

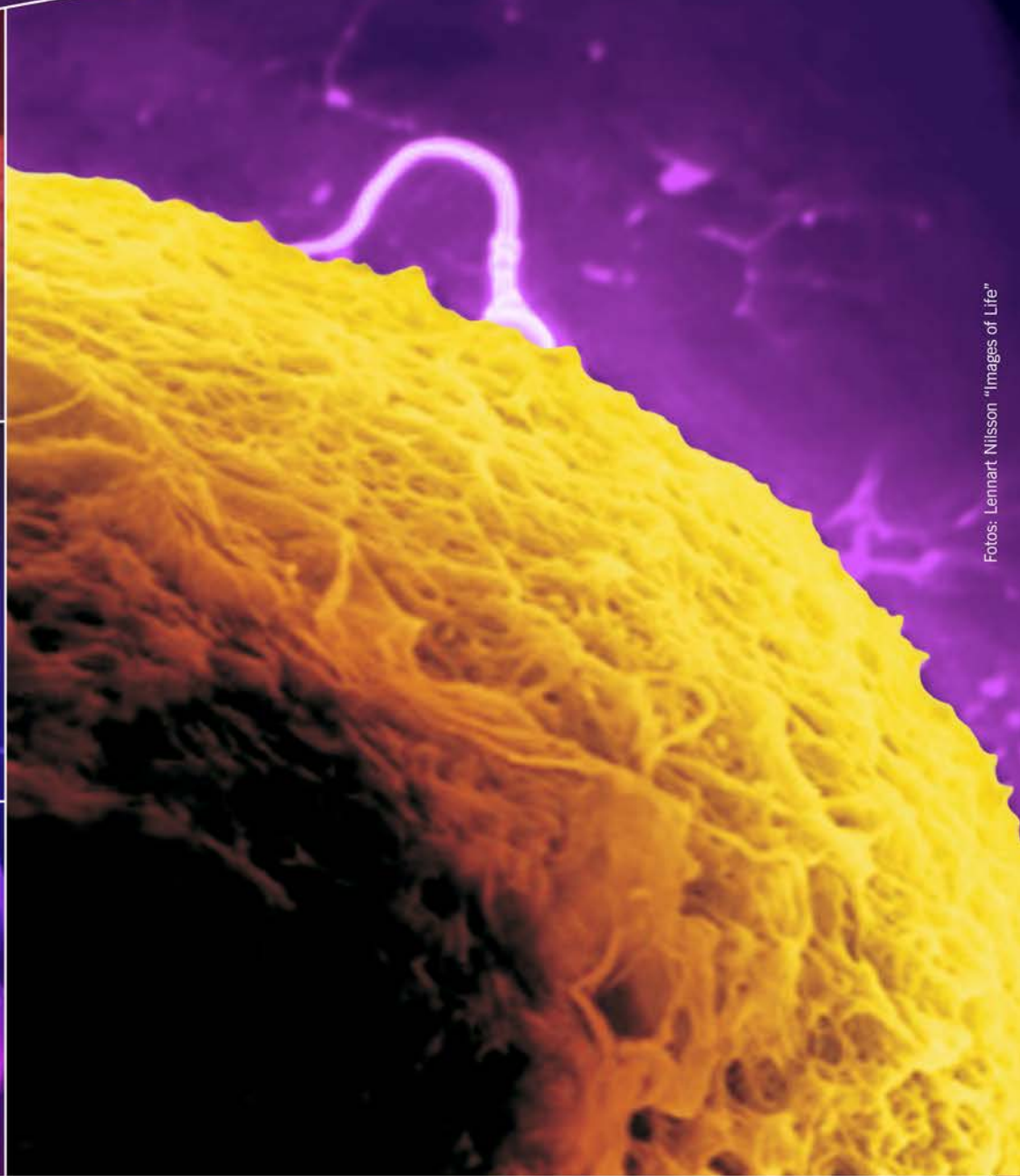
Volume 16
Number 1
Jan-Feb 2012
ISSN 1517-5693

JBRA

Assisted Reproduction



JORNAL BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA



Fotos: Lennart Nilsson "Images of Life"

*Veja a
obra de arte
que fizemos
juntos.*



Fertilidade.

Você. Nós. Somos os pais da fertilidade

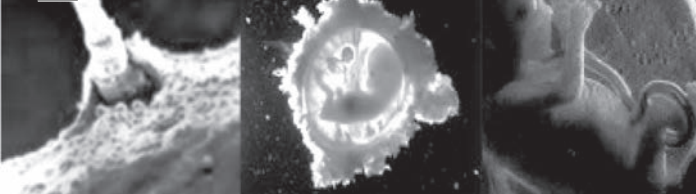
Merck Serono

SAC Merck Serono: 0800.113320

Anúncio veiculado em Maio de 2011.

Merck Serono é uma divisão da Merck.

MERCK



JBRA

Assisted Reproduction

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

ISSN: 1517-5693 - V. 16 | n°1 | Jan-Feb / 2012

INDEXADO NAS SEGUINTE BASES DE DADOS – Indexed on the following databases:

Compendex

EMBASE

Excepta Médica

Geobase

PERIODICA (México)

Plataforma SCImago Journal & Country Rank

PORTAL DE PERIÓDICOS DA CAPES

Scopus (Holanda)

JBRA - Assisted Reproduction

Jornalista Responsável:
Heber Maia – MTb 31.660

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



Produção Editorial e Gráfica:
AlamTec Ciência Médica Editorial LTDA
Rua das Roseiras, 464
CEP 03144-090 - São Paulo-SP
Tel/Fax: (11) 2341-8045
e-mail: alamtec@br.inter.net
www.alamtec.com.br

CORPO EDITORIAL – EDITORIAL BOARD

Editor – Editor

Maria do Carmo Borges de Souza (G&O Barra/
UFRJ RJ Brasil)

Editor Adjunto – Assistant Editor

Paulo Franco Taitson (ARQ / PUCMG Brasil)

Consultor Editorial - Editorial Consultant

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

Editores Associados – Associate Editors

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

João Batista A Oliveira (CRH SP Brasil)

Selmo Geber (Origen / UFMG Brasil)

Weydson Barros Leal (UFPE Brasil)

CONSULTORES CIENTÍFICOS – Scientific Reviewers

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

Aginaldo Lopes da Silva Filho (UFMG Brasil)

Alessandro Schuffner (Conceber PR Brasil)

Álvaro Petracco (Fertilitat/ PUC RS Brasil)

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

Anne R Greenlee (OHSN EUA)

Antonio Requena (IVI Madrid Espanha)

Aroldo Camargos (UFMG Brasil)

Bela Zausner (Gênese BA Brasil)

Bruno Scheffer (IBRRA MG Brasil)

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

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

Cesar Cafatti (Clín Los Dominicos Chile)

Claudia Borrero (Conceptum Colombia)

Claudia G Petersen (CRH SP Brasil)

Cláudio Chillik (CEGYR Argentina)

Condesmar Marcondes Filho (Nucl Santista
RH SP Brasil)

David Vantman (CER Chile)

Dirceu H Mendes Pereira (Profert SP Brasil)

Eduardo Pandolfi Passos (SEGIR / UFRGS RS Brasil)

Ernesto Gallardo Lozano (IMER México)

Fabio Firmbach Pasqualotto (Conception /
UCS RS Brasil)

Fernando Zegers-Hochschild (Clin Las Condes Chile)

Francisco Risquez (Clin La Trinidad Venezuela)

Francisco J.B. Sampaio (UERJ Brasil)

Humberto Ikuo Shibasaki (UFMT Brasil)

Jorge Blaquier (Fertilab Argentina)

João Pedro Junqueira Caetano (Pró-Criar/
Mater Dei MG Brasil)

Joaquim Roberto C Lopes (Cenafert BA Brasil)

Jonathas Borges Soares (Faculdade Medicina do ABC /
Projeto Alfa SP Brasil)

Juan Manuel Montoya (Conceptum Colombia)

Ivan Valencia Madera (CEMEFES Ecuador)

Karen Sermon (VUB Bélgica)

Leila Montenegro S Farah (Fertility / Faculdade de
Medicina de Jundiaí - Inst Sapientiae SP Brasil)

Leticia Urdapilleta (Cegyr Argentina)

Lídio Jair Ribas Centa (Androlab/ UFPR Brasil)

Luiz Fernando Dale (C Medicina RJ Brasil)

Madalena Caldas (GERAR PE Brasil)

Marcos Sampaio (Origen MG Brasil)

Mariângela Badalotti (Fertilitat PUC RS Brasil)

Marilena Correa (IMS-UERJ Brasil)

Mario Cavagna (H Perola B/ CRH SP Brasil)

Marisa Decat de Moura (IBBRA/Universidade
FUMEC BH Brasil)

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

Paulo Serafini (Huntington/ USP SP Brasil)

Ricardo Melo Marinho (FCMMG MG Brasil)

Roberta Wonchockier (Projeto Alfa SP Brasil)

Roberto Coco (Fecunditas Argentina)

Rose Marie M Melamed (Fertility SP Brasil)

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

Silvana Chedid Chedid-Grieco (SP Brasil)

Sergio Reis Soares (IVI Lisboa Portugal)

Renato Fanchin (Hôpital A. Bécère,
University Paris-Sud 11 França)

Inovação Recombinante.

Pergoveris

(alfafolitropina e alfalutropina)

Precisão,
pureza e
consistência
na associação
das duas
gonadotrofinas^{1,2}



Referências bibliográficas: 1. Basset R.M. et al. Continued improvements in the quality and consistency of follitropin alfa, recombinant human FSH. Reproductive BioMedicine Online. 2005; 10(2): 169-177(9). 2. Gervais A, et al. Glycosylation of recombinant gonadotrophins: characterization and batch-to-batch consistency. Glycobiology 2003; 13(3):179-189.

Bula do produto no interior desta publicação. Destinado exclusivamente à classe médica. Veiculado em junho de 2012.

Inovação Recombinante.

Pergoveris

(alfafolitropina e alfalutropina)

Pergoveris® alfafolitropina (r-hFSH) 150UI (11µg) alfalutropina (r-hLH) 75UI (3µg). USO SUBCUTÂNEO USO ADULTO **Indicações:** Pergoveris® é indicado para a estimulação do desenvolvimento folicular em mulheres com insuficiência grave de LH e FSH. Nos ensaios clínicos, estas pacientes foram definidas por um nível sérico de LH <1,2 UI/L. **Contra-indicações:** Hipersensibilidade à alfafolitropina, alfalutropina ou a qualquer dos excipientes; tumores do hipotálamo ou da hipófise; hipertrofia ou cistos ovarianos não originados por doença do ovário policístico; hemorragias ginecológicas de etiologia desconhecida; carcinoma do útero, ovário ou mama e nas situações em que não é possível a obtenção de uma resposta efetiva (insuficiência ovariana primária, malformações dos órgãos sexuais incompatíveis com gravidez e fibromiomas uterinos incompatíveis com gravidez). **Cuidados e Advertências:** Na mulher, a utilização segura e eficaz de Pergoveris® requer monitorização ecográfica regular da resposta ovariana, de preferência em conjunto com a determinação dos níveis séricos de estradiol. Deve ser utilizada em mulheres a dose mínima eficaz em relação ao objetivo do tratamento. As pacientes devem ser avaliadas para as seguintes situações, devendo ser instituído um tratamento específico apropriado: hipotireoidismo; insuficiência da supra-renal; hiperprolactinemia; tumores do hipotálamo ou da hipófise. A síndrome de hiperestimulação ovariana (OHSS) é uma situação clínica distinta da hipertrofia ovariana assintomática, podendo se manifestar em graus crescentes de gravidade. Uma resposta excessiva ovariana ao tratamento com gonatropinas raramente origina uma OHSS, exceto quando se administra hCG para induzir a ovulação. Portanto, em casos de hiperestimulação ovariana é prudente não administrar hCG e recomendar à paciente que se abstenha de ter relações sexuais ou utilize métodos anticoncepcionais de barreira, durante pelo menos 4 dias. Em mulheres submetidas à indução da ovulação, a incidência de gravidez e nascimentos múltiplos é aumentada quando comparada à concepção natural. A maioria das concepções múltiplas é de gêmeos. Gravidez e aleitamento: Pergoveris® não deve ser administrado durante a gravidez ou o aleitamento. **Reações adversas:** Cefaléia, exacerbação de asma, dor abdominal e sintomas gastro-intestinais, tromboembolismo normalmente associado com síndrome de hiperestimulação ovariana grave (OHSS), reações no local da injeção. Reações alérgicas sistêmicas leves (eritema cutâneo, edema, urticária, dificuldades respiratórias) e graves (reações anafiláticas). Cistos ovarianos, dor mamária, dor pélvica, OHSS, torção do ovário. **Interações medicamentosas:** Pergoveris® não deve ser administrado com outros medicamentos na mesma seringa, exceto com alfafolitropina. **Posologia:** O tratamento deve ser adaptado à resposta individual da paciente. Um regime posológico recomendado inicia-se com a administração diária de um frasco de Pergoveris®. Caso um aumento da dose de FSH seja considerado apropriado, o ajuste da dose deve ser efetuado preferencialmente após intervalos de 7-14 dias e com incrementos de 37,5 a 75 UI, utilizando um medicamento contendo alfafolitropina. Pode ser aceitável prolongar a duração da estimulação em qualquer um dos ciclos por até 5 semanas. Quando se obtém uma resposta ótima, deve ser administrada uma única injeção de 5.000 UI a 10.000 UI de hCG, 24 a 48 horas após a última injeção de Pergoveris®. Recomenda-se que a paciente tenha relações sexuais no dia da administração de hCG e no dia seguinte. Caso se obtenha uma resposta excessiva, o tratamento deve ser interrompido e hCG não deve ser administrado. O tratamento deve ser reiniciado no ciclo seguinte, com uma dose de FSH inferior à do ciclo anterior. **Cuidados de conservação:** Prazo de validade: 24 meses. Este medicamento é de uso único e deve ser utilizado imediatamente após abertura e reconstituição. Conservar em temperatura entre 15 e 30°C. Conservar na embalagem original para proteger da luz. VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA. SAC Merck Serono: 0800-113320. Registro MS: 1.0089.0360.

Contraindicação: carcinoma do útero, ovário ou mama. **Interação medicamentosa:** Pergoveris® não deve ser administrado com outros medicamentos na mesma seringa, exceto com alfafolitropina.

AO PERSISTIREM OS SINTOMAS, O MÉDICO DEVERÁ SER CONSULTADO.

Destinado exclusivamente à classe médica. Veiculado em junho de 2012.

DIRETORIA DA SBRA - 2011/2012

PRESIDENTE

Adelino Amaral Silva

VICE PRESIDENTE

Edson Borges Júnior

SECRETÁRIO

Paulo Franco Taitson

TESOUREIRA

Hitomi Miura Nakagava

DEPARTAMENTO DE PUBLICAÇÕES

EDITORA

Maria do Carmo Borges de Souza

EDITOR ADJUNTO

Paulo Franco Taitson

e-mail: jornalsbra@cmb.com.br

Diretoria da REDLARA - 2011-2014

DIRETORA EXECUTIVA

Maria do Carmo Borges de Souza

Brasil

E-mail: direjecutiva@redlara.com

mariadocarmo@cmb.com.br

VICE DIRETOR EXECUTIVO

Roberto Coco

Argentina

E-mail: robertococo@fecunditas.com.ar

DIRETORES REGIONAIS

REGIÃO: Costa Rica, El Salvador, Guatemala, México, Panamá, República Dominicana

Carlos Félix Arce

México

carfelar@infosel.net.mx

REGIÃO: Bolívia, Chile & Peru

Fabrizio Vizcarra Alosilla

Peru

favizcarraredlara@gmail.com

REGIÃO: Colômbia, Equador & Venezuela

María Teresa Urbina

Venezuela

E-mail: mturbina@hotmail.com

REGIÃO: Argentina, Paraguai & Uruguai

Gabriel Fiszbajn

Argentina

E-mail: fiszbajn@cegyr.com

REGIÃO: Brasil

Selmo Geber

Brasil.

E-mail: selmogeber@origen.com.br

SECRETÁRIA EXECUTIVA

Marina Díaz

México

E-mail: info@redlara.com

INFORMAÇÕES GERAIS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TIPOS DE ARTIGOS PUBLICADOS

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

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

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

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

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

PREPARAÇÃO DOS ORIGINAIS

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

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

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

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

PÁGINA DE ROSTO

A página de rosto deve conter:

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

RESUMO E ABSTRACT

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

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

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

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

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

1. Artigo de periódico

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

2. Livro

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

3. Capítulo de livro

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

4. Artigo de revista eletrônica

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

5. Artigo publicado na Internet:

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

6. Site

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

7. Software

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

TABELAS E FIGURAS

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

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

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

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

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

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

ENVIO/SUBMISSÃO DE ARTIGOS

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

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

GENERAL INFORMATION

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TYPES OF PUBLISHED ARTICLES

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

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

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

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

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

PREPARATION OF ORIGINAL PAPERS

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

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

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

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

TITLE PAGE

The title page should carry the following information:

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

RESUMO AND ABSTRACT

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

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

ACKNOWLEDGEMENTS

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

REFERENCES

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

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

1. Journal Article

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

2. Book

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

3. Book Chapter

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

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

4. Electronic Journal Article

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

5. Article published in the Internet:

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

6. Site

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

7. Software

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

TABLES AND FIGURES

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

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

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

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

Graphs should be two-dimensional only.

