosfato, e transcritos referentes a este gene já foram detectados em todos os estágios do desenvolvimento de embriões de camundongos pré-implantação. A enzima GPI realiza o segundo passo da glicólise, e converte a glicose-6-fosfato em frutose-6-fosfato. Portanto, a expressão destes genes é fundamental para a conversão de células dependentes de piruvato em células capazes de utilizar a glicose como fonte de energia. Foi descrito um aumento na população de mRNAs para hexoquinase no estágio de blastocisto, enquanto os níveis de glicose-fosfato isomerase se mostraram equivalentes entre os dois estágios. Outros trabalhos já demonstraram que os níveis destas enzimas atingem seu pico de expressão durante a fase de blastocisto.

Polarização e cavitação

Processos como polarização, formação de junções celulares e transporte de íons e água são fundamentais para a formação do blastocisto, e diversas famílias gênicas parecem estar envolvidas nesta etapa do desenvolvimento embrionário (Watson *et al.*, 2004). Alterações morfológicas ocorridas na compactação, durante a qual os blastômeros se tornam extremamente justapostos, foram correlacionadas à expressão de genes envolvidos na formação de junções celulares como as caderinas, proteínas de membrana responsáveis pela formação de junções aderentes. A porção intracelular destas proteínas interage com as cateninas α e β , que por sua vez interagem com o citosqueleto, permitindo desta forma uma forte ligação entre células vizinhas. Foi demonstrado que a E-caderina, e as cateninas α e β , assim como a actina, parte fundamental do citosqueleto, são estocadas em oócitos de camundongos, e por isso estão presentes no embrião recém-formado. Entretanto, a formação de junções

celulares mediadas por E-caderina ocorre apenas a partir do início da compactação. Um possível mecanismo para explicar este controle na formação das junções aderentes se refere à atuação de inibidores da interação E-caderina / β -catenina, como o fator IQGAP, que pode também se ligar a Cdc42. Natalie *et al.* (2004) analisaram a expressão destes genes em embriões de camundongos no período pré-implantação, e observaram que tanto os mRNAs quanto as proteínas estão presentes durante todas as fases, entretanto, uma alteração importante na distribuição de IQGAP é observada durante a compactação. Sugere-se que durante as primeiras fases da clivagem IQGAP pode estar ligado à β -catenina, impedindo a formação das junções aderentes. Quando se inicia a compactação Cdc42 se torna ativo, inativando IQGAP e permitindo a adesão celular via E-caderinas (Natale *et al.*, 2004. Watson *et al.*, 2004). Alguns autores realizaram um extenso trabalho de identificação de genes codificantes de moléculas de adesão expressos nas diferentes fases do desenvolvimento embrionário pré-implantação, e entre outros dados, identificaram RNAs expressos apenas na fase de blastocisto.

No que diz respeito à formação da blastocelule, uma hipótese defendida por muitos autores diz respeito ao papel do fluxo de íons e de água durante a cavitação. Acredita-se que logo após a compactação as células mais externas do embrião incrementam as junções entre elas, sobretudo as do tipo ocludente, e modificam também seu sistema de transporte de íons, a fim de dar início à formação do blastocisto. Sugere-se que neste momento a bomba de sódio e potássio exerça um papel fundamental (Watson *et al.*, 2004).

A bomba de Na⁺/K⁺ está presente na membrana plasmática de todas as células, e é responsável pelo transporte ativo de íons Na⁺ e K⁺ através da membrana, originando um gradiente iônico e eletroquímico entre os meios intra e extracelular. Duas subunidades protéicas, uma α e uma β , formam a unidade funcional mínima para o funcionamento da bomba de sódio e potássio. Existem pelo menos quatro isoformas da subunidade α e três da subunidade β , e a maioria dos trabalhos associa a expressão dos genes que codificam estas subunidades com a atividade da bomba de sódio e potássio.

Foi demonstrado que em embriões de camundongos a expressão da Na⁺ e K⁺ ATPase está confinada ao domínio basolateral do trofoectoderma. A partir destes dados, investigou-se a hipótese de que esta polarização da enzima criaria um gradiente iônico através do trofoectoderma, gerando uma força osmótica que causaria um fluxo de água para a região mais interna do embrião. A combinação deste fluxo osmótico com a formação das junções ocludentes formadas entre as células periféricas levaria à formação e expansão da cavidade do blastocisto (cavitação). Dados obtidos por outros autores corroboram esta hipótese, afirmando que um aumento na atividade da bomba de sódio e potássio durante a formação do blastocisto ocorre em todas as espécies de mamíferos analisadas. Em embriões humanos este aumento pode chegar a 60% na fase inicial de desenvolvimento do blastocisto.

Entretanto, outros trabalhos demonstraram que o gradiente osmótico existente através do trofoectoderma de embriões de coelhos não seria suficiente para sustentar a difusão do volume de água necessário à cavitação. Por este motivo, alguns autores defendem também um importante papel para as aquaporinas (poros que permitem a passagem de água pela membrana) neste processo, as quais facilitariam o fluxo de água através das células. Foi mostrado que cerca de sete diferentes RNAs mensageiros para aquaporinas estão presentes durante o desenvolvimento pré-implantação em embriões de camundongos. Apesar dessa discussão, é bastante razoável supor que os processos descritos anteriormente atuem em conjunto, a fim de propiciar a correta formação da cavidade embrionária.

Além da análise geral de genes expressos durante a formação de blastocistos, muitos trabalhos buscam ainda identificar particularidades na expressão gênica de cada tipo celular presente nesta fase do desenvolvimento: as células-tronco embrionárias (ESC – *embryonic stem cells*), as células-tronco do trofoblasto (TSC – *trophoblast stem cells*) e as células do endoderma extra-embriônico (XEN – *extraembryonic endoderm*).

Ralston & Rossant (2005) revêem os principais pontos da regulação gênica envolvida na formação destes tipos celulares. De acordo com estes autores, que utilizam dados descritos para embriões humanos e de camundongos, apesar de já apresentarem um pequeno grau de diferenciação, uma vez que expressam conjuntos de genes diferentes, estes tipos celulares são intercambiáveis, através de manipulação genética. Além da cavitação, descrita anteriormente, os autores argumentam também que um segundo ponto importante na origem dos blastocistos é a diferenciação da massa celular interna em epiblasto e endoderma primitivo.

Demonstrou-se que o gene do fator de transcrição Oct4 (Oct3/4 ou Pou5f1) é expresso por todos os blastômeros até a fase de blastocisto, quando sua expressão se torna restrita à massa celular interna. Além disso, embriões de camundongos nocautados para Oct4 originam apenas células do trofoectoderma, demonstrando que este gene é requerido para a formação da massa celular interna. Também foi demonstrado que Oct4 é expresso em células-tronco embrionárias, mas não em células-tronco do trofoblasto e células do endoderma extra-embriônico. Por outro lado, genes como Cdx2 são expressos apenas em células-tronco do trofoblasto. Um modelo defendido por alguns autores sugere que a atividade mutuamente antagonista de Oct4 e Cdx2 define o destino das células-tronco embrionárias (massa celular interna) e do trofoblasto.

A partir deste ponto, outros dois genes parecem regular a diferenciação da massa celular interna em endoderma primitivo e epiblasto. O gene Nanog codifica um fator de transcrição que define a formação do epiblasto, enquanto o gene Gata6 codifica um fator de transcrição expresso no endoderma primitivo dos blastocistos. Sugere-se que Gata6 tenha um papel tardio no desenvolvimento do endoderma extra-embriônico, e embora haja ainda alguma controvérsia, parece não haver dúvidas de que Nanog e Gata6 são responsáveis pela determinação das linhagens celulares do epiblasto e do endoderma primitivo do blastocisto.

Ralston & Rossant (2005) discutem ainda a possibilidade de interconversão entre estes tipos celulares, sobretudo através da manipulação da expressão destes genes, conforme já foi demonstrado em diversos trabalhos.

Genes e hatching

O *hatching* é uma etapa fundamental do desenvolvimento embrionário, e marca a preparação final do embrião para a implantação. Dada esta importância, avaliou-se o transcriptoma de blastocistos *hatched* e *pré-hatched*, com o objetivo de caracterizar o padrão de expressão gênica neste período. Os autores encontraram 85 genes cuja expressão é aumentada em blastocistos que já realizaram o *hatching* em relação àqueles que ainda não o fizeram. Estes genes possivelmente relacionados ao *hatching* incluem moléculas de adesão e migração celular, reguladores epigenéticos, reguladores de resposta a estresse e reguladores de resposta imune. São exemplos de alguns destes genes: caderina E, molécula de adesão celular neuronal (NCAM), lectina, Dnmt1, heme oxigenase, neutrofina, interleucina 4R e receptor-2 de interferon.