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

MAILING/SUBMISSION OF ARTICLES

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

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

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

INFORMACIONES GENERALES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TIPOS DE ARTÍCULOS PUBLICADOS

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

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

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

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

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

PREPARO DE LOS ORIGINALES

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

Siglas deben ser definidas por extenso en la primera ocurrencia en el texto; después de la primera ocurrencia, solamente la sigla deberá ser utilizada. En el resumen, el uso

de siglas debe ser evitado.

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

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

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

HOJA FRONTAL

La hoja frontal debe contener:

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

RESUMEN Y ABSTRACT

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

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

AGRADECIMIENTOS

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

REFERENCIAS

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

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

1. Artículo de periódico

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

2. Libro

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

3. Capítulo de libro

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

4. Artículo de revista electrónica

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

5. Artículo publicado en Internet:

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

6. Sitio web

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

7. Software

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

Tablas y figuras

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

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

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

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

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

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

ENVÍO DE ARTÍCULOS

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

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

Editorial
A Latin American publication on the rise

Maria do Carmo B. Souza and Paulo F. Taitson15

Artigo Original**Viabilidad de embriones de ratón re-vitrificados sucesivamente**

María A. Masciangioli, María Teresa Urbina, Randolph Medina16

Urinary human chorionic gonadotropin to trigger final oocyte maturation: 5000 X 10000 IU - is there any difference?

Marcello Valle, Matheus Roque, Marcos Sampaio, Selmo Geber19

Melhorias da qualidade do ar do laboratório, de ISO classe 7 para ISO classe 5, melhora resultados de ICSI em mulheres inférteis jovens

Bruno Ramalho de Carvalho, MD, MSc, Adelino Amaral Silva, MD, Íris de Oliveira Cabral, BS, David Barreira Gomes Sobrinho, MD, MSc, Hitomi Miura Nakagawa, MD, Antônio César Paes Barbosa, MD23

Avaliação do uso da metformina no resultado ovulatório de pacientes portadoras de síndrome de ovários policísticos resistente ao uso isolado do citrato de clomifeno

Roberto Carlos Machado, Natalia de Andrade Machado, Selmo Geber27

Razão de chance elevada para Gravidez Ectópica em pacientes com obstrução tubária atendidas em clínicas de fertilização assistida

Fabiana Carmo Approbato, Mario Silva Approbato, Rodopiano Florencio, vMonica Canedo Silva Maia, Tatiana Moreira da Silva32

Reprodução assistida - Dois modelos de regulação: Portugal vs. Espanha

Vera Lúcia Raposo35

Artigo de Revisão**Revisando os efeitos da concentração de oxigênio sobre o desenvolvimento embrionário**

David Barreira Gomes Sobrinho, João Batista Alcântara Oliveira, Bruno Ramalho de Carvalho, José Gonçalves Franco Júnior44

Infertilidade masculina e obesidade - associação e bases fisiopatológicas

Ludmila Machado Neves, Michele Lopes Pedrosa, Maria do Carmo Borges de Souza49

Relato de Caso**Gravidez obtida pela técnica “Real Time Lapse Embryoscope”**

Juliano Brum Scheffer, Paola Xavier, Bruno Brum Scheffer, Rafaela Brum Scheffer53

Eventos

.....58

A Latin American publication on the rise

Very good news about the performance of the JBRA Assisted Reproduction. In Brazil, the areas of Medicine and Public Health II and Medicine III scores increased in CAPES (Coordination of Improvement of Higher Education Personnel) to B3 and B4.

It was considered important to be in the Dutch database SCImago! Our impact factor increased from two years ago from B5 to B3 and B4. This means that we have the actual conditions of the academic score in graduate courses.

It is a pleasure to share with all this data.

To get an idea, three years ago we were B5, with appointments in four areas of education. Today we are more than 11 different areas, which shows the different interfaces. In Brazil our newspaper is now scored as equal to RBGO, the main Brazilian Journal of Gynecology and Obstetrics.

Congratulations to all who write and trust in the journal for the presentation of their work and to our readers who can enjoy the best of research in Latin America, with pride.

However, there are many topics to improve and continue the pursuit of excellence.

By the way, have you submitted a paper this semester?

Best regards,

Maria do Carmo B. Souza and Paulo F. Taitson

Editors

Viabilidad de embriones de ratón re-vitrificados sucesivamente

Viability of re-vitrified mouse embryos at successive stages of development

Lic. María A. Masciangioli^{1, 2, 3}, M.Sc. María Teresa Urbina¹, M.Sc. Randolph Medina¹

¹ Unidad de fertilidad UNIFERTES, Clínica El Ávila, Caracas, Venezuela.

² Universidad Simón Bolívar, Sartenejas, Venezuela.

³ Teléfono: +584122835903. Email: mariale.mn@gmail.com

Trabajo ejecutado en UNIFERTES, Clínica El Ávila, Caracas, Venezuela.

Financiamiento propio.

Presentado como Poster en 10° Congreso General de la Red Latinoamericana de Reproducción Asistida. Río de Janeiro, Brasil. Mayo de 2011.

RESUMO

Para avaliar os efeitos da vitrificação de embriões novamente, estudamos a viabilidade, desenvolvimento e formação de blastocistos de embriões de rato após 3 de envase em etapas sucessivas de 2, 4 e 8 células, respectivamente. Foi utilizado o kit e RapidWarm™ RapidVit™ Cleave Vitrolife®, técnica CryoLoop™. As taxas de sobrevivência de clivagem e formação de blastocisto de rato que tinha sido re-vitrificado três vezes em comparação com as taxas de embriões de camundongos foram congeladas somente uma vez e com o relatado na literatura. Os índices foram obtidos tarde de sobrevivência, de clivagem e formação de blastocistos de 97,5%, 100% e 88,89%, respectivamente, os embriões re-vitrificado. Os resultados sugerem que a re-vitrificação de embriões é uma técnica segura que pode ser feito sem afetar a sobrevivência de clivagem e desenvolvimento embrionário.

Palavras-chave: embrião de mamífero, a criopreservação, vitrificação, a fertilização in vitro de blastocistos.

ABSTRACT

To evaluate the effects of re-vitrification of embryos, we studied the feasibility, development and blastocyst formation in mouse embryos after 3 successive vitrifications in stages 2, 4 and 8 cells, respectively. We used the RapidWarm™ and RapidVit™ Cleave kits from Vitrolife®, with the CryoLoop™ technique. The survival rates, cleavage rates and blastocyst formation rates of mouse embryos that were vitrified three times, were compared with the rates of mouse embryos that were frozen only once, and with the information reported in the literature. The final survival, cleavage and blastocyst formation rates obtained were: 97.5%, 100% and 88.89%, respectively in the re-vitrified embryos. The results suggest that the re-vitrification of embryos is a safe technique that can be done without affecting the survival, cleavage and development to blastocysts.

Keywords: mammalian embryo, cryopreservation, vitrification, in vitro fertilization, blastocyst.

RESUMEN

Para evaluar los efectos de la re-vitrificación de embriones, se estudió la viabilidad, el desarrollo y la formación de blastocistos en embriones de ratón luego de 3 vitrificaciones sucesivas, en estadios de 2, 4 y 8 células, respectivamente. Se utilizaron los kit RapidVit™ y RapidWarm™ Cleave de Vitrolife®, con la técnica del CryoLoop™. Las tasas de supervivencia, de clivaje y de formación de blastocistos de ratón que habían sido re-vitrificados tres veces, se compararon con las tasas de embriones de ratón que sólo habían sido congelados una vez y con lo reportado en la literatura. Se obtuvieron tasas finales de supervivencia, de clivaje y de formación de blastocistos de 97,5%, 100% y 88,89

% respectivamente, en los embriones re-vitrificados. Los resultados sugieren que la re-vitrificación de embriones es una técnica segura que se puede realizar sin afectar la supervivencia, el clivaje ni su desarrollo hasta blastocistos.

Palabras clave: Embrión de mamífero, criopreservación, vitrificación, fertilización in vitro, blastocisto.

INTRODUCCIÓN

La criopreservación de embriones juega un papel esencial en la reproducción asistida (RA), ya que provee a las pacientes la oportunidad de tener más de un intento de tratamiento luego de una fecundación in vitro (FIV), aumentando las tasas acumuladas de embarazo (Anderson et al., 2004; Balaban et al., 2008). También contribuye a la reducción de embarazos múltiples y a la reducción de los costos para el paciente, y permite transferir embriones en ciclos siguientes, evitando el efecto nocivo de la estimulación ovárica al endometrio y mejorando la sincronización entre el endometrio y el estadio del embrión a ser transferido.

La vitrificación es un método de criopreservación muy eficiente, que produce resultados superiores a los de congelación lenta en gametos y embriones (Balaban et al., 2008; Aflatoonian et al., 2010), ya que evita la formación de hielo intracelular. Muchos estudios han demostrado que la vitrificación produce altas tasas de supervivencia de embriones y ovocitos, así como altas tasas de embarazo (Balaban et al., 2008; Loutradi et al., 2008; Kuwayama y Leibo, 2008; Lane y Gardner, 2001; Smith et al., 2010; Aflatoonian et al., 2010). Existen algunos reportes de re-vitrificación de embriones de ratón (8) y de unos pocos casos clínicos en humanos (Hashimoto et al., 2007; Hiraoka et al., 2006; Hiraoka et al., 2007; Hiraoka et al., 2009; Kumasako et al., 2009; Mauri et al., 2010; Özmen et al., 2006; Son, 2005; Takahashi y Araki, 2004; Yokota et al., 2001).

La re-vitrificación de embriones descongelados o entibiados puede ser requerida en algunos casos como: cancelación de la transferencia de embriones por tratamientos médicos imprevistos, motivos personales, presencia de endometrio con líquido o de mala calidad, niveles inmunológicos alterados, o en casos con embriones supernumerarios (Özmen et al., 2006). El objetivo del presente trabajo es evaluar las tasas de supervivencia, de clivaje y de formación de blastocistos de embriones de ratón re-vitrificados en estadios sucesivos de su desarrollo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó la evaluación de la viabilidad de diez embriones de ratón descongelados en estadio de 1 célula (*Conception Technologies*). Los embriones fueron posteriormente vitrificados, entibiados y re-vitrificados sucesivamente en los estadios de 2,4 y 8 células y blastocisto (Figura 1). Se evaluó la calidad embrionaria y las tasas de supervivencia, clivaje

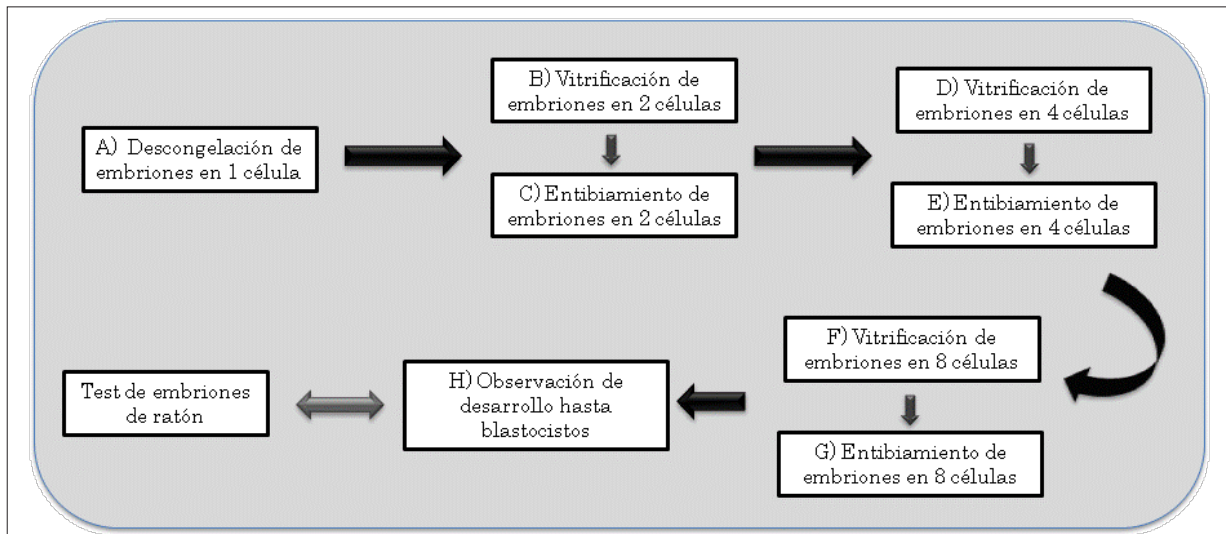


Fig. 1. Esquema de los procesos de criopreservación de los embriones de ratón en los diferentes estadios de desarrollo.

y formación de blastocistos luego de cada ciclo de vitricación, con respecto a los resultados obtenidos con el test de embriones de ratón que se utiliza como control de calidad, en el laboratorio de FIV de la Unidad de fertilidad Unifertes. Se utilizó el protocolo descrito por *Conception Technologies* para la descongelación de los embriones, añadiendo un paso extra de exposición a medio G-MOPS Plus™ (*Vitrolife*®), con HSA a 37°C por 5 minutos antes de ser colocados en el medio de cultivo para reanudar su desarrollo, tal como se indica en el protocolo de *Vitrolife*.

Para la vitricación de los embriones se utilizó el kit *Rapid-Vit™ Cleave* (*Vitrolife*®) y para el entibiamiento el kit *RapidWarm™ Cleave* (*Vitrolife*®). El dispositivo utilizado para la vitricación fue el *Cryoloop™* (*Hampton Research*), que consiste en un *loop* de nylon de 20 micrones de diámetro que está colocado al final de una fina barra de acero inoxidable. Los procedimientos de vitricación y entibiamiento se desarrollaron a 37°C, estandarizando los tiempos de exposición, para embriones de ratón, a las soluciones *Warm 1™ Cleave*, *Warm 2™ Cleave*, *Warm 3™ Cleave* y *Warm 4™ Cleave* en 45 segundos, 1:30 minutos, 3 minutos y 5 minutos, respectivamente.

El cultivo de embriones se realizó bajo aceite en microgotas de medio G1.5™ (*Vitrolife*®) y G2.5™ (*Vitrolife*®), en incubadoras Minc™ (*Cook Medical*), bajo condiciones de 37°C, 6% CO₂, 5% O₂ y 89% N₂ (Gardner y Lane, 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del proceso de vitricación en los distintos estadios de desarrollo de los embriones (n = 10), se obtuvo una tasa de supervivencia de 100% luego de la descongelación en 1 célula. Luego del entibiamiento en 2, 4 y 8 células la tasa de supervivencia fue de 100, 90 y 100 %, respectivamente (Tabla 1). La tasa de supervivencia total, de clivaje y de formación hasta blastocistos de los embriones fue de 97,5%, 100% y 88,89%, respectivamente (Tabla 2). La calidad embrionaria de los embriones en 2,4 y 8 células fue de Grado I (Figura 2). Los resultados del control son provenientes del Test de embriones de ratón realizados en la unidad de fertilidad para el control de calidad de los medios. Los resultados de re-vitrificación son similares a los reportados en embriones de ratón en clivaje utilizando la técnica del *Cryoloop* (Sheehan et al., 2006) y concuerdan con antecedentes de embarazos y nacimientos exitosos en casos clínicos (Hashimoto et al., 2007; Hiraoka et al., 2006; Hiraoka et al., 2007; Hiraoka et al., 2009; Kumasako et al., 2009; Mauri et al., 2010; Özmen et al., 2006; Son, 2005; Takahashi y Araki, 2004; Yokota et al., 2001) y a los de varios autores que han reportado que la vitricación es una técnica que genera resultados consistentes y exitosos tanto en óvulos como en embriones (Balaban et

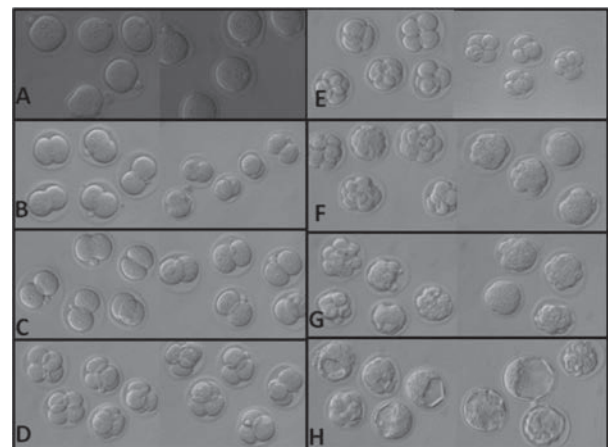


Fig. 2. Fotografías de los embriones de ratón antes y después del proceso de vitricación, de acuerdo a lo descrito en la Figura 1.

Tabla 1. Número de embriones que sobreviven luego de la congelación en 1 célula y re-vitrificación en los estadios de 2, 4 y 8 células hasta su desarrollo a blastocisto

Embriones que sobreviven a la vitricación y el entibiamiento					
Estadio	1 célula	2 células	4 células	8 células	Blastocisto
N° de embriones	10/10	10/10	9/10	9/9	8/9
Porcentaje de embriones %	100	100	90	100	88,89

Tabla 2. Tasas de clivaje, desarrollo hasta blastocisto y supervivencia de los embriones re-vitrificados y de embriones control no vitrificados. *Test de embriones de ratón.