Considerações finais

Novos dados a respeito da expressão dos mais diversos genes durante o desenvolvimento de embriões pré-implantação

são frequentemente disponibilizados na literatura científica. Manter-se atualizado em relação a estes dados e analisá-los de forma crítica, buscando a correlação entre eles não é tarefa simples. Entretanto, é a partir do estudo da expressão gênica através dos diferentes estágios do desenvolvimento embrionário que poderemos montar o quebra-cabeças genético que propicia a formação de células-tronco, e a longo prazo, de um novo indivíduo. A solução deste quebra-cabeças requer ainda grande empenho de estudo e pesquisa através da engenharia genética, e o uso e desenvolvimento de técnicas como *microarray* poderão ser de grande valia.

Mas certamente quando estas respostas forem conhecidas, novos e fascinantes horizontes se abrirão para a medicina através da manipulação genética celular, que permitirá entre outras coisas, produzir células-tronco para um vasto leque de usos terapêuticos. E mais do que tratar da manipulação genética, consideradas as implicações éticas desta abordagem em embriões humanos, o conhecimento de seus padrões de expressão gênica tornará possível que se avalie seu desenvolvimento molecular, permitindo-nos saber se determinadas células são geneticamente sadias e de boa qualidade.

Finalmente, tendo em vista o grande volume de informações contido neste estudo, os autores se colocam à disposição para enviar àqueles que se interessarem uma tabela com um resumo das informações aqui descritas, bem como a lista completa com as 97 referências bibliográficas consultadas.

REFERÊNCIAS

1. Alberts, Bruce, Lewis, Raff, Roberts e Walter. *Biologia Molecular da Célula*. 4^o edição. Editora ArtMed. 2004.
2. Jurisicova, A., Acton, B.M. Deadly decisions: the role of genes regulating programmed cell death in human preimplantation embryo development. *Reproduction*. 128: 281–291. 2004.
3. Latham, K.E. X chromosome imprinting and inactivation in preimplantation mammalian embryos. *TRENDS in Genetics*. 21(2): 120-127. 2005.
4. Levy, R. Genetic regulation of preimplantation embryo survival. *Int Rev Cytol*. 210:1-37. 2001.
5. Morgan, H.D., Santos, F., Green, K., Dean, W., Reik, W. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet*. 14 (1): 47-58. 2005.
6. Natale, D.R., Paliga, A.J.M., Beier, F.D., Souza, S.J.A., Watson, A.J. p38 MAPK signaling during murine preimplantation development. *Dev Biol*. 268:76-88. 2004.
7. Ralston, A., Rossant, J. Genetic regulation of stem cell origins in the mouse embryo. *Clin Genet*. 68(2): 106-12. 2005.
8. Robson, P. The maturing of the human embryonic stem cell transcriptome profile. *TRENDS in Biotechnology*. 22(12): 609-612. 2004.
9. Schultz, R.M. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Hum Reprod Update*. 8(4):323-31. 2002.
10. Tesarik, J. Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. *Reproductive Biomedicine online*. 10(3): 370-375. 2005.
11. Watson, A.J., Natale, D.R., Barcroft, L.C. Molecular regulation of blastocyst formation. *Animal Reprod Sci*. 82-83: 583-592. 2004.
12. Zeng, F., Schultz, R.M. RNA transcript profiling during zygotic gene activation in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol*. 283(1): 40-57. 2005.

Associação entre Câncer Pediátrico e Técnicas de Reprodução Assistida de Alta Complexidade

Association Between Pediatric Cancer and Techniques of Assisted Reproduction of High Complexity

**Thais Fagnani Machado,
Aparecida dos Santos Canha**

Trabalho de Conclusão de Curso desenvolvido e apresentado na Associação Instituto Sapientiae Avenida Brigadeiro Luis Antônio, 4325 - São Paulo - SP CEP: 01401-002 Fone / Fax: (11) 3887-2628

Endereços do autor principal:
Hospital Pérola Byington
Avenida Brigadeiro Luis Antônio, 683 - 4º andar
São Paulo - SP - Fone: (11) 3242-3433

Rua Dr. Barros Cruz, 33 Apto. 41B - Vila Mariana
CEP: 04121-020 - São Paulo - SP
Fone: (11) 5084-9580 - (14) 9717-0538
e-mail: thais@hotmail.com

RESUMO

As técnicas de reprodução assistida de alta complexidade, fertilização *in vitro* (FIV) clássica e injeção intracitoplasmática do espermatozóide (ICSI), estão sendo cada vez mais indicadas no tratamento de casais inférteis. No entanto, muitas questões com relação à saúde dos descendentes destes casais têm preocupado os profissionais da área. Vários trabalhos já foram publicados ressaltando as conseqüências dessas técnicas a curto prazo. A preocupação atual refere-se às conseqüências a longo prazo, destacando o risco genético e a tendência ao desenvolvimento de câncer. Portanto, o objetivo principal deste trabalho visou verificar a associação entre técnicas de reprodução assistida de alta complexidade e câncer pediátrico. Foram obtidos 75 artigos, dos quais 48 foram analisados detalhadamente com relação à técnica de fertilização e tratamento hormonal utilizados e incidência de câncer pediátrico em comparação com a população em geral. As conclusões apresentadas por todos os estudos relatados neste trabalho sugerem ausência de relação causa - conseqüência entre os parâmetros comparados. No entanto, mostram a necessidade de outros estudos com número amostral e com tempo de acompanhamento dos pacientes maiores para a obtenção de conclusões mais seguras.

Palavras-chave: Fertilização *in vitro*, câncer pediátrico, ICSI, FIV.

Recebido em 03/03/2006
Avaliado e aceito em 09/05/2006

ABSTRACT

The past few years the high complexity assisted reproduction techniques, in vitro fertilization (FIV) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI), has been indicated to couples with infertility. However, the health professionals doesn't know the consequences of those treatment on offsprings. Some papers had already been published standing out the consequences of these techniques in short term. The scientists are concern about the long term consequences, such as genetic risk and cancer development. Therefore, this paper aimed to verify the association between the high complexity techniques of assisted reproduction and pediatric cancer. The conclusions presented in all 48 articles used for this research, suggest the absence of the cause - consequence relation between the parameters used in these study. However, more studies are needed in order to have safer conclusions.

Key words: *In vitro fertilization, pediatric cancer, ICSI, FIV.*

INTRODUÇÃO

Sabe-se que 20% dos casais são inférteis. Não concebendo naturalmente, procuram pela medicina reprodutiva, que, cada vez mais, se vê na necessidade de desenvolver técnicas específicas para melhor atendê-los.

Dentre as técnicas de fertilização *in vitro*, as Técnicas de Reprodução Assistida (TRA) de alta complexidade, fertilização *in vitro* (FIV) clássica e injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI), estão sendo cada vez mais utilizadas por apresentarem falha de fertilização menor e, conseqüentemente, taxa de gestação maior em comparação às técnicas

de reprodução assistida de baixa complexidade. Segundo Bergh *et al.* (1999), em 1995 foi relatado mais de 40.000 bebês concebidos por fertilização *in vitro*. Nesta mesma época, na Suécia, o número de bebês nascidos através das TRA correspondia a 1,6% de todos os recém-nascidos. Em 2001, na Holanda, essa porcentagem correspondia a 2,5%. O gráfico I ilustra o aumento do número de concepções por meio de TRA resultando em recém-nascidos vivos na Austrália entre 1979 e 1995 (Bruinsma *et al.*, 2000).