Tasa (%)	Embriones estudio	Embriones control*
Supervivencia	97,5%	100%
Clivaje	100%	100%
Formación de blastocistos	88,89%	>80%

al., 2008; Sheehan et al., 2006; Cobo et al., 2010; Lane et al., 1999). Recientemente se demostró que la congelación no aumenta las aneuploidías, sino que más bien la congelación y la re-congelación disminuyen las aneuploidías. La vitrificación puede ser más benigna aún que la congelación. Otsu et al. sugieren que estos procesos pueden seleccionar a los embriones anormales (Otsu et al., 2009). Recientemente la re-vitrificación se ha empleado en embriones humanos que requieren el análisis de todos los cromosomas, para la técnica se requiere tomar una biopsia del blastocisto y luego vitrificarlos para esperar el resultado de la evaluación cromosómica, en varias oportunidades ha sido necesario vitrificar los blastocistos al menos dos veces, observándose que los resultados son similares a los obtenidos con blastocistos vitrificados una sola vez (Cobo et al. 2011; Schlenker et al., 2011).

La tasa de formación de blastocistos en los embriones re-vitrificados sucesivamente en este estudio (88,89%), es similar a la considerada normal para el Test de embriones de ratón (no sometidos a criopreservación) que se realiza para el control de calidad de los medios (>80%). Se evaluó la tasa de desarrollo hasta este estadio, ya que es un buen indicador de la viabilidad del embrión. Adicionalmente, se observó la eclosión de dos blastocistos, proceso después del cual está en capacidad de implantarse en el útero, lo que sugiere que la integridad del embrión se mantiene luego de los sucesivos tratamientos de vitrificación y entubamiento. La morfología de los blastocistos se caracterizó por la presencia de un trofoectodermo bien cohesionado y una masa de células internas bien compactada (Figura 2). Estos resultados sugieren que la vitrificación y la re-vitrificación son procedimientos seguros que no afectan el desarrollo de los embriones hasta el estadio de blastocisto.

CONCLUSIONES

Los resultados de la vitrificación de embriones de ratón en estadios de clivaje sugieren que esta técnica es segura e inocua para el desarrollo de los embriones. Estos resultados también sugieren que la vitrificación es un procedimiento seguro y la re-vitrificación también lo es, pudiéndose realizar si es necesario.

REFERÊNCIAS

Aflatoonian A, Oskouian H, Ahmadi S y Oskouian L. Can fresh embryo transfers be replaced by cryopreserved-thawed embryo transfers in assisted reproductive cycles? A randomized controlled trial. *J Assist Reprod Genet.* 2010; 27 (7): 357-63.

Anderson AR, Weikert ML y Crain JL. Determining the most optimal stage for embryo cryopreservation. *Reprod Biomed Online.* 2004; 8: 207-11.

Balaban B, Urman B, Ata B, Isiklar A, Larman M.G, Hamilton R. y Gardner DK. A randomized controlled study of human Day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation. *Hum Reprod.* 2008; 23 (9): 1976-82.

Cobo A, Meseguer M, Remohí J. y Pellicer A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum Reprod.* 2010; 25: 2239-46.

Cobo A, De los Santos JM, Daamià C, Pellicer A, Remohí J. Effect of re-vitrification of embryos achieved following oocyte vitrification on the new born rate. *Fertil Steril.* 2011; 96 (3) Supplement: S73-4.

Gardner DK, y Lane M. Embryo Culture Systems En Gardner, DK. In vitro Fertilization: A Practical Approach. New York: Informa Healthcare USA, Inc; 2007; 221-82.

Hashimoto S, Murata Y, Kikkawa M, Oku H, Murata T, Sugihara K, Nagata F, Nakaoka Y, Fukada A y Morimoto Y. Successful delivery after the transfer of twice-vitrified embryos derived from in vitro matured oocytes: A Case Report. *Hum Reprod.* 2007; 22 (1): 221-3.

Hiraoka K, Fuchiwaki M, Hiraoka K, Horiuchi T, Murakami T, Kinutani M y Kinutani K. Re-cryopreservation by Vitrification of Human Blastocysts Developed from Frozen-Cleaved Embryos: A Report of 15 Cycles. *J Mamm Ova Res.* 2007; 24: 23-8.

Hiraoka K, Hiraoka K, Horiuchi T, Kusuda T, Okano S, Kinutani M, et al. Case Report: successful delivery following the transfer of human re-vitrified day-7 spontaneously hatched blastocyst developed from vitrified cleaved embryos. *J Assist Reprod Genet.* 2009; 26: 405-9.

Hiraoka K, Hiraoka K, Kinutani M, y Kinutani K. Successful dizygotic twin pregnancy following re-cryopreservation by vitrification of human expanded blastocysts developed from frozen cleaved embryos on day 6: a case report. *J Reprod Med.* 2006; 51: 213-6.

Kumasako Y, Otsu E, Ultsunomiya T, Araki Y. The efficacy of the transfer of twice frozen-thawed embryos with the vitrification method. *Fertil Steril.* 2009; 91 (2): 383-6.

Kuwayama M y Leibo SP. Efficiency of the cryotop method to cryopreserve human oocytes; analysis of in vitro and in vivo results at eleven IVF clinics. *Fertil Steril.* 2008; 90: S281-2.

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

Lane M, Schoolcraft W y Gardner DK. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil Steril.* 1999; 72 (6): 1073-8.

Loutradi K, Kolibianakis E, Venetis C, Papanikolaou E, Pados G, Bontis I y Taratzis B. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2008; 90 (1): 186-93.

Mauri A, Petersen CG, Oliveira JBA, Baruffi RLR, Al-Hasani S, Franco Jr JG. Embryos refrozen-thawed by vitrification lead to live births: Case report. *Middle East Fertil Soc J.* 2011; 16:93-7.

Otsu E, Sato A, Utsonomiya T, Araki Y, Ujiie S. Chromosome analysis of human refrozen embryos following fluorescence in situ hybridization. *Reprod Med Biol.* 2009; 8: 103-6.

Ozmen B, Schultze-Mosgau A, Schöpper B, Griesinger G, Diedrich K y Al-Hasani S. CASE REPORT: Ongoing pregnancy after re-vitrification of cleavage stage embryos. *Middle East Fertil Soc. J* 2006; 11(3): 222-5.

Sheehan C, Lane M y Gardner D. The CryoLoop facilitates re-vitrification of embryos at four successive stages of development without impairing embryo growth. *Hum Reprod.* 2006; 21 (11): 2978-84.

Schlenker T, McCormick S, Rawlins J, Stevens J, Schoolcraft W. Clinical success with two rounds of vitrification and comprehensive chromosome screening. *Fertil Steril.* 2011; 96 (3)Supplement: S73.

Smith GD, Serafini P, Fioravanti J. Yadid I, Coslovsky M, Hassun P. Alegretti JR, Motta EL. Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification. *Fertil Steril.* 2010; 94 (6): 2088-95.

Son WY, Lee SY, Chang MJ, Yoon SH, Chian RC, Lim JH. Pregnancy resulting from transfer of repeat vitrified blastocysts produced by in-vitro matured oocytes in patient with polycystic ovary syndrome. *Reprod Biomed Online.* 2005; 10 (3): 398-401.

Takahashi T, Araki Y. Successfully healthy baby delivery from human refrozen blastocyst embryo by vitrification. *J Mamm Ova Res.* 2004; 21: 162-5.

Yokota Y, Yokota H, Yokota M, Sato S, Araki Y. Birth of healthy twins from in vitro development of human frozen embryos. *Fertil Steril.* 2001; 76 (5): 1063-5.

Urinary human chorionic gonadotropin to trigger final oocyte maturation: 5000 X 10000 IU – is there any difference?

Gonadotrofina coriônica humana urinária para desencadear a maturação oocitária final: 5000 x 10000 IU – existe alguma diferença?

Marcello Valle, Matheus Roque, Marcos Sampaio, Selmo Geber

Instituição: ORIGEN, Centro de Medicina Reprodutiva, Belo Horizonte /MG

RESUMO

Objetivo: Comparar os resultados de ciclos de Fertilização in vitro (FIV) com o uso de diferentes doses (10000 IU e 5000 IU) de gonadotrofina coriônica humana urinária para desencadear a maturação oocitária.

Métodos: Este é um estudo prospectivo, observacional com 108 pacientes em ciclos de FIV, que apresentavam mais de 15 folículos com um diâmetro >17mm, observados no dia da administração do hCG. Os 2 grupos de comparação foram definidos de acordo com as doses de hCG administradas ~36 horas antes da punção ovariana: Grupo 1 (10 000 IU) e Grupo 2 (5000 IU), em um protocolo longo de hiperestimulação ovariana.

Resultados: Grupo 1 teve 74 pacientes (idade média 33,46±3,9) e o Grupo 2 teve 34 pacientes (idade média 32,43±5,4). Todas as pacientes foram submetidas à punção ovariana com mais de 15 folículos. Os níveis de estradiol no dia da administração do hCG foram 3567±620 no Grupo 1 e 4060±730 no Grupo 2, p=0,38. O número médio de oócitos maduros foi de 15,21±3,7 (Grupo 1) e 21,4±5,22 (Grupo 2), p<0,001. Não houve diferença significativa entre os grupos com relação às taxas de gestação clínica, gestação em curso, abortamento e na incidência de síndrome de hiperestímulo ovariano grave.

Conclusão: Observamos que o uso de uma dose menor de hCG urinário (5000 IU) ao invés da dose tradicional (10000 IU) usada para induzir a maturação oocitária final, parece não afetar negativamente os resultados de FIV e a incidência de síndrome de hiperestímulo grave não foi diferente.

ABSTRACT

Objective: To compare the results of IVF cycles using different doses (10000 IU e 5000 IU) of urinary human chorionic gonadotropin for triggering final oocyte maturation.

Methods: This is a prospective and observational study of 108 patients submitted to IVF/ICSI cycles, who had more than 15 follicles with a diameter > 17 mm on the day of hCG administration. The two groups were defined according to the doses of hCG they were administered ~36 hours before oocyte retrieval: Group 1 (10 000 IU) and Group 2 (5 000 IU), in a long protocol for controlled ovarian hyperstimulation.

Results: Group 1 had 74 patients (mean age 33.46±3.9) and group 2 had 34 patients (mean age 32.43±5.4). All patients were submitted to egg collection with more than 15 follicles. Estradiol levels on the day of the hCG administration was 3567±620 in Group 1 and 4060±730 in group 2, p=0.38. The median number of mature oocytes was

15.21±3.7 (Group 1) and 21.4±5.22 (Group 2), p<0.001. There was no statistically significant difference between the groups in clinical PR, ongoing PR, miscarriage and in the incidence of severe Ovarian Hyperstimulation Syndrome.

Conclusion: We observed that the use of a lower dose of urinary hCG (5000 IU) instead of the traditional dose (10000 IU) used for triggering final oocyte maturation, does not appear to adversely affect the IVF outcomes, and the incidence of severe OHSS was not different.

Keywords: urinary human chorionic gonadotropin, hCG dose, oocyte maturation, ovarian hyperstimulation syndrome

INTRODUCTION

The human chorionic gonadotropin (hCG) is used in controlled ovarian hyperstimulation (COH), to replace the endogenous LH surge and simulates its physiologic effects to induce final follicular and oocyte maturation (Wang et al, 2011). HCG is a heterodimeric hormone belonging to glycoprotein hormone and cystine-knot growth factor families and it is a natural analogue of LH. Both LH and hCG interact with the same receptor (LH/hCG receptor) and this interaction is associated with the initiation and maintenance of pregnancy (Filicori et al, 2005; Laphorn et al, 1994). The events consequents of the LH rising on the follicular phase in natural cycles, can be reproduced by the use of hCG in IVF cycles. The reproduction of these events is essential to the treatment success. The main effects of the LH rising are: the final oocyte maturation, oocyte dissociation from the follicular wall and the corpus luteum formation. The hCG represents an efficient form of substituting the LH activity, because the both hormones binds to the same receptor and exerts similar functions. In in vitro fertilization (IVF) treatments, we can use the urinary hCG (u-hCG) or the recombinant hCG (r-hCG) for final oocyte maturation (Filicori et al, 2005; Kolibianakis et al, 2007; Driscoll et al, 2000).

HCG circulating half-life is greater than 24 hours, which is longer than the LH's (approximately 60 minutes), and persists up to 6 days after ovulation. The hCG has a higher affinity to the receptor and a lower clearance than the LH. It simulates the LH rising and induces reactivation of oocyte meiosis (Tsoumpou et al, 2009; Saleh et al, 2007). The hCG is either important in the early stages of pregnancy. It also seems to have beneficial effects in uterine receptivity by the stimulation of the endometrial growth and maturation, and either interacts with the LH/hCG receptors in the endometrium promoting the maintenance of the corpus luteum (Tsoumpou et al, 2009; Licht et al, 2003).

Despite having a key role in the controlled ovarian stimulation treatments, the hCG is also associated with development of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). OHSS is an iatrogenic complication of the COH during assisted reproductive technology (ART). It may occur during the luteal phase or during the early pregnancy. It almost always occurs during the ART, but it may occur during treatments with the use of clomiphene citrate and even in a spontaneous pregnancy (Delvigne, 2009; Nastri et al, 2010; Delvigne, 2002; Michaelson-Cohen, 2008). The real incidence of OHSS is difficult to determine, because the different studies report different incidences, according to the classification that is used to classify the OHSS. But, the incidence of moderate and severe OHSS are estimated to be between 3 to 6% and 0.1 to 3%, respectively (Delvigne, 2009; Nastri et al, 2010).

There are different doses of u-hCG that can be used to trigger the final oocyte maturation, ranging from 3000 IU to 25000 IU, but the optimal dose is not well established (Tsoumpou, 2009; Nargung, 2007). There are some studies in animals demonstrating that the hCG dose necessary for ovulation is higher than that necessary for oocyte maturation (Schmidt, 2004). Therefore, as in the IVF treatment the use of hCG is necessary only to the oocyte maturation and not to induce the ovulation, it can be postulated that the u-hCG dose required would probably be lower than the dose normally used (10000 IU). The purpose of this study was to compare the results of IVF cycles, including the number of mature oocytes retrieved, clinical pregnancy rate, ongoing pregnancy and the incidence of severe OHSS, using different doses (10000 IU e 5000 IU) of u-hCG for triggering final oocyte maturation. We hypothesized that the dose of 5000 IU would be adequate for the final oocyte maturation.

MATERIALS AND METHODS

This was a prospective observational study to assess the hypothesis that using a lower dose of u-hCG (5000 IU versus 10000 IU) for final oocyte maturation would not decrease the IVF outcomes and could lower the risk of severe OHSS. The study was designed in a private assisted reproduction center (Clínica Origen – Rio de Janeiro - Brasil).

The inclusion criteria were as follows: 1) first IVF cycle; 2) age < 38 years; 3) serum day 3 FSH levels < 10 IU/L and E2 < 80 pg/mL; 4) absence of endometriomas detected at ultrasound; 5) more than 15 follicles with a mean diameter of 16 mm, seen on ultrasound on the day of hCG administration. The exclusion criteria were as follows: 1) age ≥ 38 years; 2) serum day 3 FSH levels ≥ 10 IU/L; 3) patients who did not undergo their first IVF treatment; 4) patients who were coasted more than two days; 5) severe male factor infertility (< 5 million motile spermatozoa/mL and/or requiring testicular sperm extraction). Ovarian stimulation consisted of a long protocol for ovarian stimulation. For pituitary down-regulation, patients were treated with a GnRH agonist depot, administered SC on day 21 of the menstrual cycle. All patients were evaluated after 10 days of agonist administration with serum estradiol levels and transvaginal sonography. When pituitary down-regulation was confirmed (no follicles > 10mm present and serum estradiol levels < 80 pg/mL) hMG or recombinant FSH were given in a step-down protocol. Serial ultrasound examinations and serum E2 levels were used to assess ovarian response, and to adjust the gonadotropin dose. The patients received a trigger dose of either 10000 IU or 5000 IU of purified urinary hCG when at least 3 follicles reached 17mm diameter.

Table 1. Patients and cycle characteristics in groups of patients randomized to receive 10000 IU or 5000 IU for triggering final oocyte maturation

Parameter	Group 1 (10000 IU)	Group 2 (5000 IU)	p value
Number of patients	74	34	
Age (years)	33.46±3.9	32.43±5.4	> 0.05
Peak E2 (pg/mL)	3567±620	4060±730	0.38
No. follicles > 17 mm on the day of hCG	20.17±4.23	26.51±7.6	<0.001
Metaphase II oocytes	15.21±1.28	21.4±1.91	<0.001

*Values are mean±SD

Oocyte retrievals were performed ~36 hours after hCG administration and ICSI was performed in all cases. All patients received luteal phase support with vaginal progesterone starting the day after oocyte retrieval and continued up 12 weeks of pregnancy. Embryo transfer was performed 48-72 hours after oocyte pick-up.

Comparisons between the two groups were made for: age, estradiol levels on the day of hCG administration, the number of mature oocytes retrieved, clinical pregnancy rates, ongoing pregnancy rates, miscarriage and the incidence of severe OHSS. Clinical pregnancy was considered as the presence of gestational sac with fetal heart activity, as assessed by ultrasound at 7 weeks of gestation. Ongoing pregnancy was defined as pregnancy progressing beyond the 12th gestational week.

Data were expressed as mean±SD. $P < 0.05$ was considered statistically significant. The normality of distribution of variables was tested with Kolmogoroff-Smirnov test. Independent sample *t*-test was used for continuous variables which were normally distributed and Mann-Whitney *U* test for data not normally distributed. Chi-squared test with Yates correction or Fisher exact test was used for qualitative variables. The Statistical Package for Social Science (SPSS, version 17.0 for windows; SPSS Inc., Chicago, IL) was used for data analysis.