Mais de 25 anos se passaram desde o nascimento da Luise Brown, primeiro bebê concebido por meio da FIV clássica, e muitas questões com relação à saúde dos descendentes concebidos por técnicas de fertilização assistida têm preocupado os profissionais da área (Doyle *et al.*, 1998; Bergh *et al.*, 1999). Vários grupos de pesquisa formaram-se com o intuito de organizar bancos de dados referentes aos pacientes com o objetivo de estabelecer relação de causa - conseqüência entre as TRA e a saúde dos bebês (Bergh *et al.*, 1999). Em 1990, a Autoridade de Embriologia e Fertilização Humana (HFEA), formou o primeiro grupo de pesquisadores para regular e organizar a aplicação das TRA em todo o mundo. Desde 1992, o nascimento de mais de 25.000 bebês por meio dessas técnicas foram registrados (Doyle *et al.*, 1998). Baseados nesses dados, muitos trabalhos já foram publicados ressaltando as conseqüências das TRA a curto prazo. Por exemplo, o número de nativos e natimortos, índice de gestação múltipla e peso ao nascimento (Bergh *et al.*, 1999; White *et al.*, 1990; Bruinsma *et al.*, 2000). No entanto, a preocupação atual refere-se às conseqüências a longo prazo destas técnicas, ressaltando a importância do fator genético no desenvolvimento de câncer.

Segundo Meschede *et al.* (2000), casais inférteis apresentam maior probabilidade de portar e, conseqüentemente, transmitir alterações genéticas aos seus descendentes, pois as células da linhagem germinativa podem apresentar alterações genéticas específicas referentes ao cariótipo do paciente. No entanto, essas células também podem sofrer ações de fatores extrínsecos que aumentam o índice de aneuploidias entre elas.

As alterações genéticas responsáveis pelo desenvolvimento cancerígeno ocorrem em genes especiais, denominados protooncogenes e supressores tumorais. Os protooncogenes caracterizam-se por induzir a proliferação celular, enquanto os genes supressores tumorais inibem a proliferação, ambos agindo no ciclo mitótico da célula. Quando alterados, os protooncogenes tornam-se ativos e recebem a denominação de oncogenes. Agora se caracterizam por induzir a proliferação celular descontrolada. Os genes supressores tumorais quando mutados perdem a capacidade de inibir a divisão celular (figura I).

Uma das principais razões que um grande número de células não se transforma em tumores é que a transformação maligna requer mais que uma simples alteração genética. O desenvolvimento de um tumor é um processo de muitas etapas caracterizado por uma progressão de alterações genéticas em uma simples linhagem celular, tornando-a incapaz de se controlar. Após a célula ter-se tornado cancerosa, ela continua a acumular mutações, alterando-lhe suas propriedades e fazendo-a mais agressiva, conforme ilustra a figura II. Sabendo das características do desenvolvimento do câncer, muitos autores têm destacado a possível relação existente entre as TRA de alta complexidade e câncer pediátrico, particularmente de origem neuroectodérmica (Toren *et al.*, 1995; Doyle *et al.*, 1998; Bergh *et al.*, 1999; Bruinsma *et al.*, 2000; Lerner-Geva *et al.*, 2000).

Segundo Bruinsma *et al.* (2000), muitas das fases do tratamento da infertilidade através das TRA de alta complexidade apresentam-se como fatores interferentes no desenvolvimen-

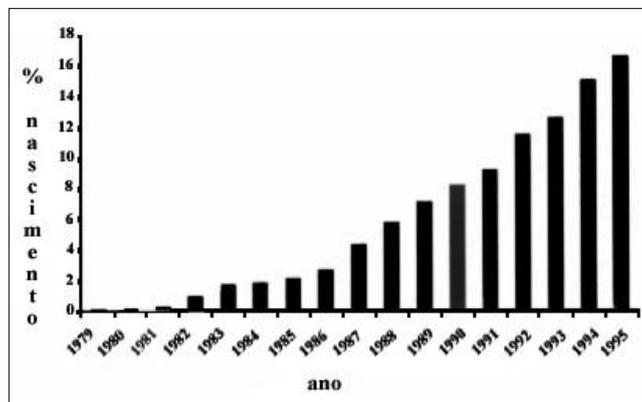


Gráfico I - Porcentagem de nascimento alcançada na Austrália por meio das técnicas de reprodução assistida entre 1979 e 1995

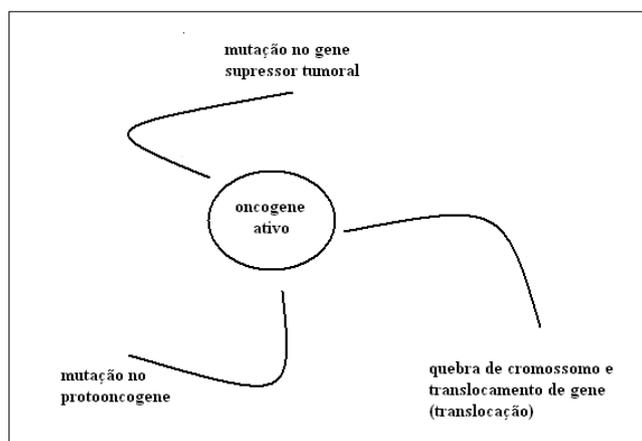


Figura I - Alterações nos protooncogenes e genes supressores tumorais responsáveis pelo desenvolvimento do câncer

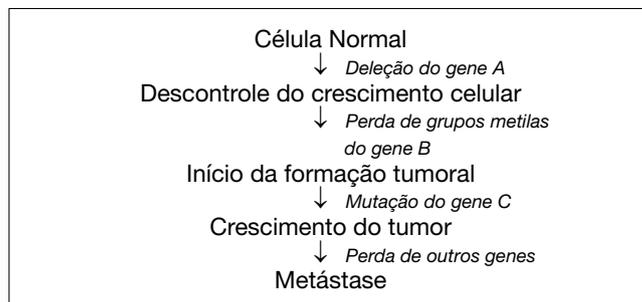


Figura II - Esquema didático do desenvolvimento tumoral pelo desenvolvimento do câncer

to embrionário, se destacando as conseqüências das drogas utilizadas na indução ovariana, a manipulação dos gametas, tanto masculino como feminino, a manipulação dos pré-embriões em meios de cultura assim como o seu congelamento e descongelamento. Os hormônios progesteronais utilizados para preservar a gestação também preocupam (Toren *et al.*, 1995). Tantas indagações devem-se ao fato das células embrionárias serem totipotentes, apresentando alta capacidade de diferenciação em qualquer célula do corpo humano. No entanto, se apresentam vulneráveis a exposição aos fatores externos, podendo se diferenciar em células anormais que não respondam ao controle de proliferação celular.

Vários pesquisadores concordam com a relação entre o desenvolvimento do câncer infantil e a exposição da mãe a hormônios específicos do tratamento da infertilidade (Toren

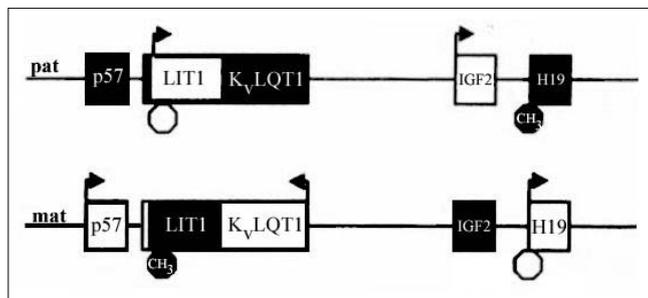


Figura III - A banda cromossômica 11p15 contém duas regiões de imprinting genômico.

A sub-região centromérica abrange os genes *p57*, *LIT1* e *KvLQT1*. A sub-região telomérica abrange os genes *IGF2* e *H19*. Os quadrantes de cor branca representam genes ativos e as setas indicam a orientação da transcrição. Os octógonos de cor branca representam as DMRs analisadas e os de cor preta indicam metilação. O cromossomo paterno é designado por "pat" e o materno por "mat".

et al., 1995). Kramer *et al.* (1987) descreveram a possível associação entre o tratamento hormonal antes ou durante estágios precoces da gestação e neuroblastoma. Kobayashi *et al.* (1991) descreveram a ocorrência de tumores neuroectodérmicos e linfoma em crianças concebidas por mães submetidas à indução ovariana. Melamed *et al.* (1982) observaram uma associação entre o uso de gonadotrofinas no tratamento da infertilidade e hepatoblastoma infantil. Segundo Lerner – Geva *et al.* (2000), a exposição a hormônios durante a gravidez causa alterações morfológicas e carcinogênicas similares àquelas observadas em estudos experimentais desenvolvidos com ratos.

Robaire & Hales (1993) sugeriram a relação entre a exposição paterna a fatores químicos antes da concepção e o desenvolvimento de leucemia infantil e Tumor de Wilms. Essa hipótese trouxe novas preocupações a respeito da manipulação dos gametas masculino e feminino. No processamento desenvolvido no laboratório, tanto os espermatozoides como os oócitos são expostos a várias substâncias que poderiam se caracterizar como fatores cancerígenos, uma vez que não são conhecidas as consequências da utilização destas substâncias para com os genes específicos dos gametas.

Segundo Toren *et al.* (1995), não é sabido ainda como células germinativas e zigotos expostos a altas doses de hormônios sexuais induzem o desenvolvimento de câncer infantil na prole. No entanto, se sabe que hormônios esteróides facilmente ultrapassam a membrana celular devido a sua alta lipossolubilidade, se ligam a receptores citoplasmáticos que os transportam até o núcleo onde agem como fatores de transcrição, afetando a expressão e depressão de certos genes. Essa sequência de eventos influencia no processo de proliferação, diferenciação e apoptose.

Mais recentemente uma possível associação entre TRA de alta complexidade e a ocorrência de alterações de *imprinting* genômico tem sido mostrada. Uma das alterações de *imprinting* mais estudadas é a responsável pelo aparecimento da Síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS) que possibilita o aumento do risco de desenvolvimento de câncer infantil. O mais freqüente é o Tumor de Wilms, ocorrendo em 11% das crianças com BWS antes dos quatro anos de idade, seguido por outros tumores embrionários como hepatoblastoma e neuroblastoma. Em menor freqüência tem-se o desenvolvimento de rhabdomyosarcoma e carcinoma adrenocortical (DeBaun *et al.*, 2002).

A BWS é o modelo para melhor compreensão das características de cânceres epigenéticos, pois envolve tanto alterações

de *imprinting* como metilações de alguns genes da banda cromossômica 11p15 (*IGF2*, *KvLQT1*, *H19*, *LIT1* e *CDKN1C*) (DeBaun *et al.*, 2002).

Em tecidos normais os genes *IGF2* e *H19* são coordenadamente regulados por um processo de competição da expressão envolvendo *enhancers*. No alelo materno, a região entre *H19* e *H19DMR* (região diferencialmente metilada), mapeada 2Kb acima deste gene, não está metilada e apresenta-se acessível à ligação da proteína isoladora chamada *CTCF*, isolando dessa forma o promotor do gene *IGF2* dos *enhancers* localizados a 3' do gene *H19*, e impedindo a expressão do *IGF2*, como mostra a figura III (DeBaun *et al.*, 2002).

No alelo paterno, *H19DMR* está metilada, bloqueando a ligação da proteína *CTCF* e impedindo a expressão do *H19*. O promotor do gene *IGF2* tem, então, acesso aos *enhancers* e o alelo paterno é expresso via *enhancer* e elementos flangeadores. Isto sugere que *H19DMR* funcione como região controladora do imprinting no domínio telomérico. Deleção completa da *H19DMR* resulta em perda do imprinting, com ativação da expressão *H19* e redução da expressão do *IGF2* paternos. O alelo materno do *IGF2* é ativado e a expressão do *H19* materno é reduzida, como mostra a figura 4 (DeBaun *et al.*, 2002).

No domínio centromérico a *KvDMR*, uma região maternalmente metilada na extremidade final 5' do transcrito *LIT1*, pode funcionar como uma região controladora do imprinting. Perda da metilação da *KvDMR* está associada com expressão bialélica de *LIT1*, como ilustra a figura III (DeBaun *et al.*, 2002).

OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo verificar a associação entre técnicas de reprodução assistida de alta complexidade e câncer pediátrico.

MÉTODO

O levantamento bibliográfico dos trabalhos científicos foi realizado através de alguns sítios de busca bibliográfica na Internet, se destacando: pubmed, medline, bireme e lilacs. As palavras-chave utilizadas e cruzadas foram: câncer pediátrico, fertilização *in vitro*, ICSI, FIV.

Foram encontrados 75 artigos relacionados ao tema deste trabalho. Destes, 48 artigos foram analisados detalhadamente com relação à técnica de reprodução assistida e tratamento hormonal utilizados e a incidência de câncer pediátrico entre os concebidos por meio das técnicas de fertilização assistida em comparação com a população em geral.

Os resultados dos principais pesquisadores foram apresentados e discutidos no contexto.

DISCUSSÃO

Teoricamente, três estágios da aplicação das TRA de alta complexidade apresentam efeito cancerígeno: indução hormonal da ovulação e da espermatogênese, manipulação das células germinativas e dos zigotos e preservação da gravidez com hormônios progestacionais (Toren *et al.*, 1995; Bruinsma *et al.*, 2000).

White *et al.* (1990) relataram, na Austrália, num período de dois anos, cinco crianças com tumores neuroectodérmicos, sendo três neuroblastomas, um ganglioneuroblastoma, um meduloblastoma e um tumor neuroectodérmico primitivo. A incidência anual de casos de neuroblastoma e meduloblastoma neste país é 1,0 e 0,4 por cada 100.000 crianças nascidas, respectivamente. Três dessas crianças nasceram após FIV clássica e duas nasceram após inseminação. No entanto, todas as mães foram submetidas à indução ovariana com citrato de clomifeno.

Baseando-se no estudo desenvolvido pelo pesquisador White e colaboradores, Kobayashi *et al.* (1991) revisaram 6236 casos de câncer infantil, entre 1985 e 1989, nos quais as mães haviam utilizado drogas antes da gestação, arquivados no Registro de Câncer Infantil do Japão. Foi identificado, significativamente, um número maior de casos de câncer em crianças cujas mães foram submetidas à indução ovariana, sendo quatro casos de neuroblastoma, dois de linfoma, dois tumores reticuloendoteliais e um cerebral. Embora a dificuldade maior deste trabalho tenha sido identificar as drogas usadas para indução ovariana, o citrato de clomifeno foi à droga mais utilizada para este fim no período estudado.

Kramer *et al.* (1987) reportaram três casos de tumores neuroectodérmicos (dois neuroblastomas e um meduloblastoma) em crianças nascidas através da técnica de FIV clássica. Dois outros tumores (um hepatoblastoma e um tumor neuroectodérmico primitivo supratentorial) foram diagnosticados em crianças cujas mães foram submetidas à indução de ovulação com citrato de clomifeno.

Toren *et al.* (1995) diagnosticaram e trataram dois casos de tumores embrionários (hepatoblastoma e sarcoma de rim) em 312 crianças concebidas por meio das técnicas de fertilização *in vitro*. Devido à incidência de tumores embrionários ser baixa na população em geral (1/100.000 crianças por ano para hepatoblastoma e 2,8/100.000 para sarcoma de rim) o diagnóstico de dois casos para um número relativamente pequeno de nascimentos por FIV apresentou-se preocupante.

Em 1998, Doyle *et al.* compararam dados registrados de 2507 crianças concebidas por TRA na Inglaterra entre 1978 e 1991 com o Registro de Tumores Infantis. Somente dois casos de câncer foram identificados comparados com 3,5 casos esperados. O amplo estudo publicado por Bergh *et al.* (1999) abrangeu dados de todas as clínicas de reprodução humana da Suécia e comparou os resultados obstétricos de 5856 bebês nascidos por técnicas de fertilização *in vitro* entre 1982 e 1995 com todos os bebês nascidos, no mesmo período, na população em geral. Quatro crianças desenvolveram câncer em comparação com 3,6 casos esperados. No estudo desenvolvido na Austrália, 5249 crianças concebidas por técnicas de fertilização *in vitro* foram comparadas com os dados populacionais arquivados no Registro de Câncer. Um total de 4,3 casos de câncer foram esperados enquanto seis casos foram observados, não representando um dado estatisticamente significativo (Bruinsma *et al.*, 2000). Um grupo israelense comparou 332 crianças nascidas por técnicas de fertilização *in vitro* com a população em geral. Foram esperados 1,7 casos de câncer infantil, no entanto, nenhum caso foi observado (Lerner-Geva *et al.*, 2000).

Todos esses estudos não apresentaram maior incidência de câncer infantil associado com o tratamento da infertilidade em comparação com a população em geral. No entanto, os resultados foram baseados num pequeno número amostral e com pequeno tempo de acompanhamento dos pacientes. Segundo Lerner – Geva *et al.* (2000), são necessárias, pelo

menos, 20.000 crianças concebidas por técnicas de fertilização *in vitro* para se observar com mais confiabilidade a possível associação entre essas técnicas e incidência de câncer pediátrico.