RESULTS

The patient and cycle characteristics of the groups randomized to receive 5000 or 10000 IU of hCG for triggering final oocyte maturation are shown in Table 1. There were no statistically significant differences regarding demographic characteristics among the groups. The E2 levels on the day of hCG administration, the mean number of follicles > 17mm on the hCG day and the mean number of mature oocytes retrieved are shown. The number of follicles and the number of mature oocytes retrieved were statistically significant different. Group 1 (10000 IU hCG) had 20.17±4.23 follicles and group 2 (5000 IU hCG), 26.51±7.6 ($p = 0.0001$). Among mature oocytes retrieved, the media in group 1 was 15.21±1.28 and in group 2, it was 21.4±1.91. Table 2 and Figure 1 show the IVF outcomes of the two groups with respect to the clinical pregnancy rates, ongoing pregnancy rates, miscarriage and frequency of OHSS. There was no statistically significant difference between the groups in the clinical pregnancy rate (Group 1, 55.4%; Group 2, 52.94%; $p = 0.81$), ongoing pregnancy rate (Group 1, 50 %; Group 2 47%; $p = 0.77$) and miscarriage (Group 1, 9.7%; Group 2 11.1%; $p = 0.87$). Severe OHSS occurred in two patients (2.7%) in the Group 1 and in two patients (5.7%) in the 5000 IU group with no statistically significant difference ($p = 0.41$). Seve-

re OHSS occurred in two patients (2,7%) in the 10000 IU group and in two patients (5,9%) in the Group 2, with no statistically significant difference ($p=0.41$).

DISCUSSION

This prospective study suggests that there are no significant differences in IVF outcomes, when comparing 10000 x 5000 IU of u-hCG to trigger final oocyte maturation in IVF cycles in high responder patients treated with a long protocol for ovarian hyperstimulation. Despite some differences in the number of mature oocytes retrieved (more oocytes retrieved in the lowest dose), the pregnancies rates were not different between the two groups. Also the incidence of severe OHSS was similar in the two groups. Currently, there are some studies that have compared different doses of hCG for triggering final oocyte maturation and cycle outcomes. But it has not been established the ideal dose to be used. There are different results and comparisons among the studies. Tsoumpou et al. conducted a systematic review in order to establish the ideal dose of u-hCG to trigger final oocyte maturation without increasing the incidence of OHSS. They concluded that the dose of hCG should be individualized. Good responders do not need to receive higher doses than 5000 IU, whereas poor responders would benefit from higher doses of HCG. A meta-analysis was not feasible due the insufficiently number of studies assessing the same outcome and significant heterogeneity (Tsoumpou et al, 2009). It could be expected a decrease in the number of oocytes recovered, in the number of mature oocytes and in the fertilization rates with the use of a lower dose of u-hCG (Kolibianakis et al, 2007). Abdalla et al analyzed the effects of 2000 IU, 5000 IU and 10000IU. When 2000 IU of hCG was used for final oocyte maturation, lower number of oocytes were retrieved comparing with the group that received 5000 IU or 10000 IU but there was no significant difference in pregnancy rates. They concluded that the lowest dose of hCG that should be used is 5000 IU (Abdalla et al, 1987). In a prospective study, Wikland et al. found no difference in the number of mature oocytes, pregnancy rates (PRs), and delivery rates when 5000 IU hCG and 10000 IU hCG were used. There was no statistically difference in the live birth rate when comparing the groups receiving 5000 or 10000 IU (Wikland et al, 1995). Prien et al. compared the clinical outcomes of final oocyte maturation with 5000 IU or 10000 IU of u-hCG. There was no difference on the oocyte recovery and PRs (Prien et al, 2000).

In our study, we had different results when the number of oocytes retrieved was analyzed. The group that received the lowest dose of hCG had more mature oocytes, but this same group had more follicles up to 15 mm in the day of hCG administration. This is in accordance with the study of Detti et al. In a retrospective cohort study in antagonist cycles, they compared the use of 5000 IU, 10000 IU and 15000 IU and observed the higher number of oocytes retrieved in the group of highest levels of estradiol in whom the lowest doses of u-hCG were administered (Detti et al, 2007).

Schmidt et al retrospectively evaluated the use of different doses of hCG (3300 IU versus 5000 IU) in high responders patients submitted to a long protocol of ovarian stimulation and the use of urinary gonadotropins. The different doses were given based on E2 levels on the day of final oocyte maturation. There were no differences between the groups in the percentage of mature oocytes, biochemical pregnancy and clinical pregnancy (Schmidt et al, 2004).

Table 2. IVF outcomes in groups of patients randomized to receive 10000 IU or 5000 IU for triggering final oocyte maturation

Parameter	Group 1 (10000 IU) N = 74	Group 2 (5000 IU) N = 34	p value
Clinical Pregnancy Rate	41 (55.4%)	18 (52.9%)	0.81
Ongoing Pregnancy Rate	37 (50%)	16 (47%)	0.77
Miscarriage	4 (9,7%)	2 (11,1%)	0.87
Severe OHSS	2 (2.7%)	2 (5.9%)	0.41

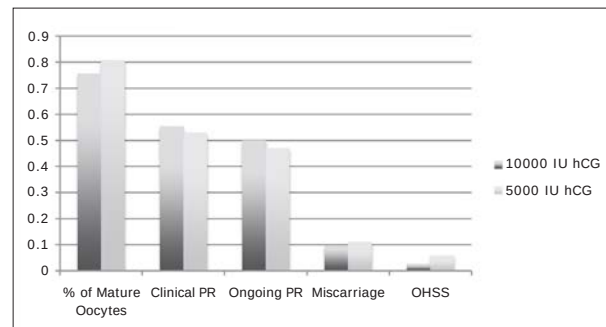


Fig. 1. IVF outcomes in patients receiving 10000 IU of hCG versus 5000 IU of hCG

In a randomized controlled trial, Kolibianakis et al compared the use of 2500 IU, 5000 IU, and 10000 IU in antagonist cycles in women with polycystic ovarian syndrome. They demonstrated that a decrease in the dose of hCG up 2500 IU can be used without modifying the results in terms of oocyte recovery and ongoing pregnancy rate (Kolibianakis et al, 2007).

HCG may have some adverse effects due to its long half-life. One of this is an increased risk to develop the OHSS. The incidence of OHSS in cycles using different doses of u-hCG was studied by Schmidt et al. and Kolibianakis et al. and they found no difference in the incidence of OHSS reducing the dose of u-hCG administered (Kolibianakis et al, 2007; Schmidt et al, 2004). This is in accordance with our study, where we did not find differences in severe OHSS despite the dose of u-hCG. But the sample size was not big enough to show a conclusive result. Considering that the incidence of severe OHSS in IVF cycles ranges from 0,1 to 3% of all cycles, it would be necessary at least 4131 patients in each group of patients to show that by lowering the u-hCG dose, the incidence is decreased by 1%. So, it would not be feasible to conduct a single study with this amount of patient (total number of 8262) trying show a significant difference in the incidence of OHSS with different doses of hCG. Patients with OHSS remain a challenge in the ART. It is important to try to identify the risk patients and have a close segment of these patients. Currently, with the GnRH antagonist protocol, we can avoid the use of the hCG in the high risk patients using the GnRH analogue to induce the final oocyte maturation and oocyte or embryo cryopreservation, eliminating the risk of the development of early or late OHSS in these patients.

We need more robust randomized trials to have a definition of the ideal dose of u-hCG to be administered for final oocyte maturation. But we can suggest with this study and other studies available in the literature that the use of 5000 IU of u-hCG instead of the traditional dose of 10000 IU would not negatively affect the IVF outcomes.

Correspondência

Selmo Geber: Av do Contorno 7747, Belo Horizonte – Minas Gerais – CEP 30110120 – selmogeber@origen.com.br - Tel.: 31 21026332 / Fax: 31 21026334

REFERENCES

- Abdalla HI, Ah-Moye M, Brinsden P, Howe DL, Okonofua F, Craft I. The effect of the dose of human chorionic stimulation on oocyte recovery rates in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1987; 48: 958-63.
- Delvigne A, Rozenberg S. Epidemiology and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): a review. *Hum Reprod Update* 2002; 8: 559-77.
- Delvigne A. Symposium: Update on prediction and management of OHSS. *Reprod Biomed Online* 2009; 19 (1): 8-13.
- Detti L, Mitwally M, Rode A, Yelian FD, Kruger M, Diamond MP, Puscheck EE. Serum human chorionic gonadotrophin level after ovulation triggering is influenced by the patient's body mass index and the number of larger follicles. *Fertil Steril* 2007; 88: 152-5.
- Driscoll GL, Tyler JP, Hangan JT, Fisher PR, Birdsall MA, Knight DC. A prospective, randomized, controlled, double-blind, double-dummy comparison of recombinant and urinary HCG for inducing oocyte maturation and follicular luteinization in ovarian stimulation. *Hum Reprod* 2000; 15: 1305-10.
- Filicori M., Fazleabas AT, Huhtaniemi I, Licht P, Rao CV, Tesarik J, Zygmunt M. Novel concepts of human chorionic gonadotropin: reproductive system interactions and potential in the management of infertility. *Fertil Steril* 2005; 84: 275-84.
- Kolibianakis EM, Papanicolaou EG, Tournaye H, Camus M, Steirteghem ACV, Devroey P. Triggering final oocyte maturation using different doses of human chorionic gonadotropin: a randomized pilot study in patients with polycystic ovary syndrome treated with gonadotropin-releasing hormone antagonists and recombinant follicle-stimulating hormone. *Fertil Steril* 2007; 88: 1382-8.
- Lapthorn AJ, Harris DC, Littlejohn A, Lustbader JW, Canfield RE, Machin KJ, et al. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature* 1994; 369: 455-61.
- Licht P, Russu V, Lehmeyer S, Wissentheit T, Siebzehnrubl E, Wildt L. Cycle dependency of intrauterine vascular endothelial growth factor levels is correlated with decidualization and corpus luteum formation. *Fertil Steril* 2003; 80: 1228-33.
- Michaelson-Cohen R, Altarescu G, Beller U, Reens R, Halevy-Shalem T, Eldar-Geva T. Does elevated human chorionic gonadotropin alone trigger spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome? *Fertil Steril* 2008; 90: 1869-74.
- Nargund G, Hutchison, Scaramuzzi R, Campbell S. Low-dose HCG is useful in preventing OHSS in high-risk women without adversely affecting the outcome of IVF cycles. *Reprod Biomed Online* 2007; 14: 682-5.
- Nastri CO, Ferriani RA, Rocha IS, Martins WP. Ovarian hyperstimulation syndrome: pathophysiology and prevention. *J Assist Reprod Genet* 2010; 27: 121-8.
- Prien SD, Canes MS, Messer RH. The dosage of human chorionic gonadotropins influences the relationship between progesterone and cycle outcome during in vitro fertilization-embryo transfer. *Int J Fertil Womens Med* 2000; 45: 258-63.
- Saleh L, Prast J., Haslinger P., Husslein P, Helmer H, Knofler M. Effects of different human chorionic gonadotrophin preparations on trophoblast differentiation. *Placenta* 2007; 28: 199-203.
- Schmidt DW, Maier DB, Nulsen JC, Benadiva CA. Reducing the dose of human chorionic gonadotrophin in high responders does not affect the outcomes of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2004; 82: 841-6.
- Tsompou I, Muglu J, Gelbaya TA, Nardo LG. Optimal dose of HCG for final oocyte maturation in IVF cycles: absence of evidence? *Reprod Biomed Online* 2009;19: 52-8.
- Vlahos NF, Gregoriou O. Prevention and management of ovarian hyperstimulation syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1092: 247-64.
- Wang W, Zhang XH, Wang WH, Liu YL, Zhao LH, Xue SL, Yang KH. The time interval between hCG priming and oocyte retrieval in ART program: meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 2011; 28 (10): 901-10.
- Wikland M, Borg J, Forsberg AS, Jakobsson AH, Svalander P, Waldenström U. Human chorionic gonadotrophin self-administered by the subcutaneous route to induce oocyte maturation in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme. *Hum Reprod* 1995; 10: 1667-70.

Melhorias da qualidade do ar do laboratório, de ISO classe 7 para ISO classe 5, melhora resultados de ICSI em mulheres inférteis jovens

Laboratory air quality upgrade from ISO class 7 to ISO class 5 improves ICSI outcomes in young infertile women

Bruno Ramalho de Carvalho, MD, MSc¹, Adelino Amaral Silva, MD¹, Íris de Oliveira Cabral, BS¹, David Barreira Gomes Sobrinho, MD, MSc¹, Hitomi Miura Nakagawa, MD¹, Antônio César Paes Barbosa, MD¹

¹ GENESIS – Center for Assistance in Human Reproduction, Brasília, Distrito Federal, Brazil

CONFLICTS OF INTERESTS

The authors of the present study declare that they are not involved in any organization or entity of financial interest and that they have no conflict of interest regarding the topic in question or the materials discussed in the text. Work presented during the XIV Meeting of the Brazilian Society for Assisted Reproduction, Fortaleza, Ceará, Brazil, August 2010.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a interferência das melhorias da qualidade do ar do laboratório de reprodução assistida, de ISO classe 7 para ISO classe 5, sobre resultados de ciclos de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

Métodos: Estudo observacional, retrospectivo e comparativo, desenvolvido em centro privado de assistência em reprodução humana. 228 ciclos de ICSI foram analisados, de janeiro de 2006 a dezembro de 2009. Ciclos realizados em ambiente ISO classe 7 foram alocados no grupo ISO7 (n = 97) e os realizados em ambiente ISO classe 5, no grupo ISO5 (n = 131). Taxas de fertilização e clivagem, números de embriões de boa qualidade e embriões transferidos, taxa de implantação, gestação bioquímica e clínica foram as variáveis principais analisadas.

Resultados: Taxas de gestação bioquímica e clínica, e implantação embrionária (sacos gestacionais/embriões transferidos) foram significativamente maiores no grupo ISO5 quando comparado ao grupo ISO7, mesmo com número menor de embriões transferidos por paciente. Mulheres com idade ≤ 35 anos no grupo ISO5 apresentaram taxas de gestação bioquímica, clínica e implantação significativamente maiores quando comparadas ao mesmo grupo etário em ambiente ISO7.

Conclusões: Este estudo demonstra que melhorias da qualidade do ar do laboratório de reprodução assistida, de ISO classe 7 para ISO classe 5 pode melhorar os resultados de ciclos de ICSI. Entretanto, a qualidade do ar não elimina a interferência negativa da idade avançada sobre tais resultados.

Palavras-chave: ICSI, resultados em técnicas de reprodução assistida, cultura embrionária, qualidade do ar, salas limpas

ABSTRACT

Objective: To evaluate the interference of laboratory air quality upgrade, from air cleanliness ISO class 7 to ISO class 5, on intracytoplasmic sperm injection (ICSI) results.

Methods: Observational, retrospective and comparative study, developed in a private Center for Assistance in Human Reproduction. 228 ICSI cycles were analyzed from January 2006 to December 2009. Cycles performed in ISO class 7 environment were allocated in group ISO7 (n = 97) and those performed in ISO class 5 environment were allocated in group ISO5 (n = 131). Fertilization and cleavage rates, numbers of good embryos and embryos transferred, implantation rate, biochemical and clinical pregnancy were the main outcome measures.

Results: Biochemical and clinical pregnancy, and implantation rates (gestational sacs/embryos transferred) were significantly higher in ISO 5 group than in ISO 7 group, even with reduced number of embryos transferred per patient. Women aged ≤ 35 years in ISO 5 group presented with biochemical and clinical pregnancy rates, and implantation rates significantly higher than those in ISO 7 group.

Conclusions: This study demonstrated that the upgrade from ISO class 7 to ISO class 5 air quality in the incubation environment shall improve ICSI outcomes. However, air quality does not disregard negative interference of the advanced age on results.

Keywords: ICSI, ART outcome, embryo culture, air quality, cleanrooms

INTRODUCTION

Adequate air quality by efficient filtration and heated stages for working with gametes and embryos has been recently pointed as a common laboratory feature among high-performing *in vitro* fertilization (IVF) centers in the United States (Van Voorhis et al., 2010). However, in spite of significantly increased pregnancy rate (PR), but not embryo quality following IVF has been associated with the use of laboratory air purification units for bovines (Merton et al., 2007), studies in humans are not consensual about clear benefits of air conditions on assisted reproduction technologies (ART) outcomes and only an augmented miscarriage rate has been suggested for women submitted to less pure IVF laboratory environment (Perin et al., 2010).

Brazilian National Sanitary Surveillance Agency (ANVISA) regulates IVF clinics and laboratory quality criteria. Considering the hypothetical interference of air cleanliness on gametes and embryos health, it has determined, in 2006, an ISO class 5 air cleanliness classification as the minimum criterion for ART laboratories (Brasil/ANVISA).

SA, 2006). According to the International Standard ISO 14644-1 classification of air cleanliness, an ISO class 5 ambient air must present a maximum of 3,520 particles $> 0.5 \text{ mm/m}^3$ (ABNT, 2005).

Aiming to better understand the interference of laboratory air quality over ART results in humans, this study compared intracytoplasmic sperm injection (ICSI) outcomes before ANVISA 2006 statement, in an ISO class 7 (maximum of 352,000 particles $> 0.5 \text{ mm/m}^3$) ICSI laboratory, and after, in an ISO class 5 environment.

MATERIALS AND METHODS

Patients

We retrospectively assessed a total of 707 consecutive ICSI cycles between January, 1, 2006 and December, 31, 2009, performed at GENESIS – Centre for Assistance in Human Reproduction, Brasília, Distrito Federal, Brazil. Only cycles performed by long ovarian stimulation protocol with GnRH agonist and with fresh partner's semen obtained by masturbation were included. Repeated cycles per woman in the period, cycles with missing data, cancelled cycles and those in which blastomere biopsy or assisted hatching were performed were excluded from the study.

Final series consisted of 228 ICSI cycles. Cycles analyzed until December, 31, 2007, were performed in an ISO 7 air quality environment, including IVF laboratory and semen preparation room (ISO7; $n = 97$). Cycles between January, 1, 2008 and December, 31, 2009, were performed in an ISO 5 air quality environment, which was obtained after the installation of horizontal laminar and unidirectional air flow in the IVF/ICSI laboratory, and a class IIA biological safety cabinet in semen preparation room, providing a high-efficiency particulate air (HEPA) filtration and recirculation within the work place (ISO5; $n = 131$).

The study was approved by the Institutional Research Committee. All patients signed full written consent form for assisted reproduction technology (ART) treatment and gave oral consent for data confidential use.

Treatment protocol

All patients were submitted to pituitary inhibition by subcutaneous leuprolide acetate, 10 IU/day, or nasal nafarelin acetate, 800 $\mu\text{g/day}$, starting during the midluteal phase of the cycle immediately preceding the treatment cycle. Ovarian stimulation was initiated after menstrual flow and carried out with recombinant follicle-stimulating hormone (FSH) in variable daily doses from 150 UI to 300 UI, according to patient's age and/or previous poor response in ART cycles. Follicular growth was monitored by endovaginal ultrasonography, in a 5.0 to 9.0 Mhz frequency, and individual adjustment was eventually performed after stimulation day 6, with step down dosing. Follicular maturation was reached by the administration of a single subcutaneous dose of recombinant human chorionic gonadotropin (hCG) when most dominant follicles had reached a mean diameter $> 17 \text{ mm}$, and oocyte retrieval was performed vaginally, 34 to 36 hours later. Luteal phase supplementation was initiated on oocyte retrieval day with vaginally administered natural micronized progesterone, 600 mg/day, or a unique dose of 8% gel progesterone.

Semen samples were obtained exclusively by masturbation, after an abstinence period of at least 2 days and a maximum of 5 days. Analyses of sperm concentration, motility, vitality and morphology were proceeded according to World Health Organization and strict criteria for morphology evaluation.

Table 1. Characteristics and ICSI outcomes according to air quality environment, ISO 7 versus ISO 5

Characteristics and outcomes	ISO 7 Group	ISO 5 Group	p value
Number of patients	97	131	
Age $\pm$ (years; mean $\pm$ SD)	35.23 $\pm$ 4.02	35.87 $\pm$ 4.39	0.20
Retrieved MII oocytes $\pm$ (mean $\pm$ SD)	6.83 $\pm$ 4.18	7.1 $\pm$ 4.27	0.62
Fertilization rate	0.76	0.74	0.87
Cleavage rate	0.95	0.97	0.72
Good quality embryos $\pm$ (mean $\pm$ SD)	1.95 $\pm$ 1.1	1.92 $\pm$ 0.87	0.81
Embryos transferred $\pm$ (mean $\pm$ SD)	2.63 $\pm$ 0.8	2.37 $\pm$ 0.6	0.0031
Biochemical pregnancy rate	0.34	0.51	0.0107
Clinical pregnancy rate	0.29	0.45	0.0136
Implantation rate	0.17	0.28	0.0110

Note: $\pm$ = Mann-Whitney test

Table 2. Characteristics and ICSI outcomes for women aged ≤ 35 years according to air quality environment, ISO 7 versus ISO 5

Characteristic	ISO 7 Group	ISO 5 Group	p value
Number of patients	51	61	
Age $\pm$ (years; mean $\pm$ SD)	32.16 $\pm$ 2.58	32.1 $\pm$ 3.03	NS
Retrieved MII oocytes $\pm$ (mean $\pm$ SD)	7.92 $\pm$ 4.87	8.18 $\pm$ 4.94	NS
Fertilization rate	0.75	0.75	NS
Cleavage rate	0.95	0.96	NS
Good quality embryos $\pm$ (mean $\pm$ SD)	1.92 $\pm$ 0.96	1.89 $\pm$ 0.61	NS
Embryos transferred $\pm$ (mean $\pm$ SD)	2.49 $\pm$ 0.7	2.16 $\pm$ 0.4	0.0017
Biochemical pregnancy rate	0.35	0.57	0.0235
Clinical pregnancy rate	0.27	0.54	0.0068
Implantation rate	0.15	0.37	0.0006

Note: $\pm$ = Mann-Whitney test

After an incubation period of 1 to 2 hours, mature oocytes were classified based on the identification of the polar body after removing *cumulus-corona* cells. ICSI were performed in all mature oocytes and fertilization was confirmed from 14 to 20 hours later, by the presence of two pronuclei and two polar bodies. Optimal embryonic development was assessed by early cleavage from 25 to 27 hours after ICSI, number of cells (four cells in day 2, eight cells in day 3), symmetry and fragmentation of blastomeres. Embryo transfer (ET) was performed in days 2 to 5, and no more than four embryos were transferred to each patient. Biochemical pregnancy was determined by serum β -hCG 12 days after ET and clinical pregnancy was diagnosed by the finding of at least one gestational sac at a 4 to 6 weeks ultrasonographic evaluation.

Main Outcome Measures

Fertilization and cleavage rates, numbers of good and total embryos transferred, implantation, biochemical and clinical pregnancy rates were the main outcome measures.

Statistical Analysis

Using GraphPad Prism software, version 5.00 (GraphPad Software, Inc, 2007), samples with non-parametric distribution have been analyzed using the Mann-Whitney test. Qualitative data has been analyzed using Fisher's exact test. The level of significance was set at $p < 0.05$ in all analyses.

RESULTS

ISO7 and ISO5 were similar in terms of age, total number of morphologically mature oocytes and total of good quality embryos. Biochemical and clinical pregnancy rates, and implantation rates (gestational sacs/embryos transferred) were significantly higher in ISO5 than in ISO7, with fewer numbers of embryos transferred per patient (Table 1).

Data were also analyzed by age groups, dividing women aged ≤ 35 years and those > 35 years. Age, fertilization and cleavage rates, and numbers of good quality embryos were similar between age groups in both air quality groups. Women ≤ 35 years in ISO5 group presented with biochemical and clinical pregnancy rates, and implantation rates significantly higher when compared with those in ISO7 group (Table 2). No significant differences were found between air cleanliness environments for women aged > 35 (Table 3).

DISCUSSION

Our results suggested that women up to 35 years of age undergoing ICSI treatment were consistently benefited by air filtration and unidirectional flow in laboratory and semen manipulation room, since they achieved significant better pregnancy and implantation rates than those obtained in less air quality environment. For older women, some improvement was also demonstrated, but without statistical significance, which is compatible with the common sense about the intense negative influence of age on reproductive potential for natural or assisted conception (Carvalho et al, 2010).

Although no interference of women air pollution exposure during follicular phase has yet been demonstrated on clinical and laboratory outcomes, or pregnancy and implantation rates (Perin et al., 2010), it is plausible to postulate that the direct exposure of gametes and embryos to volatile toxic compounds and small particulate matters (PM) should worsen treatment outcomes in ART programs. The few studies assessing laboratory air quality and IVF outcomes have demonstrated controversial positions.

Legro et al recently demonstrated the significant adverse effect of increased IVF clinic air concentration of PM with $< 2.5\mu\text{m}$ diameter on conception and chance of clinical pregnancy (Legro et al., 2010). Also, implantation rates had previously been found to decline on the presence of air pollutants in the IVF laboratory (Johnson et al., 1993; Worrlow et al., 2002). Boone et al obtained significant improvements on fertilization and cleavage rates after construction of a high-quality air laboratory environment. In that study, a shift upward was observed for PR, from 20% in the year of cleanroom installation to 59% two years later (Boone et al., 1999).

In contrast, Souza et al studied the influence of IVF laboratory air quality improvement on treatment outcomes of 123 antagonist cycles and could not establish significant differences between ISO Class 8 (maximum of 3,520,000 particles $> 0.5\text{ mm}^3$) and ISO Class 5, regarding number of good quality embryos transferred, pregnancy and implantation rates among women aged ≤ 37 years (Souza et al, 2009), reinforcing previous finding of no effect of the use of carbon-activated air

Table 3. Characteristics and ICSI outcomes for women aged > 35 years according to air quality environment, ISO 7 versus ISO 5

Characteristic	ISO 7 Group	ISO 5 Group	p value
Number of patients	46	70	
Age $\pm$ (years; mean $\pm$ SD)	38.63 $\pm$ 2.12	39.16 $\pm$ 2.2	NS
Retrieved MII oocytes $\pm$ (mean $\pm$ SD)	5.63 $\pm$ 2.85	6.16 $\pm$ 3.36	NS
Fertilization rate	0.74	0.72	NS
Cleavage rate	0.94	0.96	NS
Good quality embryos $\pm$ (mean $\pm$ SD)	1.98 $\pm$ 1.3	1.91 $\pm$ 1.0	NS
Embryos transferred $\pm$ (mean $\pm$ SD)	2.78 $\pm$ 0.9	2.54 $\pm$ 0.7	NS
Biochemical pregnancy rate	0.33	0.46	NS
Clinical pregnancy rate	0.30	0.37	NS
Implantation rate	0.16	0.18	NS

Note: $\pm$ = Mann-Whitney test

filtration on human embryos quality or PR (Battaglia et al., 2001).

At least 70% of high-performing IVF centers in the United States warrant laboratory air quality by using positive air pressure, HEPA filtration, filtration for volatile and chemically active compounds, laminar airflow cabinets and heated microscope stages (Van Voorhis et al., 2010). In the last five years, Brazilian centers for assistance in human reproduction have been adopting measures to adequately attend ANVISA 2006 recommendations and most centers have achieved similar conditions to those pointed for excellence centers in the United States.

Since improvements on ICSI techniques and incubation media, and new concerns on the evaluation of gametes and embryos quality in the last years are potential contributors to better treatment outcomes, our results may have overestimated the real impact of air quality on assisted reproduction results. Due to the lack of corroborative data and because of our analysis is based on relatively small group of subjects, from the same region and treated in the same setting, more evidence is needed to generalize and confirm such an influence.

In conclusion, our data suggest that the upgrade from ISO class 7 to ISO class 5 air quality in the IVF laboratory and semen manipulation room shall improve ICSI outcomes in women up to 35 years of age, with less embryos transferred per patient. On this basis, we believe that measures to improve air quality in ART laboratory environments shall be encouraged, but they are not supposed to disregard negative interference of female advanced age on treatment outcomes.

Correspondência:

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

REFERÊNCIAS

Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Normas Técnicas NBR ISO14644-1: 2005. Parte 1: Salas limpas e ambientes controlados associados. Parte 1: Classificação da limpeza do ar. RC: Associação Brasileira de Normas Técnicas, [S. d.], 27 p.

- Battaglia DE, Khabani A, Rainer C, Moore DE. Prospective randomized trial of incubator CODA filtration units revealed no effect on outcome parameters for IVF. *Fertil Steril*. 2001;75(Suppl 1):S6.
- Boone WR, Johnson JE, Locke A, Crane MM 4th, Price TM. Control of air quality in an assisted reproductive technology laboratory. *Fertil Steril*. 1999;71:150-4.
- Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC no. 33, de 17 de fevereiro de 2006. *Diário Oficial da União*. 2006, 20 de fevereiro.
- Carvalho BR, Cabral IO, Nakagawa HM, Silva AA, Barbosa ACP. Idade da mulher e resposta ovariana em ciclos de ICSI. *JBRA Assist Reprod*. 2010;14:24-7.
- Johnson JE, Boone WR, Bernard RS. The effects of volatile compounds (VC) on the outcome of in vitro mouse embryo culture. *Fertil Steril*. 1993;(Suppl 1):S98-9.
- Legro RS, Sauer MV, Mottia GL, Richter KS, Li X, Dodson WC, Liao D. Effect of air quality on assisted human reproduction. *Hum Reprod*. 2010; 25:1317-24.
- Merton JS, Vermeulen ZL, Otter T, Mullaart E, de Ruigh L, Hasler JF. Carbon-activated gas filtration during in vitro culture increased pregnancy rate following transfer of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*. 2007;67:1233-8.
- Perin PM, Maluf M, Czeresnia CE, Januário DA, Saldiva PH. Impact of short-term preconceptional exposure to particulate air pollution on treatment outcome in couples undergoing in vitro fertilization and embryo transfer (IVF/ET). *J Assist Reprod Genet*. 2010;27:371-82.
- Souza MCB, Mancebo AC, Rocha CA, Henriques CA, Souza MM, Cardoso FFO. Evaluation of two incubation environments – ISO class 8 versus ISO class 5 – on intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil Steril*. 2009;91:1780-4.
- Van Voorhis BJ, Thomas M, Surrey ES, Sparks A. What do consistently high-performing in vitro fertilization programs in the U.S. do? *Fertil Steril*. 2010;94:1346-9.
- Worrilow KC, Huynh HT, Bower JB, Schillings W, Peters AJ. A retrospective analysis: seasonal decline in implantation rates (IR) and its correlation with increased levels of volatile organic compounds (VOC). *Fertil Steril*. 2002;78:S39.

Avaliação do uso da metformina no resultado ovulatório de pacientes portadoras da síndrome de ovários policísticos resistente ao uso isolado do citrato de clomifeno

Roberto Carlos Machado¹, Natalia de Andrade Machado², Selmo Geber³

¹ Mestre em Ginecologia pela Universidade Federal de Minas Gerais

² Acadêmica da faculdade de Medicina da Unincor - MG

³ Professor associado do departamento de ginecologia e Obstetria da faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

RESUMO

Objetivo: Avaliar os efeitos da administração da metformina associada ao citrato de clomifeno nas taxas de ovulação e gravidez em mulheres com síndrome dos ovários policísticos resistentes ao uso isolado do citrato de clomifeno.

Material e métodos: um total de 67 pacientes com síndrome de ovários policísticos foi incluído no estudo e recebeu dois ciclos de citrato de clomifeno (100 mg/dia) entre os dias cinco e nove do ciclo menstrual. As pacientes que não responderam ao citrato de clomifeno foram randomizadas para receberem metformina 850 mg (grupo 1) ou placebo (grupo 2) duas vezes ao dia por dois meses. Após esse período, foi associado citrato de clomifeno por mais dois ciclos.

Resultados: Um total de 36 pacientes resistentes ao citrato de clomifeno completaram o estudo. No grupo que utilizou metformina, 15/21 ovularam (71,4%) e 8/21 (38,1%) engravidaram. No grupo controle, 5/15 (33,3%) ovularam e 3/15 (20%) engravidaram. A taxa de ovulação foi significativamente superior no grupo que usou metformina ($p=0,04$), contudo, não houve diferença nas taxas de gravidez nos dois grupos. Quando as pacientes foram separadas de acordo com o IMC, observou-se que as obesas ($IMC > 28$) tinham taxas de ovulação mais altas no grupo da metformina (11/12) que no grupo placebo (2/8). Este mesmo resultado não foi verificado entre as pacientes magras com $IMC < 28$ (4/9 e 3/7 para metformina e placebo, respectivamente).

Conclusão: a metformina associada ao citrato de clomifeno aumenta as taxas de ovulação e gravidez nas portadoras de síndrome dos ovários policísticos resistentes ao citrato de clomifeno, especialmente as obesas.

Palavras-chave: Síndrome dos ovários policísticos. Metformina. Citrato de clomifeno.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effect of metformin associated to clomiphene citrate on ovulation, and pregnancy rates in clomiphene citrate-resistant women with polycystic ovary syndrome.

Material and methods: Patients with PCOS who received 2 cycles of clomiphene citrate (100 mg/day from days 5 to 9) were initially included in the study. Patients who did not respond to clomiphene citrate were randomly allocated to receive either metformin 850 mg twice daily (group 1) or placebo twice daily (group 2) taken for two months in a row. After that associated to CC (100 mg/day from days 5 to 9) for the two following cycles.

Results: Compared with the control group, the metformin group had significantly higher ovulation ($p=0,04$), however, there was no significant difference in the pregnancy rate between the two groups. When patients were separated according to BMI, we observed that obese patients (>28) had higher ovulation rates in the metformin group than placebo group. However this result was not observed for patients with $BMI < 28$.

Conclusion: Metformin associated to CC improves ovulation and pregnancy rates in clomiphene citrate-resistant women with polycystic ovary syndrome, specially in obese patients.

Keywords: Polycystic ovary syndrome. Metformin. Clomiphene citrate.

INTRODUÇÃO

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é uma entidade clínica complexa que acomete aproximadamente 6% da população feminina em idade reprodutiva (Franks, 1995) respondendo por 75% dos casos de infertilidade de causa anovulatória (Dunaif, 1994). Para seu diagnóstico devem estar presentes dois dos três seguintes critérios: oligo ou anovulação, sinais clínicos e/ou bioquímicos de hiperandrogenismo; ovários policísticos a ultra sonografia (Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group, 2004; Fuhrmeister et al., 2011).

O tratamento deve ser individualizado e, havendo desejo de gravidez, a alternativa terapêutica é a indução da ovulação. A primeira alternativa recomendada pelo consenso do ESHRE/ASRM (2008) é o citrato de clomifeno (CC), apresentando sucesso no tratamento em 85 % dos casos (Gysler et al., 1982; Speroff & Fritz 2011). Considera-se falha do tratamento com CC, quando não ocorre ovulação. Quando não existe resposta ao tratamento, outras alternativas podem ser aventadas. Uma das alternativas é a associação do CC com a metformina. Gandar et al. (1999) demonstraram que a utilização de metformina leva a redução da hiperinsulinemia e dos níveis de androgênios circulantes, criando condições favoráveis para a ação do citrato de clomifeno e levando a altas taxas de ovulação e gravidez. Outros autores avaliaram o uso da metformina em mulheres com resistência ao CC e concluíram que a metformina melhora as taxas de ovulação, gravidez e nascidos vivos (Parsanezhad et al., 2001; Kocak et al., 2002; George et al., 2003; Amin et al., 2003; Siebert et al., 2006; Creanga et al., 2008; Cataldo et al., 2008; Moll et al., 2008).