REFERÊNCIAS

1. Bergh T., Ericson A., Hillensjö T., Nygren K.G., Wennerholm U.B. - Deliveries and children born in-vitro fertilization in Sweden 1982-95: a retrospective cohort study. *Lancet.*, 354: 1579-1585, 1999.
2. Bruinsma F., Venn A., Lancaster P., Speirs A., Healy D. - Incidence of cancer in children born after in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.*, 15: 604-607, 2000.
3. DeBaun M.R., Niemitz E.L., McNeil D.E., Brandenburg S.A., Lee M.P., Feinberg A.P. - Epigenetic Alterations of *H19* and *LIT1* Distinguish Patients with Beckwith-Wiedemann Syndrome with Cancer and Birth Defects. *Am. J. Hum. Genet.*, 70: 604-611, 2002.
4. Doyle P., Bunch K.J., Beral V., Draper G.J. - Cancer incidence in children conceived with assisted reproduction technology. *Lancet.*, 352: 452-453, 1998.
5. Kobayashi N., Matsui I., Tanimura M., Nagahara N., Akatsuka J.I., Hirayama T., Sato K. - Childhood neuroectodermal tumours and malignant lymphoma after maternal ovulation induction. *Lancet.*, 338: 955, 1991.
6. Kramer S., Ward E., Meadows A.T. - Medical and drug risk factors associated with neuroblastoma: A case control study. *J. Natl. Cancer Inst.*, 78: 797-804, 1987.
7. Lerner-Geva L., Toren A., Chetrit A., Modan B., Mandel M., Rechavi G., Dor J. - The Risk for Cancer among Children of Women Who Underwent *In Vitro* Fertilization. *Cancer.*, 88: 2845-2846, 2000.
8. Melamed I., Bujanover Y., Hammer J., Spirer Z. - Hepatoblastoma in an infant born to a mother after hormonal treatment for sterility. *N Engl J Med.*, 307: 820-825, 1982.
9. Meschede D., Lemcke B., Behre H.M., Geyter C.De., Nieschlag E., Horst J. - Non-reproductive heritable disorders in infertile couples and their first degree relatives. *Hum. Reprod.*, 15: 1609-1612, 2000.
10. Robaire B., Hales B.F. - Paternal exposure to chemicals before conception. *BMJ.*, 307: 341-342, 1993.
11. Toren A., Sharon N., Mandel M., Neumann Y., Kenet G., Kaplinsky C., Dor J., Rechavi G. - Two Embryonal Cancers after *In Vitro* Fertilization. *Cancer.*, 76: 2372-2374, 1995.
12. White L., Giri N., Vowels M.R., Lancaster P.A.L. - Neuroectodermal tumours in children born after assisted conception [letter]. *Lancet.*, 336: 1577, 1990.

Morfologia do Espermatozóide Segundo o Critério Estrito

Sperm Morphology According to Strict Criteria

Cláudia C Viero; Luana Venturin Lara; Eleonora Bedin Pasqualotto; Fabio Firmbach Pasqualotto

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade de Caxias do Sul e CONCEPTION – Centro de Reprodução Humana, Caxias do Sul, RS, Brasil

Endereço para correspondência:
Fabio Firmbach Pasqualotto
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde,
Universidade de Caxias do Sul, e CONCEPTION –
Centro de Reprodução Humana, Caxias do Sul, RS
Rua Pinheiro Machado, 2569, sl 23,
Bairro São Pelegrino, Caxias do Sul, RS, Brasil
Fone 54 3214 4095, FAX: 54 3215 1695
e-mail: pasquaf@hotmail.com Fabio@conception-rs.com.br

RESUMO

Existem várias razões pelas quais os valores clínicos tradicionais que se incluem dentro de uma análise de sêmen são neste momento amplamente debatidos. E isto ocorre especialmente depois da introdução na prática reprodutiva da técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI). Infelizmente, a sensação que se pode ter é que o especialista em reprodução humana necessita conhecer somente de algumas características seminais para alcançar seu objetivo; por exemplo, saber da existência de uma globozoospermia.

O objetivo do nosso estudo é fazer uma breve revisão sobre a morfologia de acordo com o critério estrito.

Palavras-chave: sêmen, espermatozóide, morfologia, infertilidade

ABSTRACT

There are several reasons for the intense debate about the traditional clinical values in a regular semen analysis. This occurs specially after the introduction of the intracytoplasmic sperm injection technique in reproduction. Unfortunately, the feeling that we may have is that the specialist in human reproduction needs to know about some seminal characteristics to reach his goal, for instance, the knowledge about globozoospermia.

The goal of our study was to write a brief revision about sperm morphology according to the strict criteria.

Key-words: semen, sperm, morphology, infertility

Recebido em: 04/01/2006
Avaliado e aceito em: 15/08/06

MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZÓIDES

É necessário reconhecer a grande confusão que reina quando nos referimos especificamente à definição de normalidade no critério morfologia dos espermatozóides (Morgentaler et al., 1995; Pasqualotto et al., 2003). Esta confusão se faz mais evidente ao comprovar que atualmente, no mundo inteiro são utilizados métodos de avaliação muito diferentes quanto ao critério morfologia dos espermatozóides (Kruger et al., 1986; Enginsu et al., 1991). Esta é a razão pela qual estas diferenças têm impedido alcançar um consenso do valor diagnóstico deste parâmetro.

Nos últimos anos o tema da morfologia espermática tem merecido uma atenção especial entre os profissionais dedicados a esta área da reprodução humana (Kruger et al., 1988; Menkveld et al., 1990). Comprova-se a importância da morfologia quando se avalia estudo recente, o qual demonstrou que dentre as três características seminais mais importantes do sêmen (concentração, motilidade e morfologia) a morfologia de Kruger é a mais importante para predizer fertilidade (Guzick et al., 2001). O que é amplamente aceito é que a morfologia espermática e a motilidade progressiva são as características seminais que melhor se correlacionam com a fertilidade. Faz-se então necessária uma discussão sobre os critérios estritos desenvolvidos por Kruger e fazer uma correlação sobre a sua aplicação como ajuda diagnóstica na andrologia clínica.

Nos antigos sistemas de avaliação morfológica aplicados aos seres humanos, a atenção se aplicava sobre a cabeça dos espermatozóides, descrevendo-a como uma estrutura oval de contorno suave dividida em uma região anterior (acrossoma propriamente dito), e uma região posterior ou pós-acrossoma. Por sua vez, se considerava que a célula devia apresentar uma cauda simples com uma união axial simétrica firmemente unida à cabeça. Na realidade, não se levava em conta outras considerações. Desta forma, as anormalidades morfológicas

deveriam ser priorizadas na seguinte ordem: primeiro estudar a cabeça dos espermatozoides e depois a peça intermediária e após as diferentes porções da cauda.

Na verdade, as mudanças ocorridas ao introduzir padrões para a avaliação e interpretação de resultados, têm produzido disputa entre investigadores e clínicos (Pasqualotto et al., 2003). Estas mudanças com o passar do tempo demonstraram a importância da aplicação de um rígido controle de qualidade interno, o qual é essencial mesmo para observadores muito experientes.

É importante destacar que, à primeira vista, não há uma equivalência entre normalidade morfológica e capacidade fértil do gameta, já que nem todos os espermatozoides normais são capazes de fertilizar e alguns considerados “não tão normais” podem fazê-lo. Como exemplo, podemos mencionar gametas que aparentemente apresentam uma morfologia normal ao estudá-la por microscopia óptica, mas que pertencem a um paciente com síndrome de Kartagener ou de flagelos imóveis.

Na realidade, a análise da morfologia como parte de um estudo seminal é somente uma descrição da forma e estrutura do gameta, sem considerar que a célula está sujeita a um processo que incide realmente sobre ela, como por exemplo, a preparação das lâminas para realizar o estudo da morfologia (Moraes, 1983). Logo, a avaliação que habitualmente se realiza é indireta e qualquer interpretação que derive de um estudo populacional talvez seja pouco sensível para aplicá-la em casos individuais (Pasqualotto et al., 2003).

Estudos morfométricos realizados na década de 70 haviam estabelecido as dimensões precisas da cabeça do espermatozoide humano e as diferenças existentes entre indivíduos considerados normais e pacientes subfértiles (Van Duijn Voorst, 1972). Uma nova perspectiva surgiu a partir dos anos 80, que estabeleceu que a interpretação do estudo da morfologia deveria levar em consideração os aspectos fisiológicos do espermatozoide em sua passagem pelo trato reprodutivo feminino. E estes abrangem aqueles critérios de seleção próprios dos gametas que migram pelo muco cervical (Kruger et al., 1986). Autores como Menkveld, em 1970, realizaram estudos da morfologia espermática em testes pós-coitais, na investigação de casais inférteis na Clínica de Andrologia do Hospital de Tygerberg na África do Sul (denomina-se “critério estrito de Tygerberg” em homenagem à cidade sul-africana homônima) (Kruger et al., 1986). Amostras de sêmen e muco cervical eram retiradas do *pool* vaginal do ectocérvix e do endocérvix, duas horas após o intercursos sexual. O material era estudado em sua motilidade, na sua quantificação espermática, na sua velocidade de progressão retilínea e no estudo da morfologia espermática em preparados corados pelo corante de Papanicolaou. O resultado mostrou uma significativa presença de espermatozoides de morfologia “normal”. Cerca de 90% dos espermatozoides presentes eram de formas normais, quando nas frações excelentes do muco endocervical, enquanto a morfologia dos espermatozoides das frações do *pool* vaginal assemelhavam-se ao do sêmen original. Tais achados levaram Menkveld a afirmar que os critérios de avaliação usados anteriormente para a morfologia espermática eram muito “leves” e que havia a necessidade de um “novo critério” para que o espermatozoide fosse considerado normal.

Com o objetivo de iniciar o estudo da nova morfologia espermática, Menkveld visitou o laboratório do Prof. David, em Paris. Ficou claro que Menkveld já aplicava, desde o início, o critério estrito em seu serviço. Com Eliasson, em seis estudos usando o critério estrito, encontrou cerca de 45,2% de formas normais, enquanto aquele especialista, aproximadamente 57,5%. Após visitar seis laboratórios europeus, em três

meses, Menkveld começou a preparar sua tese de PhD, a qual versava sobre a importância da avaliação espermática, dando ênfase aos espermatozoides encontrados no muco cervical do canal endocervical e sua morfologia em um critério bem definido de normalidade, usando preparados com boas colorações e uma avaliação padronizada. Junto com Kruger publicou seus princípios, descrevendo a importância clínica na aplicação do critério estrito na avaliação morfológica espermática (Kruger et al., 1986). Podemos dizer que a migração pelo *cumulus* depende claramente da motilidade espermática e em particular do movimento hiperativado. Desta forma, aparentemente, a seleção morfológica não necessitaria se reproduzir especificamente com base nas características morfométricas do espermatozoide, e sim poderia ocorrer de forma indireta por meio da motilidade e talvez junto com outros fenômenos fisiológicos (Menkveld et al., 1990).

Van Dyk e colaboradores concluíram que a zona pelúcida humana tem a capacidade de selecionar espermatozoides aneuplóides por um mecanismo ainda desconhecido (Van Dyk et al., 2000). Para que este mecanismo exista, a zona pelúcida necessita ter capacidade de avaliação do conteúdo genético do gameta que a ela se une. Do descoberto podemos inferir que estruturas tais como o muco cervical, o *cumulus oophorus* e a zona pelúcida poderiam atuar como barreira, onde a seleção espermática seria originada, apesar de que não constitui um processo de seleção em si mesmo.

À luz dos conhecimentos atuais, podemos olhar a morfologia espermática com uma perspectiva diferente em comparação com os trabalhos históricos que se baseavam em conceitos puramente descritivos. Desta forma, uma melhor definição de normalidade espermática pode ser realizada como aquele espermatozoide que pode alcançar o sítio de fertilização *in vivo* e que é capaz de se unir à zona pelúcida.

Em algumas espécies animais e também nos homens, ocorre uma grande variedade de formas promovendo uma heterogeneidade particular às amostras. Apesar disso, quando este conceito se tentou aplicar em humanos, o mesmo resultou ser pouco útil, visto que foram registrados resultados com marcadas diferenças entre laboratórios e ainda dentro dos integrantes de um mesmo laboratório (Ombelet et al., 1997; Ombelet et al., 1998).

Utilizando os critérios atuais, a descrição de um espermatozoide morfológicamente normal é a seguinte: a cabeça deve ter uma configuração oval e contornos suaves, de 4 μm a 5 μm no eixo longitudinal, 2,5 μm a 3,5 μm de largura, com acrossoma perfeitamente definido de 40% a 70% na parte anterior da cabeça.

Existe também um segundo tipo de gameta ligeiramente diferente, mas de cabeça ainda normal. A cabeça é de forma oval, mas mantém um contorno regularmente suave com forma ligeiramente alongada na parte posterior. Além disso, os gametas normais, não devem apresentar defeitos na cabeça, peça intermediária ou cauda. Por sua vez, a peça intermediária deve ser delgada e unida axialmente, de menos de 1 μm de largura e aproximadamente uma vez e meia a longitude da cabeça. A gota citoplasmática não deve ser maior de 30% do tamanho da cabeça para ser considerado normal. A cauda deve ser delgada, uniforme e ligeiramente mais fina que a peça intermediária, de 45 μm aproximadamente e não enrolada. Além disso, os chamados espermatozoides “borderline” devem ser considerados anormais. Um fato de interesse é que a morfologia dos espermatozoides unidos firmemente à zona pelúcida é similar àqueles encontrados no muco cervical de um bom teste pós-coital (Kruger et al., 1986).

Tem que levar em conta que o termo estrito não se refere somente a um único aspecto como é o critério de normalidade espermática; o método é também estrito com relação às

variações permitidas, como o método de coloração utilizado na avaliação do processo (Moraes et al., 1983).

Tem-se demonstrado, além disso, que a morfologia espermática considerada em termos da proporção de formas normais observadas no preparo está significativamente relacionada com a concepção *in vivo*, com a fertilização *in vitro* e com os testes funcionais espermáticos. Por sua vez, a FIV tem demonstrado sua importância no tratamento dos casais inférteis e tem permitido estabelecer os princípios fisiológicos básicos tanto na indução da ovulação como na infertilidade masculina.

Como mencionamos anteriormente, o valor clínico dos critérios estritos de Tygerberg como ferramenta prognóstica na FIV foi originalmente demonstrado por Kruger em 190 ciclos de tratamento (Kruger et al., 1986). Quando as formas morfológicamente normais se encontravam acima de 14%, a taxa de fertilização (de oócitos metafase II somente) foi de 82,5% com um nível de gravidez de 25,8%. Em 1988, os autores publicaram um segundo estudo onde descreveram apenas homens com menos de 14% de formas normais (Kruger et al., 1988). Foi neste estudo que foi descrito pela primeira vez dois subgrupos de pacientes, ou seja, aqueles de bom prognóstico que apresentavam entre 5% e 13% de formas normais e outro de mau prognóstico com menos de 4% com uma taxa de fertilização de 63,9% e 7,4% respectivamente.

CONCLUSÕES

A morfologia espermática normal é um dado relevante na avaliação do casal infértil e em especial, quando se utilizam critérios estritos, temos uma informação valiosa no prognóstico de fertilização *in vitro* assim como nos resultados de gravidez. Um valor de 5% de formas normais é também de relevância clínica para a FIV, dado que se observou uma diferença importante na taxa de gestação em grupos com valores menores.

Nos últimos anos, alguns autores têm opinado que é desvantajoso estudar o tamanho da cabeça espermática em colorações fixadas previamente, já que são desconhecidas, entre outros fatores, a viabilidade e a motilidade das células em estudo. Finalmente, podemos chegar a uma decisão que a implementação da avaliação da morfologia dos espermatozóides pelo critério estrito de Kruger é a maneira correta de realizar o manejo de protocolos clínicos. Especialmente quando se requer uma técnica como ICSI em lugar de FIV, ou quando exista uma boa expectativa de gravidez usando baixa complexidade em lugar de FIV. Isto exige do laboratório de andrologia cuidados extremos na realização dos estudos morfológicos, utilizando as melhores técnicas disponíveis para fornecer um diagnóstico correto.