O objetivo do nosso estudo foi avaliar a eficácia do citrato de clomifeno após utilização da metformina no resultado ovulatório de pacientes portadoras da síndrome dos

Tabela 1. Parâmetros clínico-laboratoriais das pacientes com SOP resistente ao CC

	IMC menor 28			IMC maior 28	
	TOTAL (n=36)	Placebo (n=7)	Metformina (n=9)	Placebo (n=8)	Metformina (n=12)
Idade	27,7±4,2	26,8±4,6	27,1±4,0	27,4±3,8	28,2±3,2
Tempo de infertilidade	4,03±2,2	3,9±2,1	3,8±2,1	4,1±2,2	4,03±2,2
IMC (kg/m ²)	29,9±6,3	24±3,8	26±2,1	32±3,3	34±3,7
RCQ	0,79±0,07	0,74±0,04	0,75±0,04	0,81±0,05	0,84±0,03
História familiar	12(33,3%)	3 (42,9%)	3 (33,3%)	2 (25,0%)	4 (33,3%)
Hirsutismo	21(58,3%)	4 (57,1%)	4 (44,4%)	5 (62,5%)	8 (66,7%)
Resistência à insulina	9(25,0%)	1 (14,3%)	1 (11,1%)	4 (50,0%)	3 (25,0%)
Amenorréia	19(52,8%)	4 (57,1%)	3 (33,3%)	6 (75,0%)	6 (50,0%)
Oligomenorréia	17(47,2%)	3 (50,0%)	6 (66,7%)	2 (25,0%)	6 (50,0%)
Relação LH /FSH > 1	22(61,1%)	6 (85,7%)	8 (88,9%)	4 (50,0%)	4 (33,3%)

ovários policísticos não responsivos a indução primária com citrato de clomifeno e ainda se o resultado ovulatório advindo desta terapia resulta em gestações.

METODOLOGIA

Foi realizado estudo longitudinal, prospectivo, randomizado, duplo-cego e placebo controlado, do qual participaram 67 pacientes com diagnóstico de SOP. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) - ETIC 249/05.

Foram incluídas pacientes com infertilidade conjugal por anovulação crônica associada à SOP, em idade reprodutiva, não-responsivas à indução primária com citrato de clomifeno, que não se submeteram a tratamento hormonal prévio nos últimos 60 dias antes do estudo, sem fator tubário ou fator masculino para infertilidade. Aquelas portadoras de doenças crônicas ou endocrinopatias foram excluídas. Pacientes que não compareceram na data marcada para os exames, que não usaram adequadamente os medicamentos ou que apresentaram algum evento adverso, foram retiradas do estudo.

Os exames realizados para a propedêutica básica para infertilidade foram realizados nos mesmos laboratórios, com a mesma metodologia. Todas foram avaliadas mensalmente e ao término do estudo. Para o diagnóstico de SOP foram considerados os critérios definidos no Consenso de Rotterdam (2004), fazendo-se necessária a presença de dois dos três itens a seguir e exclusão de outras doenças causadoras de anovulação: oligo ou anovulação, sinais clínicos ou bioquímicos de hiperandrogenismo e ovários policísticos à ultra-sonografia (≥ 12 folículos de 2 a 9 mm e/ou aumento de volume ovariano maior que 10 cc).

Diagnóstico de ovulação

Todas pacientes foram submetidas à ultrasonografia vaginal com sonda de 6,0 mhz realizados pelo mesmo examinador, utilizando o mesmo aparelho (GE logic 400 – EUA), pela manhã. O primeiro exame era sempre realizado no 2º dia do ciclo, seguido por exames feitos a cada dois dias, começando no 9º até o 21º dia. Foram avaliados o diâmetro médio de cada folículo, o número de folículos e a espessura endometrial. Foram considerados ciclos ovulatórios quando houve visibilização de crescimento folicular e posterior desaparecimento com formação característica de corpo lúteo, presença de líquido livre posterior ao útero e mudança no padrão endometrial de proliferativo para secretor.

Tabela 2. Espessura endometrial em mulheres com SOP resistente ao citrato de clomifeno após uso de metformina ou placebo

	Placebo (n=15)	Metformina (n=21)	P
Ciclo 1	6,63±1,53	7,14±1,60	0,339
Ciclo 2	7,35±1,85	8,00±1,82	0,446
Ciclo 3	8,26±2,84	8,75±2,25	0,565
Ciclo 4	7,83±2,39	9,05±2,10	0,137

Valores são média±DP

Teste t de Student + Teste de Mann-Whitney

Tabela 3. Avaliação endócrino-metabólica de pacientes com SOP resistente ao CC após uso de metformina ou placebo

	Placebo (n= 15)	Metformina (n=21)	P
Glicose	87±5,9	84,7±8,5	0,440*
Insulina	14,5±7,9	8,8±4,8	0,032*
Glicose/Insulina	8,6±5,9	13,28±8,5	0,046y
TGO	19,5±2,7	17,7±4,3	0,060y
TGP	19±4,7	20,1±5,4	0,560y
Creatinina	0,9±0,2	0,9±0,2	0,631y

Valores são média±DP

* Teste t de Student

y Teste de Mann-Whitney

Também, quando apresentaram níveis de progesterona plasmática >3.000 picogramas/mL, medidos no 21º dia do ciclo, por imunofluorimetria.

Indução da ovulação

Pacientes que não apresentaram ovulação após uso do CC (clomid – medley - Brasil) na dose de 100 mg/dia, do 5º ao 9º dia do ciclo, por dois meses seguidos, foram separadas, aleatoriamente, em quatro grupos, de acordo com o índice de massa corporal (IMC). A aleatorização foi feita com envelopes lacrados. Assim, mulheres com IMC >28 usaram metformina (Glifage – Merck - Brasil) na dose de 850 mg de 12/12 horas ou placebo, de 12/12 horas, por 60 dias. Mulheres com IMC <28, também usaram metformina na dose de 850 mg de 12/12 horas ou placebo, de 12/12 horas, por 60 dias.

Após os dois meses, as pacientes voltaram a receber CC na dose de 100 mg do 5º ao 9º dia, mantendo o uso

da metformina ou placebo, e a fazer acompanhamento ultrasonográfico seriado com dosagem de progesterona plasmática no 21º dia do ciclo para confirmar ou não a ocorrência de ovulação. As pacientes foram seguidas e avaliadas por mais 4 ciclos sucessivos.

Análise estatística

O cálculo amostral foi realizado com base na expectativa de ovulação de 0,05 no grupo placebo e 0,50 no grupo de estudo, para b de 0,20 (poder de 0,80) e de 0,05 (valor de p) e mostrou a necessidade de 18 pacientes em cada grupo. Para comparação das médias dos grupos independentes com variáveis contínuas, foi utilizado o teste t-student, Mann-Whitney ou Wilcoxon, de acordo com a distribuição dos dados. Para comparação de proporções, foi utilizado o teste exato de Fisher. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS

Um total de 36 mulheres não respondedoras ao CC foram separadas aleatoriamente em dois grupos para receber metformina ou placebo, e cada grupo foi separado de acordo com o IMC. A idade média foi de $27,7 \pm 4,2$ anos (variação de 20 a 36 anos), com tempo médio de $4,03 \pm 2,2$ anos de infertilidade (variação de 1 a 10 anos), IMC de $29,9 \pm 6,3$ kg/m² (variação de 18,2 a 46,6) e RCQ média de $0,79 \pm 0,07$ (variação de 0,7 a 0,9). As mulheres que receberam metformina apresentavam um IMC médio de $30,79 \pm 6,52$, e as que receberam placebo $28,88 \pm 6,24$ ($p=0,38$). A Relação cintura/quadril foi de $0,81 \pm 0,06$ no grupo que usou metformina e $0,77 \pm 0,07$, no grupo que usou placebo ($p=0,08$). A idade média também foi semelhante em ambos os grupos.

As características clínicas de cada grupo estão descritas na Tabela 1. Os resultados dos exames basais (hormônios, provas de função hepática e renal e glicemia) obtidos de todas as pacientes foram comparados de acordo com o uso de metformina ou placebo, e não observamos diferença para nenhum dos dados avaliados.

Ao término de seis ciclos menstruais em uso de metformina ou placebo, os dados obtidos foram comparados. Em relação à espessura endometrial avaliada entre os dias 14 e 16 do ciclo menstrual, nos quatro ciclos em que as pacientes usaram metformina ou placebo associado ao CC, não foi verificada diferença entre os grupos de mulheres que usaram placebo ou metformina (Tabela 2). Os resultados das provas de função hepática e renal e glicemia, realizados ao final do tratamento foram comparados de acordo com o uso de metformina ou placebo, a fim de se analisar se houve algum efeito da medicação. A comparação entre os grupos demonstrou uma diferença entre os níveis de insulina, com menores níveis no grupo de mulheres que usaram a metformina. A relação glicose/insulina também foi maior no grupo de mulheres que usaram metformina (Tabela 3).

A comparação feita entre os resultados obtidos na avaliação metabólica antes e após o uso da metformina, nas mulheres

que não engravidaram, apresentaram aumento nos níveis séricos de TGO, TGP e creatinina (Tabela 4). As mulheres que utilizaram placebo tiveram um aumento significativo nas taxas de creatinina (de 0,71 para 0,9 – $p=0,007$), e os demais valores foram semelhantes antes e após o uso. No grupo de mulheres que receberam o placebo ($n=15$), cinco (33,3%) apresentaram ovulação. No grupo que recebeu a metformina ($n=21$), 15 pacientes (71,4%) apresentaram ovulação. Quando comparados os números de mulheres que ovularam nos dois grupos, verificou-se diferença significativa ($p=0,041$). Quando os grupos foram separados de acordo com o IMC, não se identificou diferença entre as mulheres que usaram placebo e metformina em pacientes com $IMC < 28$ (43% e 44,4%, respectivamente). Para aquelas com $IMC > 28$, observamos um número significativamente maior de mulheres que apresentaram ovulação no grupo que usou metformina (92%) quando comparado ao grupo placebo (25%) ($p=0,004$) (Tabela 5).

A comparação feita entre as mulheres que conseguiram engravidar nos dois grupos não mostrou diferença significativa ($p=0,29$) quando comparadas as gestações obtidas no grupo que usou placebo (3/15-20%) e no grupo que usou metformina (8/21-38%). Mulheres com $IMC < 28$ que usaram placebo obtiveram 14% de gravidez (1/7) e as que usaram metformina 22% (2/9). No grupo de mulheres com $IMC > 28$, as que usaram placebo apresentaram taxa de gravidez de 25% (2/8) e as que usaram a metformina, 50% (6/12). A comparação mostrou $p=1$ no primeiro grupo e $p=0,37$ no segundo grupo.

DISCUSSÃO

Do grupo inicial de 67 pacientes com SOP selecionadas para o estudo, 10 foram excluídas por terem desistido de participar ou por não se adequarem ao tratamento proposto. Um total de 21 mulheres respondeu à utilização do citrato de clomifeno isolado e ovulou (37%), sendo que 13 engravidaram (23%). A taxa de ovulação

Tabela 4. Comparação entre as avaliações metabólicas antes e após o uso de metformina em mulheres com SOP resistentes ao CC

	Antes do Tratamento (n=13)	Depois do Tratamento (n=13)	P
Glicose	83,7 $\pm$ 24,29	84,71 $\pm$ 8,48	0,848*
Insulina	16,35 $\pm$ 18,98	8,79 $\pm$ 4,85	0,130*
Glicose/Insulina	29,23 $\pm$ 17,54	13,28 $\pm$ 8,45	0,975 ξ
TGO	14,36 $\pm$ 4,73	17,71 $\pm$ 4,27	0,007 ξ
TGP	14,05 $\pm$ 5,47	20,14 $\pm$ 5,42	0,001*
Creatinina	0,72 $\pm$ 0,12	0,88 $\pm$ 0,17	0,007 ξ

Valores são média $\pm$ DP

*Teste t de Student.

ξ Teste de Wilcoxon.

Tabela 5. Frequência de ovulação em mulheres com SOP resistentes ao citrato de clomifeno, após uso da metformina e placebo

	Total		IMC < 28		IMC > 28	
Resultado	Placebo	Metformina	Placebo	Metformina	Placebo	Metformina
Ovulação	5 (33,3%)	15 (71,4 %)	3 (42,9%)	4 (44,4%)	2 (25%)	11 (91,7%)
Sem resposta	10 (66,7%)	6 (28,6%)	4 (57,1%)	5 (55,6%)	6 (75,0%)	1 (8,3%)
Total	15 (100,0)	21 (100,0%)	7 (100,0)	9 (100,0%)	8 (100,0)	12 (100,0%)
p	0,041		1,0		0,004	

Teste exato de Fisher

observada foi inferior ao descrito em outros trabalhos, que está em torno de 70 a 80% (Homburg, 2005; Speroff & Fritz, 2011) e pode ser explicado pelo reduzido número de pacientes observado, quando comparado com os demais estudos. Em relação à taxa de gravidez, nossos resultados foram semelhantes aos já atribuídos a mulheres em uso de CC e sem outros fatores de infertilidade (Homburg, 2005; Speroff & Fritz, 2011).

Foram 36 pacientes (63%) consideradas resistentes ao uso do citrato de clomifeno que prosseguiram na segunda fase do estudo. Imani *et al.* (2002) e Homburg (2005) mencionam índices de resistência ao citrato de clomifeno em torno de 20 a 30%. A taxa mais alta de resistência ao citrato de clomifeno observada no grupo pode ser devida ao fato de que várias pacientes vieram ao estudo encaminhadas por outros serviços com tentativas frustradas de tratamento anterior.

As medidas da espessura endometrial realizadas no meio do ciclo (14°-16° dias), nos quatro ciclos de tratamento, não apresentaram diferenças quando comparadas as mulheres que usaram metformina e placebo associado ao CC. Esse fato pode ser explicado porque as alterações com depressão endometrial podem não ocorrer (Check *et al.*, 1995; Dehbashi *et al.*, 2003; Dickey & Holtkamp, 1993; Nakamura *et al.*, 1997) ou, quando acontecem, atingem baixo percentual (em torno de 15%) das pacientes (Homburg, 2005).

O uso da metformina por dois meses e posteriormente associado ao CC mostrou-se eficaz para induzir a ovulação em mulheres com resistência ao CC isolado previamente. A taxa de ovulação verificada foi de 71,4%. Mais ainda, quando comparado esse resultado com aquele obtido por mulheres também resistentes ao CC, mas que usaram placebo em vez da metformina, pelo mesmo período de tempo e da mesma forma, obteve-se diferença significativa ($p=0,04$), sendo que, nesse grupo, a taxa de ovulação foi de 33,3%.

Amin *et al.* (2003), usaram metformina em pacientes clomifeno-resistentes e obtiveram taxas de ovulação de 52,1%. Essas taxas são mais baixas do que a observada em nosso estudo, provavelmente em função da utilização da metformina isolada sem clomifeno. Hwu *et al.* (2005) administraram 12 dias de metformina como pré-tratamento ao CC em 40 mulheres e as outras 40 receberam apenas CC. Os autores constataram 42,5% de ovulação no grupo que recebeu metformina e 12,5% no grupo sem metformina. Apesar de terem concluído que 12 dias de pré-tratamento com metformina melhora as taxas de ovulação em portadoras de SOP resistente ao CC, como as taxas foram inferiores às observadas no presente estudo, acredita-se que pode ter sido em decorrência do pouco tempo de uso prévio de metformina.

Quando os grupos foram separados de acordo com o IMC, observamos que nas pacientes não obesas ($IMC < 28$) as taxas de ovulação foram semelhantes nos dois grupos: placebo (43%) e metformina (45%). No subgrupo com obesas ($IMC > 28$), a taxa de ovulação foi significativamente mais alta no grupo que utilizou a metformina (92%), enquanto no grupo placebo a taxa foi de 25%. As taxas de ovulação em pacientes clomifeno-resistente que usaram metformina mais CC são relatadas em torno de 70% dos casos (Vandermolen *et al.*, 2001); e em obesas portadoras de SOP clomifeno-resistente que fizeram uso de CC mais metformina, Khorram *et al.* (2006) relataram 44%. Isto justificaria os resultados conflitantes encontrados pelos pesquisadores citados, que não avaliaram a influência da massa corpórea sobre os resultados em suas pesquisas.

Em relação às taxas de gravidez encontradas neste estudo, foram obtidos 38% de gestação no grupo que utilizou metformina e 20% no grupo que utilizou placebo. Apesar de se ter verificado taxa duas vezes mais alta no grupo de estudo, não houve diferença significativa ($p=0,29$). Esse fato pode ser explicado pelo reduzido número de pacientes. Sendo assim, seria necessário um número muito mais alto de mulheres para alcançar-se significância estatística. Quando os grupos foram subdivididos de acordo com o IMC, houve 22% de gravidez no grupo metformina e 14% no grupo placebo, em mulheres com $IMC < 28$. Entretanto, nas pacientes com $IMC > 28$, as taxas foram de 50% no grupo metformina e 25% no grupo placebo. Apesar da ausência de significância estatística, pode-se notar a tendência a taxas de gravidez mais altas no subgrupo com IMC acima de 28 que utilizou a metformina. Acredita-se que a diferença poderia ser significativa para um número mais elevado de pacientes participantes.