REFERÊNCIAS

- Enginsu M.E., Dumoulin J.C.B., Pieters M.H.E.C., Bras M., Evers J.L.H., Geraedts J.P.M. - Evaluation of human sperm morphology using strict criteria after Diff-Quik staining: correlation of morphology with fertilization *in vitro*. Hum. Reprod. 6: 854 - 858, 1991.
- Guzick D.S., Overstreet J.W., Factor-Litvak P., Brazil C.K., Nakajima S.T., Coutifaris C., Carson S.A., Cisneros P., Steinkampf M.P., Hill J.A., Xu F., Vogel D.L. - Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. N. Engl. J. Med. 345: 1388 - 1393, 2001.
- Kruger T.F., Menkveld R., Stander F.S.H., Lombard C.J., van Der Merwe J.P., van Zyl J.A., Smith K. - Sperm morphology features as a prognostic factor in *in vitro* fertilization. Fertil. Steril. 46: 1118 - 1123, 1986.
- Kruger T.F., Acosta A.A., Simmons K.F., Swanson R.J., Matta J.R., Oehninger S. - Predictive values of abnormal sperm morphology in *in vitro* fertilization. Fertil. Steril. 49: 112 - 117, 1988.
- Menkveld R., Stander F.S., Kotze T.J., Kruger T.F., van Zyl J.A. - The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to strict criteria. Hum. Reprod. 5: 586 - 592, 1990.
- Moraes G.E.S. - Espermocitologia humana. Original técnica de fixação em vapores de formol. Coloração Leishman. Rev. Hosp. Clin. Porto Alegre 3(1): 121 - 141, 1983.
- Morgentaler A., Fung M.Y., Harris D.H., Powers R.D., Alper M.M. - Sperm morphology and *in vitro* fertilization outcome: a direct comparison of WHO and strict criteria methodologies. Fertil. Steril. 64: 1177 - 1182, 1995.
- Ombelet W., Bosmans E., Janssens M., Cox M., Veasse-laer J., Gyselaers W., Vandeput H., Gielsen J., Pollet H., Maes M., Steeno O., Kruger T. - Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing. Hum. Reprod. 12: 987 - 993, 1997.
- Ombelet W., Bosmans E., Janssen M., Cox A., Maes M., Punjabi U., Bleton V., Gunst J., Haidl G., Wouters E., Spiessens C., Bornman M.S., Pienaar E., Menkveld R., Lombard C.J. - Multicenter study on reproducibility of sperm morphology assessment. Arch. Androl., 41: 103 - 114, 1998.
- Pasqualotto F.F., Locambo C.V., Athayde K.S., Arap S. - Measuring male infertility: epidemiological aspects. Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo 58: 173 - 178, 2003.
- Van Duijin Voorst C., Hellings G. - Precision measurements of dimensions, shape and mass density of spermatozoa heads in normal and subfertile males. Eur. J. Obstet. Gynecol. 2: 37 - 54, 1972.
- Van Dyk Q., Lanzendorf S.L., Kolm P., Hodgen G.D., Mahony M.C. - Incidence of aneuploid spermatozoa from subfertile men: selected with motility versus hemizona-bound. Hum. Reprod. 15: 1529 - 1536, 2000.

Nascimento de Bebê Após Congelamento de Óvulos

Baby birth after oocytes cryopreservation

**Frantz N; Ferreira M; Oliveira N P;
Frantz G; Höher M**

Centro de Reprodução. Humana. Nilo Frantz – Porto Alegre, RS
e-mail: marcelo@frantz.med.br

INTRODUÇÃO

A criopreservação de oócitos é uma alternativa viável para preservar a fertilidade de pacientes que se submetem à radio e quimioterapia, cirurgias ovarianas ou ainda, que desejarem prevenir os efeitos fisiológicos da idade. Representa, também, uma ótima opção para os casais que não desejam criopreservar embriões por conflitos éticos e religiosos. No Brasil, existem poucos casos descritos de gestações com óvulos congelados. Relatamos neste trabalho o nascimento de um bebê a partir do congelamento de oócitos.

DESCRIÇÃO DO CASO

A paciente de 24 anos, teve indicação de ICSI por fator masculino severo (oligospermia com concentração de $0,3 \times 10^6$ espermatozoides/ml). A indução da ovulação foi feita com ciclo longo, usando análogos do GnRH (nafarelina), FSH recombinante e HMG urinário. Foram coletados 19 oócitos, desses 15 M2 e 4 imaturos. Nove oócitos foram inseminados através de ICSI, com a posterior transferência de 3 embriões, porém a paciente não engravidou. Os 6 oócitos maduros restantes, foram congelados. Utilizou-se protocolo de congelamento lento com 1,5M 1,2 PROH e 0,3M de sacarose. Sessenta dias após, realizou-se o descongelamento. No preparo do endométrio, utilizou-se 17b estradiol com doses

crescentes via oral até o endométrio atingir 9mm e aspecto trilaminar e, então, suplementação com progesterona natural micronizada, via vaginal, na dose de 800mg diárias. Dos seis óvulos maduros (M2) congelados, 5 sobreviveram ao congelamento (83% de sobrevivência), com taxa de fertilização de 80% (4 dos 5 viáveis), clivagem de 60% (3 de 5), obtendo-se em 3 embriões viáveis para transferência. Foram transferidos, no terceiro dia, 3 embriões: 1 GI, 1 GII e 1 GIII, resultando numa gravidez de feto único. O pré-natal transcorreu sem complicações, resultando no nascimento por cesariana de um bebê normal, com 39 semanas, pesando 3630 gramas e medindo 53 cm.

DISCUSSÃO

Recentemente, houve um aumento de interesse na criopreservação de oócitos. O desenvolvimento novos protocolos, como o utilizado nesse caso, melhoraram muito os resultados da técnica. As taxas de sobrevivência e fertilização obtidas em nosso estudo, são comparáveis às encontradas na literatura. A qualidade dos oócitos é um fator importante a ser considerado, pois oócitos de mulheres mais jovens, resistem melhor ao processo de congelamento. A criopreservação de oócitos é uma técnica promissora, tornando-se mais uma opção da reprodução assistida no auxílio dos casais inférteis.

2006

Reproduction and malignant disease15 – 16 Setembro
Barcelona - Espanha**XXII Congresso Brasileiro de Reprodução Humana**