Esses dados estão de acordo com a literatura. Siebert *et al.* (2006), em revisão de estudos prospectivos randomizados e controlados, propõe que a associação de CC e metformina em mulheres portadoras de SOP clomifeno-resistente é altamente efetiva em conseguir indução da ovulação. Creanga *et al.* (2008) publicaram metanálise abordando que a associação de citrato de clomifeno com metformina aumenta as taxas de ovulação e gravidez em mulheres portadoras de SOP. Neste mesmo ano, Moll *et al.*, (2008) realizaram outra metanálise comprovando que a associação citrato de clomifeno/metformina em mulheres com SOP resistente ao CC isolado leva a altas taxas de nascidos vivos.

Podemos concluir que a metformina é uma droga que tem espaço importante na indução da ovulação das pacientes portadoras SOP e resistentes ao CC, especialmente para aquelas com índice de massa corpórea superior a 28 kg/m^2 . Somado aos bons resultados, é uma droga de boa tolerabilidade e baixo custo, sendo, assim, acessível a boa parte da nossa população. Novos estudos são necessários para confirmação das doses ideais, do período de tempo adequado para obter-se resultado terapêutico ótimo e para se confirmar se as taxas de gravidez são também superiores nesse grupo.

Correspondência:

Selmo Geber - Av. Contorno 7747 – Lourdes – CEP 30110120
Belo Horizonte – MG – Brasil. Tel 55 31 21026363 – FAX 55
31 21026334 – email: selmogeber@origen.com.br

REFERÊNCIAS

- Amin M, Abdel-Kareem O, Takekida S, Moriyama T, Abd el-Aal G, Maruo T. Minireview: Up-date management of non responder to clomiphene citrate in polycystic ovary syndrome. *Kobe J Med Sci.* 2003;49(3-4):59-73.
- Cataldo NA, Barnhart HX, Legro RS, Myers ER, Schlaff WD, Carr BR, Diamond MP, Carson SA, Steinkampf MP, Coutifaris C, McGovern PG, Gosman G, Nestler JE, Giudice LC, Reproductive Medicine Network. Extended-release metformin does not reduce the clomiphene citrate dose required to induce ovulation in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93:3124-7.
- Check JH, Dietterich C, Lurie D. The effect of consecutive cycles of clomiphene citrate therapy on endometrial thickness and echo pattern. *Obstet Gynecol* 1995; 86:341-5.
- Creanga AA, Bradley HM, McCormick C, Witkop CT. Use of metformin in polycystic ovary syndrome: a meta-analysis. *Obstet Gynecol.* 2008; 111:959-68.
- Dehbashi S, Parsanezhad ME, Alborzi S, Zarei A. Effect of clomiphene citrate on endometrium thickness and echogenic patterns. *Int J Gynaecol Obstet.* 2003; 80:49-53.
- Dickey RP, Holtkamp DE. Development, pharmacology and clinical experience with clomiphene citrate. *Hum Reprod Update* 1996; 2: 483-506.

- Dunaif A. Molecular mechanism of insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *Semin Reprod Endocrinol* 1994; 12:15-20.
- Franks S. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1995; 333:853-61.
- Fuhrmeister L, Branchini G, Pimentel A, Kussler AP, Brum I, von Eye Corleta H. Efeito da met-formina sobre a expressão genica e protéica de receptores de insulina, de IGF-1 e aromatase em células da granulosa in vitro. *JBRA Assist Reprod*. 2011; 15:5.
- Gandar R, Spizzo M, Collin D. Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 1999; 28: 510-8.
- George SS, George K, Irwin C, Job V, Selvakumar R, Jeyaseelan V, Seshadri MS. Sequential treatment of metformin and clomiphene citrate in clomiphene-resistant women with polycystic ovary syndrome: a randomized, controlled trial. *Hum Reprod*. 2003;18:299-304.
- Gysler M, March CM, Mishell DR Jr, Bailey EJ. A decade's experience with an individualized clomiphene treatment regimen including its effect on the postcoital test. *Fertil Steril* 1982; 37:161-7.
- Homburg R. Clomiphene citrate: end of an era? A mini-review. *Hum Reprod* 2005; 20: 2043-51.
- Hwu YM, Lin SY, Huang WY, Lin MH, Lee RK. Ultra-short metformin pretreatment for clomiphene citrate-resistant polycystic ovary syndrome. *Int J Gynaecol Obstet* 2005; 90:39-43.
- Imani B, Eijkemans MJ, te Velde ER, Habbema JD, Fauser BC. A nomogram to predict the probability of live birth after clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotropic oligomenorrheic infertility. *Fertil Steril*. 2002; 77:91-7.
- Khorram O, Helliwell JP, Katz S, Bonpane CM, Jaramillo L. Two weeks of metformin improves clomiphene citrate-induced ovulation and metabolic profiles in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2006; 85:1448-51.
- Kocak M, Caliskan E, Simsir C, Haberal A. Metformin therapy improves ovulatory rates, cervi-cal scores, and pregnancy rates in clomiphene citrate-resistant women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2002; 77:101-6.
- Moll E, Van der Venn F, Van Wely M. The role of metformin in polycystic ovary syndrome: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2007; 13:527-37.
- Nakamura Y, Ono M, Yoshida Y, Sugino N, Ueda K, Kato H. Effects of clomiphene citrate on the endometrial thickness and echogenic pattern of the endometrium. *Fertil Steril* 1997; 67:256-60.
- Parsanezhad ME, Alborzi S, Zarei A, Dehbashi S, Omrani G. Insulin resistance in clomiphene responders and non-responders with polycystic ovarian disease and therapeutic effects of met-formin. *Int J Gynecol Obstet* 2001; 75:43-50.
- Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2004;81:19-25.
- Siebert TI, Kruger TF, Steyn DW, Nosarka S. Is the addition of metformin efficacious in the treatment of clomiphene citrate-resistant patients with polycystic ovary syndrome? A structured literature review. *Fertil Steril*. 2006; 86:1432-7.
- Speroff L, Fritz MA. *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. 8th ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
- Thessaloniki ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Consensus on in-fertility treatment related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2008;89:505-22.
- Vandermolen DT, Ratts VS, Evans WS, Stovall DW, Kauma SW, Nestler JE. Metformin increases the ovulatory rate and pregnancy rate from clomiphene citrate in patients with polycystic ovary syndrome who are resistant to clomiphene citrate alone. *Fertil Steril* 2001; 75:310-5.

Razão de chance elevada para Gravidez Ectópica em Pacientes com Obstrução Tubária atendidas em Clínicas de Fertilização Assistida

High Odds Ratio Risk for Ectopic Pregnancy in Patients with Tubal Obstruction in Assisted Fertilization Clinics

Fabiana Carmo Approbato¹, Mario Silva Approbato², Rodopiano Florencio², Monica Canedo Silva Maia³, Tatiana Moreira da Silva¹

¹ Mestranda do curso de pós-graduação em ciências da saúde (subárea Reprodução Humana).

² Laboratório de Reprodução Humana - Depto Ginecologia e Obstetrícia - HC-UFG.

³ Doutoranda do curso de pós-graduação em ciências da saúde (subárea Reprodução Humana).

Instituição onde o trabalho foi realizado: Laboratório de Reprodução Humana - Universidade Federal de Goiás - Goiânia - GO, Brasil.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a associação entre a presença de obstrução tubária uni ou bi lateral detectada na histerossalpingografia e antecedentes de prenhez ectópica em pacientes atendidas no Laboratório de Reprodução Humana do HC - UFG.

Pacientes e métodos: Foram estudadas 99 pacientes inférteis atendidas no Laboratório de Reprodução Humana (LABREP) no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás e Mater Clínica de Ginecologia e Obstetrícia, Goiânia. A definição de infertilidade foi o da Organização Mundial de Saúde (1992). Os critérios de inclusão foram: Infertilidade e terem realizado histerossalpingografia. Foram excluídas as pacientes que fizeram laqueadura tubária (LTB) com objetivo de contracepção. Um questionário foi preenchido na entrevista onde as pacientes relatavam antecedentes de gravidez ectópica. Foram calculados a razão de chance (Odds ratio), a sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo e negativo. O Qui-quadrado foi realizado para calcular a significância da associação para $p = 0.05$.

Resultados: Houve forte associação entre a obstrução tubária detectada na histerossalpingografia e antecedente de gravidez ectópica com Razão de chance = 19,09, I.C. (95%) = 2,179-167,299, $X^2 = 9,39$ $p = 0,001$. $S = 86,0\%$, $E = 76,0\%$, $VPP = 21,0\%$, $VPN = 99,0\%$.

Conclusão: Há forte associação entre a presença de obstrução tubária e gravidez ectópica. Esta associação poderia colocar em risco as pacientes que tentarem gravidez espontânea, por inseminação, quando uma das trompas ainda estiver permeável na histerossalpingografia ou enquanto aguardam o tratamento para fertilização assistida em casos de obstrução bi lateral. Recomendamos assim propedêutica para esta complicação em casos de atraso menstrual em todas estas pacientes.

Palavras-chave: Gravidez ectópica e infertilidade. Probabilidades e gravidez ectópica. FIV e gravidez ectópica.

SUMMARY

Objective: Evaluate the association between tubal obstructions detected by hysterosalpingography uni or bi lateral and history of ectopic pregnancy from patients attended at Laboratório de Reprodução Humana do HC - UFG.

Patients and methods: We studied 99 infertile patients attended at Laboratório de Reprodução Humana (LABREP), Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás and Mater Clínica de Ginecologia e Obstetrícia, Goiânia. The infertility criteria used was from World Health Organization (WHO, 1992). The inclusion criteria were: Infertile patients that have done hysterosalpingography. It was excluded patients with tubal ligation with contraception goal. A WHO questioner was filled in an interview when patients returned questions about ectopic pregnancy. There was an estimation of Odds Ratio, sensibility, specificity and positive and negative values. The Chi Square was performed at a $p = 0.05$ significance level.

Results: There was strong association between tubal obstruction detected by hysterosalpingography and ectopic pregnancy antecedent (Odds Ratio = 19.09, C.I. (95%) = 2.179-167.299, $X^2 = 9.39$ $p = 0.001$. $S = 86.0\%$, $S = 76.0\%$, $PPV = 21.0\%$, $PNV = 99.0\%$.

Conclusion: We found strong association between tubal obstruction and ectopic pregnancy. This association could put at risk patients who tried get pregnancy by natural methods, by insemination, when one side tubal is permeable or while is waiting for IVF treatment when bi lateral obstruction. We recommend screening for ectopic pregnancy in all patients with delayed menstruation.

Keywords: Ectopic pregnancy and infertility. ODDS ratio and ectopic pregnancy. IVF and ectopic pregnancy.

INTRODUÇÃO

O Risco de gravidez ectópica em mulheres com história de doença inflamatória pélvica é de 7-10 vezes maior do que as sem este antecedente. A clamídia é a causa principal de doença inflamatória pélvica (DIP) e infertilidade em mulheres. É a doença infecciosa mais relatada nos Estados Unidos, com 1,1 milhões de infecção em 2007, com prevalência mais elevada em mulheres sexualmente ativas de idade entre 15 a 24 anos (CDC, 2007). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que mundialmente exista 140 milhões de casos de *Chlamydia trachomatis*.

Na atualidade, é solicitada para a maioria das pacientes com queixa de infertilidade a sorologia isolada para *C. trachomatis* que detecta apenas a cicatriz sorológica.

Assim, as pacientes podem não ter mais a presença da bactéria e receber antibióticos sem necessidade. Restariam obstruções tubárias, às vezes parciais, que poderiam levar à gravidez ectópica colocando em risco a vida de pacientes.

O Colégio Americano de Ginecologia e Obstetrícia (ACOG) no guideline sobre profilaxia com antibióticos em procedimentos ginecológicos (2009) recomenda o uso de antibiótico profilático prévio à histerossalpingografia (HSG) para pacientes com tubas dilatadas, história de DIP ou dano tubário. Essa conduta demonstra a preocupação de que a bactéria possa permanecer após infecção primária e disseminar pelo abdomen após a HSG.

A contaminação das mãos com corrimento genital pode levar a uma infecção na conjuntiva após o contato com os olhos. Bebês nascidos de mães com infecção do trato genital frequentemente apresentam infecção ocular por clamídia dentro de uma semana de nascimento ("oftalmia neonatal"), podendo posteriormente desenvolver pneumonia. Vários estudos têm estimado que ocorram cerca de quatro a cinco milhões de novos casos de infecção por clamídia a cada ano nos EUA. Entre mulheres adolescentes urbanas, a taxa de incidência pode ser tão alta quanto 30%. O custo para tratar e cuidar de pacientes com DIP pode atingir US\$ 10 bilhões anuais (WHO, 2011).

Essa bactéria difunde-se exponencialmente, particularmente entre jovens e adolescentes sexualmente ativos. A infecção ocorre em homens e mulheres, mas tem consequências mais graves para as mulheres (GERBASE et al., 1998; WHO, 2001).

Em 15 % das mulheres com DIP, a dor pélvica é uma manifestação crônica provavelmente relacionada com as aderências na pelve, ovários e tubas. Embora a maioria das pacientes não tenha sintomas, quando ocorrem são relatados uretrite com secreção no homem e uretrite, cervicite e vaginite na mulher.

Approbato (2012) encontrou 27 % de obstrução tubária em 96 pacientes inférteis estudadas, sendo 39,4 % quando a sorologia para clamídia por imunofluorescência indireta (igG) ou enzima imunoensaio (EIE) eram positivas comparado com 20,6 % quando estas sorologias foram negativas (risco de ODDS 2,5 $p = 0,04$). Esta mesma autora (2012) observou gravidez ectópica em 7,1 % das sorologias positivas, contra 5,6 % quando eram negativas (risco de ODDS 1,74 $p = n.s.$).

Foi o objetivo deste trabalho, avaliar as prevalências de gravidez ectópica e de obstrução tubária e a probabilidade das pacientes com obstrução parcial ou total em apresentar gravidez ectópica em pacientes com esterilidade feminina atendidas no Laboratório de Reprodução do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás.

PACIENTES E MÉTODOS

Foram estudadas 99 pacientes inférteis com média de idade de 33 anos (DP +/- 5 anos) atendidas entre Janeiro de 2011 a Fevereiro de 2012 do Laboratório de Reprodução Humana (LABREP) no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás e Mater Clínica de Ginecologia e Obstetrícia, Goiânia. A definição de infertilidade foi o da Organização Mundial de Saúde (1992). Os critérios de inclusão foram: Infertilidade e terem realizado histerossalpingografia. Foram excluídas as pacientes que fizeram laqueadura tubária (LTB) com objetivo de contracepção. Um questionário foi preenchido na entrevista onde as pacientes relatavam antecedentes de gravidez ectópica. Foram calculados a Razão de chance (Odds ratio), a sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo e negativo. O Qui Quadrado foi realizado para calcular a significância da associação para $p = 0,05$.

RESULTADOS

Tabela 1. Distribuição das pacientes, segundo o risco de prenhez ectópica e obstrução tubária (Odds ratio)

	Ectópica + (%)	Ectópica - (%)	Total
Obstrução (+)	6 (21,43)	22 (78,57)	28 (100,00)
Obstrução (-)	1 (1,41)	70 (98,59)	71 (100,00)
Total	7 (7,07)	92 (92,93)	99 (100,00)

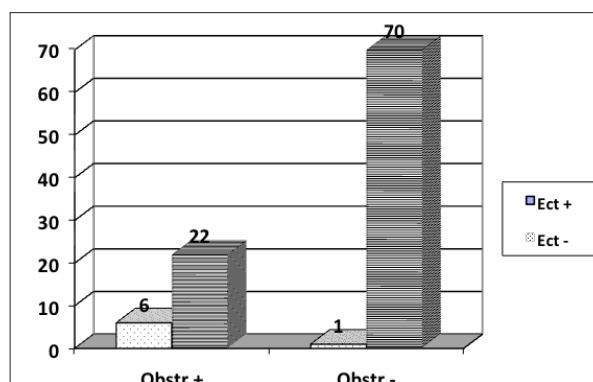


Fig. 1. Distribuição das pacientes, segundo o risco de prenhez ectópica e obstrução tubária (razão de Odds)

OR = 19,09 I.C. (95%) = 2,179-167,299 $X^2 = 9,39$ $p = 0,001$
 S = 86,0% E = 76,0% VPP = 21,0% VPN = 99,0%

Na tabela e figura 1 observa-se que quando havia obstrução tubária uni ou bilateral 21,4 % das pacientes tiveram prenhez ectópica. Quando as trompas estavam permeáveis, esta complicação ocorreu em 1,4 %. Esta diferença foi estatisticamente altamente significativa.

DISCUSSÃO

Há mais de 100 000 gravidezes ectópicas por ano relatadas nos Estados Unidos. Este número é certamente maior porque somente os casos tratados cirurgicamente são relatados (CDC 2995; Zane et al 2002). Pelo menos 90 % das gravidezes ectópicas são localizadas na trompa de Falópio, destas, 80 % são localizadas na região ampular. Além do risco para prenhez ectópica da obstrução ou semi obstrução tubária encontrada neste trabalho, outros fatores de risco também são relatados. O conhecimento destes riscos pode ajudar a identificar as mulheres que podem se beneficiar do rastreio precoce. Condições de alto risco incluem: História de gravidez ectópica prévia; História de cirurgia tubária inclusive esterilização tubária; História de doenças sexualmente transmissíveis; Infecção da tuba ou aderência pélvica; Uso atual de DIU; Gravidez resultante de fertilização assistida e fumo.