4 a 07 de outubro de 2006 - Curitiba - PR

Informações - Equipe de Eventos

Tel.: (41) 3022-1247

E-mail - ekipe@ekipedeeventos.com.br

http://www.sbrh.med.br

ASRM – Annual Meeting

21- 25 Outubro

Nova Orleans, USA

http://www.asrm.org/

XVIII Figo World Congress of Gynecology and Obstetrics

5 – 10 Novembro

Kuala Lumpur, Malásia

Canadian Fertility and Andrology Society 2006 Annual Meeting

15 – 18 Novembro

Ottawa, Ontario, Canadá

MENOPUR® - Menotropina altamente purificada - (75 UI de FSH + 75 UI de LH) - USO ADULTO - **FORMA FARMACÊUTICA:** Caixas com 1 ou 5 ampolas de diluente de 1 ml e 1 ou 5 frasco-ampolas com 75 UI de menotropina altamente purificada (FSH + 75 UI de LH) para injeção SC ou IM após preparo de solução. **INDICAÇÃO:** Esterilidade em mulheres com insuficiência hipo ou normogonadotróficas, para estimulação do crescimento folicular. Esterilidade em homens com hipogonadismo hipogonadotrófico, em combinação com hCG (gonadotrofina coriônica humana) para estimular a espermatogênese. **CONTRA-INDICAÇÕES:** Não deve ser utilizado em caso de hipersensibilidade às gonadotrofinas ou à lactose, e nos seguintes quadros: Em mulheres: Gravidez, mal formação de órgãos sexuais incompatíveis com uma gravidez; aumento dos ovários ou cistos que não tenham sido causados por síndrome de ovários policísticos; sangramento ginecológico com causa desconhecida; tumores do útero, ovários e mama. Em homens: Câncer de próstata ou testículos. As seguintes condições devem ser tratadas apropriadamente antes do início de aplicação de MENOPUR®: disfunções da glândula tireóide e do córtex da glândula supra-renal; aumento do nível sérico da prolactina com diferentes causas (hiperprolactinemia); tumores na glândula pituitária ou no diencéfalo (hipotálamo). **POSOLOGIA:** Na mulher: A dosagem de MENOPUR® para a indução do crescimento folicular em mulheres normo ou hipogonadotróficas depende da reação ovariana, e deve ser verificada através de exames ultra-sonográficos dos ovários e mensuração dos níveis de estradiol. Caso a dosagem de MENOPUR® for muito alta, podem ocorrer crescimentos foliculares uni e bilaterais múltiplos. Em geral, a terapia é iniciada com uma dosagem diária correspondente a 75-150 U.I. de FSH. Se os ovários não respondem, a dosagem pode ser gradativamente aumentada até surgirem evidências de aumento da secreção de estradiol e de crescimento folicular. O tratamento com a mesma dosagem de MENOPUR® é continuado até atingir-se um nível sérico de estradiol pré-ovulatório. Se o nível aumentar muito rapidamente, a dosagem deve ser reduzida. Para induzir a ovulação, 5.000 ou 10.000 U.I. de hCG (Gonadotrofina Coriônica Humana) são injetados intramuscularmente, 1 a 2 dias após a última administração de MENOPUR®. Observação: Após a administração de uma dose muito alta de MENOPUR®, a administração subsequente de hCG pode causar uma hiperestimulação involuntária dos ovários. No homem: Inicialmente, 1.000 - 3.000 U.I. de hCG (Gonadotrofina Coriônica Humana) são administrados 3 vezes por semana. Até atingir-se um nível sérico de testosterona normal. Então, 75-150 U.I. de MENOPUR® são administrados 3 vezes por semana, por alguns meses. **PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS:** O hCG (Gonadotrofina Coriônica Humana) não deve ser administrado para induzir a ovulação em mulheres cujos ovários foram involuntariamente hiperestimulados. **INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS:** A interação com outros medicamentos é desconhecida. **REAÇÕES ADVERSAS:** As seguintes reações podem ocorrer com a aplicação de gonadotrofinas recombinantes ou menotropinas em casos de síndrome de hiperestimulação ovariana grave: ascite, hidrotórax, oligúria, hipotensão e fenômenos tromboembólicos. Ocasionalmente, o tratamento é acompanhado por náusea e vômito. Em casos isolados, reações de hipersensibilidade e febre podem ocorrer. **EFEITOS COLATERAIS:** Os tratamentos com gonadotrofinas recombinantes ou menotropinas podem levar a uma hiperestimulação ovariana. Isto, contudo, torna-se geralmente clinicamente relevante apenas após a administração de hCG (Gonadotrofina Coriônica Humana) para induzir a ovulação. Levando à formação de grandes cistos ovarianos, que tendem a romper-se podendo também causar sangramento intra-abdominal. O tratamento deve ser imediatamente descontinuado quando os primeiros sinais de hiperestimulação forem detectados ultrasonograficamente e através de dores e distensão palpável no baixo abdômen. Com a gravidez, estes efeitos colaterais podem intensificar-se e continuar por um longo período de tempo, podendo tornar-se um risco de vida. A gravidez múltipla involuntária ocorre com maior frequência durante os tratamentos de reprodução assistida. **CONDUTA NA SUPERDOSAGEM:** a) Nenhuma terapia é necessária quando uma hiperestimulação leve está presente (Nível I), acompanhada por um ligeiro aumento dos ovários (tamanho dos ovários 5 - 7 cm), secreção de esteróides excessiva, e dor abdominal. Contudo, a paciente deve ser informada, e cuidadosamente observada; b) A supervisão clínica e o tratamento sintomático, e talvez uma reposição de volume intravenoso em caso de alta concentração de hemoglobina, são necessários caso haja a ocorrência de hiperestimulação moderada (Nível II) com presença de cistos ovarianos (tamanho do ovário 8 - 10 cm), acompanhada de sintomas abdominais, náusea e vômito; c) A hospitalização é imperativa quando ocorre a hiperestimulação séria (Nível III) com presença de grandes cistos ovarianos (tamanho do ovário maior que 10 cm), acompanhada de ascite, hidrotórax, abdômen distendido, dor abdominal, dispnéia, retenção de sais, aumento da concentração de hemoglobina e da viscosidade do sangue, agregação plaquetária com risco de tromboembolismos. **CUIDADOS DE ARMAGEMEM:** Manter o medicamento até 25°C. **VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA** - Laboratórios Ferring Ltda - SAC 0800 772 466

UTROGESTAN® - progesterona natural micronizada

USO ADULTO

Composição: cada cápsula contém progesterona 100 mg ou 200 mg; excipientes qsp. **Indicações:** UTROGESTAN® é indicado para os distúrbios relacionados à deficiência de progesterona, como alterações do ciclo menstrual e amenorréia secundária; na insuficiência lútea; na pré-menopausa e na reposição hormonal da menopausa (como complemento à terapia estrogênica). UTROGESTAN® via vaginal é indicado também na implantação do embrião e manutenção da gravidez durante o primeiro trimestre e como suporte da fase lútea durante os ciclos de reprodução assistida. **Contra-indicações:** este medicamento é contra-indicado em doenças graves do fígado. Hipersensibilidade do princípio ativo ou a qualquer outro componente da fórmula. **Precauções:** alterações leves ou moderadas da função hepática, pacientes com disfunção renal. **Advertências:** Este medicamento não trata todas as causas de aborto espontâneo precoce e, particularmente, ele não tem ação sobre abortos provenientes de defeitos genéticos (o que corresponde a mais da metade das causas de aborto). **Pacientes idosos:** Não há dados que indiquem a necessidade do ajuste de dose para a paciente idosa. **Gravidez** - Amamentação: Nenhuma relação entre o progesterona e malformações fetais foi observada durante diversos estudos epidemiológicos em mais de mil pacientes. **Interações medicamentosas:** o uso crônico de barbitúricos, carbamazepinas, hidantoinas ou rifampicina pode diminuir a eficácia de UTROGESTAN®. Por outro lado, UTROGESTAN® pode potencializar os efeitos farmacológicos da ciclosporina, teofilina ou beta-bloqueadores. **Posologia:** Via Oral: Na insuficiência de progesterona, na insuficiência lútea o regime de tratamento usual é de 200mg por dia: → 10 dias por ciclo, habitualmente do 17º dia ao 26º dia, inclusive. Em terapia de reposição hormonal para menopausa, a terapia estrogênica isolada não é recomendada (risco de hiperplasia endometrial). Conseqüentemente, a progesterona é combinada em dose de 200 mg por dia, da seguinte forma: → dose única de 200 mg à noite antes de dormir, de 12 a 14 dias por mês. Na dose de 200 mg é comum observar-se um sangramento de privação após o uso da progesterona. Via vaginal: Cada cápsula gelatinosa deve ser introduzida profundamente na vagina. Suplementação da fase lútea (segunda fase do ciclo menstrual) durante ciclos de FIV: A dosagem recomendada é de 400 a 600 mg por dia, divididos em duas a três doses, do dia da injeção HCG até a 12ª semana de gravidez. Suplementação da fase lútea durante ciclos espontâneos ou induzidos: a dosagem recomendada é de 200 a 400 mg por dia, divididos em duas doses, a partir do 17º dia do ciclo, durante 10 dias. O tratamento será rapidamente reiniciado se a menstruação não ocorrer novamente e, sendo diagnosticada uma gravidez, até a 12ª semana desta. Ameaça de aborto precoce ou prevenção de aborto comum devido à insuficiência lútea: a dosagem recomendada é de 200 a 400 mg por dia divididos em duas doses até a 12ª semana de gravidez. **Forma farmacêutica e apresentações:** UTROGESTAN® 200 mg é apresentado em caixas contendo blister com 14 cápsulas gelatinosas. UTROGESTAN® 100 mg é apresentado em caixas contendo blister com 30 cápsulas gelatinosas. **VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA.** Registro no M.S.: 1.0390.0167. Farm Resp.: Dr. Wessel de Oliveira Cunha CRF-RJ: 2184. Fabricado por: CAPSUGEL PLOERMEL. Zone Industrielle Carnagnon, B. P.320 - 56803 Poermel Cedex - Embalado por: Laboratórios Besins International Bélgica. Distribuído por: Farmoquímica S/A. Rua Yvúva Cláudio, 300 - Rio de Janeiro - RJ - Indústria Brasileira - CNPJ: 33.349.473/0003-10 - SAC 0800 25 0110 - Para ver o texto de bula na íntegra, acesse o site www.fqm.com.br