A gravidez ectópica é causa importante de morbidade e mortalidade no primeiro trimestre da gravidez. Atualmente é diagnosticada precocemente com boa acuracidade por ensaios hormonais seriados e ultrassonografia transvaginal (USTV), facilitando o diagnóstico precoce antes que a ruptura ocorra. Este diagnóstico precoce resultou em queda dramática da mortalidade materna por esta patologia (Berg et AL, 2003). Os níveis séricos de hCG comparados com USTV para o diagnóstico de prenhez ectópica foram avaliados por Mol et al (1998). Estes autores recomendam um ponto de corte para o hCG de 1.500 UI/L para pacientes com massa ou fluido no fundo de saco de Douglas. Em pacientes sem estes achados o ponto de corte diagnóstico deveria ser pelo menos 2000 UI/L.

Quanto ao tratamento conservador da gravidez ectópica, Elito Junior et al (2008) referem que os principais critérios para indicação de metotrexato são estabilidade hemodinâmica, β -hCG <5.000 mUI/mL, massa anexial <3,5 cm e ausência de embrião vivo. A dose única de 50 mg/m² intramuscular seria a preferencial por ser mais fácil, mais prática e com menores efeitos colaterais. A conduta expectante deveria ser indicada nos casos de declínio dos títulos da β -hCG em 48 horas antes do tratamento e quando os títulos iniciais fossem inferiores a 1.500 mUI/mL. Canedo et al (2010) estudando pacientes inférteis, encontraram associação significativa entre sorologia positiva para clamídia (Imunofluorescência indireta) e gravidez ectópica. Entre 72 pacientes com titulação significativa, 12,5% apresentaram a ocorrência de gravidez ectópica, contra 3,8 % entre 132 pacientes com titulação não significativa ($p < 0,05$). Esta mesma autora (2011) avaliando o melhor ponto de corte da curva ROC da Imuno fluorescência indireta para detectar obstrução tubária, encontrou o melhor ponto quando a titulação foi de 1/64 com pouca diferença entre 1/16 e 1/64. O diagnóstico de obstrução tubária pela histerossalpingografia embora largamente empregado, não tem boa sensibilidade. Desta forma Swart et al (1995) descreve sensibilidade de 65 % (95% CI: 50 %, 78 %) e especificidade de 83 % (95% CI: 77 %, 88%) para este exame. A clamídia é responsável pela maioria das doenças inflamatórias pélvicas e obstrução tubária. Neste sentido encontramos neste trabalho uma associação também significativa entre obstrução parcial ou total das trompas e gravidez ectópica e quantificamos esta relação com o Odds ratio. Nos grupos estudados não houve diferenças entre os parâmetros seminais. Farhi et al (2007) encontraram uma taxa cumulativa de gravidez em três ciclos de inseminação intra uterina em pacientes com obstrução unilateral de 30,9%. Quando foram separadas as pacientes com obstrução distal, a taxa de gravidez caiu para 19%. Entretanto, com a magnitude de risco encontrada em nosso trabalho, sugerimos que as pacientes com obstrução parcial ou total das trompas que forem submetidas a tratamento de infertilidade ou aguardando tratamento deveriam ser submetidas a rastreamento para gravidez ectópica caso tenham atraso menstrual.

Correspondência:

Fabiana Carmo Approbato. Av. Edmundo Pinheiro de Abreu, 131 Apto 103 Setor Pedro Ludovico. Goiania, Go - CEP 74.823-030. Fone: (62)9979-2255. Email: aprobato.m@hotmail.com / fabianaprobato@gmail.com.

REFERÊNCIAS

American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG). Antibiotic prophylaxis for gynecologic procedures.

Washington (DC): American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG); (ACOG practice bulletin; no. 104). [55 references]. 10 p. May 2009.

Approbato FC. Prevalência da chlamydia trachomatis pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e ensaio imunoenzimático em mulheres inférteis. Trabalho apresentado ao programa de pós-graduação em ciências da saúde para obtenção do grau de mestre. Universidade Federal de Goiás, 2012.

Berg CJ, Chang J, Callaghan WM, Whitehead SJ. Pregnancy-related mortality in the United States, 1991–1997. *Obstet Gynecol* 2003;101: 289–96.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Male Chlamydia Screening Consultation, Atlanta, Georgia. Meeting Report, May 2007. Available at <http://www.cdc.gov/std/chlamydia/ChlamydiaScreening-males.pdf>. Acessado em 24/02/2012.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Ectopic pregnancy— United States, 1990–1992. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1995;44:46–8.

Elito Junior J, Montenegro NAM, Soares RC, Camano L. Gravidez ectópica não rota – diagnóstico e tratamento. Situação atual. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2008; 30(3): 149-59.

Farhi J, Ben-Haroush A, Lande Y, Fisch B. Role of treatment with ovarian stimulation and intrauterine insemination in women with unilateral tubal occlusion diagnosed by hysterosalpingography. *Fertil Steril* 2007; 88: 396–400.

Gerbase AC, Rowley JT, Mertens TE. Global epidemiology of sexually transmitted diseases. *The Lancet*, 1988; 351: 2-4.

Maia MCS, Approbato MS, Florêncio RS, Silva TM, Approbato FC. Gravidez ectópica em pacientes com titulação significativa para Chlamydia trachomatis. *Reprod Clim* 2010; 25:73-9.

Maia MCS, Approbato MS, Florêncio RS, Silva TM, Approbato FC. Identificação do ponto de corte para anticorpos IgG em infecção por Chlamydia trachomatis. *JBRA Assist Reprod* 2011; 15:28-9.

Mol WJ, Hajenius PJ, Engelsbel S, Ankum WM, Hemrika, DJ, Bossuyt PMM, Van der Veen, F. Serum human chorionic gonadotropin measurement in the diagnosis of ectopic pregnancy when transvaginal sonography is inconclusive. *Fertil Steril* 1998; 70:972–91.

Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mellows HJ.: WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple. 3rd ed. Geneva: WHO, 1992.

WHO. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections: overview and estimates. Geneva: WHO; 2001.

Swart P, Mol BWJ, Vanderveen F, Vanbeurden M, Redekop WK, Bossuyt PMM. The accuracy of hysterosalpingography in the diagnosis of tubal pathology: a meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 1995; 64:486-91.

WHO, Initiative for Vaccine Research (IVR), Sexually Transmitted Diseases, 2011. Disponível em: <http://www.who.int/vaccineresearch/diseases/soastd/en/index1.html>. Data de acesso: 04/10/2011.

Zane SB, Kieke BA Jr, Kendrick JS, Bruce C. Surveillance in a time of changing health care practices and estimating ectopic pregnancy incidence in the United States. *Matern Child Health J* 2002; 6:227–36.

Reprodução assistida

Dois modelos de regulação: Portugal vs. Espanha

Assisted reproduction

Two models of regulation: Portugal v. Spain

Vera Lúcia Raposo

Assistant professor at the Faculty of Law of Coimbra University (member of the Centre of Human Rights and the Centre of Medical Law) Of Counsel in Vieira de Almeida e Associados – law firm vera@fd.uc.pt; vlr@vda.pt

RESUMO

As leis portuguesa e espanhola sobre reprodução assistida situam-se algures entre a regulamentação norte-americana, particularmente liberal, e a os regimes legais vigentes na Alemanha e na Itália, extremamente restritivos.

Objetivo: descrever os traços principais destas duas leis, comprando as respetivas soluções e sublinhando as suas diferenças, de forma a apontar os aspetos que poderiam ser aperfeiçoados em cada uma delas.

Método: análise comparativa.

Resultado: as soluções legais de Portugal e Espanha nesta matéria não diferem substancialmente. Apesar de a lei espanhola ter adotado respostas mais abertas em aspetos particulares, o facto é que previsivelmente estas irão ser igualmente acolhidas na lei portuguesa, por força da pressão da doutrina jurídica, dos partidos liberais de esquerda e do Conselho Nacional de Procriação Medicamente Assistida.

Palavras-chave: Reprodução assistida, regime legal, embriões, Portugal, Espanha

ABSTRACT

Portuguese and Spanish laws on assisted reproduction are located somewhere between the particularly liberal regulation of the United States, and the extremely restricted current legal regimes of Germany and Italy.

Objective: The aim of his short study is to describe in its main features these two laws, comparing their solutions and focusing their differences, in order to point out the aspects that could be improved in each one of them.

Method: a comparative analysis

Results: Legal solutions in Portugal and Spain on this topic do not differ substantially. Though Spanish law adopted more open-minded answers in particular aspects, the fact is that those solutions probably will be also welcomed in Portuguese law, due to the pressure of legal thinkers, left-wing liberal politicians and the National Council of Medically Assisted Reproduction.

Keywords: Assisted reproduction, legal regulation, embryos, Portugal, Spain

1. The two main models of regulation

Artificial reproductive techniques (ART) can basically follow two models of regulation: the one considered restrictive and the one considered liberal. These extreme survive along with hybrid models.

The restrictive model can be found in Germany, Austria, France and Italy.

German law - *Gesetz zum Schutz von Embryonen - Embryonenschutzgesetz-ESchG* (EschG) - is one of the more restrictive existing acts in this domain, a trait which may found a plausible explanation in the intention to react against the horrors of the Nazi past. Nonetheless, this feature became the target of severe criticism, pointing the excessive use of punitive power (Benítez Ortúzar, 1998). In Austria is in force the Federal law n. 275, of 4th July 1992 (*Fortpflanzungsmedizingesetz - FMedG*), qualified as well as restrictive. An issue that has been very controversial within the FMedG is the prohibition, thereby stated, of oocyte donation and sperm donation, but this last one only in case of in vitro fertilization because, strangely enough, sperm donation is allowed in artificial insemination (Novak, 2000; Stormann, 2002). The Austrian Constitutional Court confirmed the constitutionality of this regime in its decision from 14th October 1999, considering that the state interference in private life and in private decisions of infertile couples was not unjustified. However, the discussion arrived to the European Court of Human Rights, which condemned the Austrian government for violation of article 8 of the European Convention of Human Rights (the right for private and family life), in case *S. H. and Others v. Austria*, n.º 57813/00, from 15th November 2007.

In the French system two of the most important diplomas are law n. 94-653, of 29th July 1994, concerning the respect for the human body, and law n. 94-654, of 29th 1994, about donation and use of elements of the human body, medical assistance to procreation and prenatal diagnosis (Byk, 1992). However, nowadays the regulation of assisted procreation is primarily stated on the Public Health Code (*Code de la Santé Public*) and, to some extent, in the Civil Code and in the Criminal Code. It is also a conservative regulation, more directed for communitarian values than for individual interests, and very compromised with the safeguard of traditional principles, under the designation of public order, the famous "*ordre public*".

Italian legislation is much more recent than the laws in force in other European countries, because for quite some time the only existing dispositions came from ministerial guidelines and from the Code of Deontological Medicine. Only in 2004 law n. 40, of 19th February, imposed legal norms in this domain (Cassonato, 2005; Manetti, 2004; Tripodina, 2004). Since the very beginning this law was much criticized because of its restraining nature. As a result, decision n. 151/2009 of the Italian Constitutional Court, from 1st April 2009, substantially changed some of its provisions in order

to render it more congruent with the recent scientific achievements, namely regarding the number of embryos that may be transferred to the woman uterus. The liberal model is typical of the United Kingdom and Spain. British regulation is closer to the north-American model than the pattern typical of European countries, namely because of the primacy conferred to individualism and to self-determination. Nonetheless, in United States regulation is very scarce and there is a lack of control of what private do, especially due to the absence of an entity able to carry out that supervision. On the contrary, in the United Kingdom, though the law is quite permissive, the Human Fertilisation and Embryology Authority performs his duty to control the many pretension not expressly regulated in the Human Fertilisation and Embryology Act, the HFEA (Blyth, 2004; Garwood-Gowers, 2004).

But the main target of this study will be the legal regimes of Iberian countries, which do not entirely coincide with each other, since Spain presents a regulation (law n. 14/2006, from 26th May) unanimously considered a "broadminded" one (Berrocal Lanzarot, 2008, 2009; Raposo, 2006), while Portugal can be qualified as a mixed model. To be more precise if fair to say that Portuguese law (law n. 32/2006, from 26th July) also follows the liberal line, though in some issues is more restrictive than Spain (Raposo & Pereira, 2006).

Remarkably, but in accordance with the Portuguese conservative tradition, the law was even accused of being too liberal, and consequently brought in front of the Constitutional Court by a group of parliamentarians, asking for more caution and restrictiveness in some topics, namely the absence of a maximum limit of age for female beneficiaries and the admission of many various contested practices, such as the pre-implantation genetic diagnosis, the savior sibling, embryo's investigation, heterologous reproduction, the existence of surplus embryos and surrogacy. The legal solution for revelation of donor's identity, filiation rules and reproductive cloning was also invoked to sustain the unconstitutionality of the law. However, the Constitutional Court, in its decision n. 101/2009, of 3rd March, declined all the suspicions of unconstitutionality (Raposo & Reis, 2009) and, curiously enough, the changes that presently are being discussed intend to impose a further opening to autonomy and science. In other words, the anticipated changes go precisely against the remarks pointed at that time in order to ask for the declaration of unconstitutionality of law n. 32/2006.

Therefore, we are going to proceed to the analysis of some of the main features of both regulations on assisted reproductions, and evaluate how Spanish and Portuguese laws responds to these challenges.

2. The juridical status of the embryo

Fecundation is the very beginning of a new human life. But, and notwithstanding the vital role of fecundation, nidation appears as a decisive moment, which increases exponentially the possibility of the embryo become a person (it must be underlined that it is not a person already). The relevance of nidation is founded on several events that take place precisely because the embryo survives enough time to nidate in the uterus, around approximately 14/15 days after fecundation. First and foremost, by that period the embryo acquires the characteristics of unity and unicity, in other words, loses the possibility to divide into twins or, in the opposite, to join together with another embryo and to create a chimera. But this moment is extremely relevant also because after nidation we assist to the emergence of the primate streak, the first sign of the central nervous system. Finally, and

as a result of the referred notes, the existence of the embryo becomes more certain, since before nidation the risk of embryonic loss is much high (Abellán-García Sánchez, 2001; Hetz, 2005). For much of the juridical doctrine – this author included – these biological events are decisive in order to confer to the nidated embryo a different juridical status.

As previously referred, the embryo is not a person. Nor it is a thing, in the classical juridical sense of "res" (Raposo & Osuna, 2007; Raposo et al. 2010). Actually, is quite complex to provide the embryo with an accurate juridical categorization, because of the poverty of concepts which characterizes the juridical world. Probably the classification that suits it better is the one of *tertium genus*, in the sense of an entity in between a person and a thing. But we can certainly say that the embryo is a potential person, since it has the potentiality to become one once the adequate conditions are fulfilled. Nevertheless, note that the designation of "potential person" intends to underline that, right now, it is something different from a person, and it may never actually turn into one.

The potentiality that typifies the embryo dictates one of the decisive notes of its status: the reinforcement of juridical protection according to the level of embryonic development (Mazonni, 2005; Warnock, 1998). In other words, the protection granted to eight weeks embryos is less than the one provided to eight months fetus, because it increases as the potential person gets closer to an actual person. This same understanding was firm in the known decision *Roe v. Wade* (410 U.S. 113 [1973]), from the north-American jurisprudence, though in *Roe* the Supreme Court declared that in the first trimester the mother can freely decide, according to her wishes, if she wants to terminate the pregnancy, and therefore may exercise her "right to abort" (in itself a contested juridical figure), while we defend (as usually stated by Constitutional Courts around Europe) that the mother is not entitled with an absolute and totally free power to decide, not even in the first period of gestation, since human life has always a constitutional objective value (though the present laws on abortion seem to overrule this basic principle by freely admitting abortion in first months of pregnancy).

There are certainly legal texts that seem to contradict this supra described understanding, and defends that embryos possess the juridical status of persons and own fundamental rights. In international terms the most problematic norm is article 4/1 of the American Convention on Human Rights (ACHR), which states: "Every person has the right to have his life respected. This right shall be protected by law and, in general, from the moment of conception. No one shall be arbitrarily deprived of his life". According to the middle sentence, the right to life can be entitled from the moment of conception; therefore, it seems like the embryo is a person from that very moment, since only persons can be entitled with rights. Nevertheless, this is a rushed and legally unjustified interpretation of the norm (Raposo, 2009a; Raposo et al. 2010). First of all, regarding the level of protection. Is commonly accepted in the legal doctrine that fundamental rights present two separate dimensions: the objective one and the subjective one. Embryos can only apply to the objective dimension, since the subjective dimension requires the presence of a person and embryos are not persons. This statement is not a merely personal standing, but the consolidated position of many constitutional jurisdictions in Europe.

It started with the German Constitutional Court in its decision from 1975 (BVerfGE 39, 1) regarding §. 2 Abs.

2 of the German Constitutional Law. This norm states: "Jeder hat das Recht auf Leben", which can be roughly translated as all have the right to life, or everyone has the right to life. Some years later the same position was once again affirmed in a decision from 1993 (BVerfGE 88, 203) with minor differences.

Afterwards this understanding was upheld by other judicial authorities, such as the Spanish Constitutional Court (the first time in decision n. 53/1985, from 11th April 1985) and the Portuguese Constitutional Court. In Portugal this has been the consistent position of the Court at least since the decision n. 25/84, from 19th March. It was also proclaimed in decision n. 85/85, from 29th May; decision n. 288/98, from 17th April; decision n. 617/06, from 15th November; and decision n. 75/2010, from 23rd February, all concerning uterine embryos. But the same idea can be found also in decision n. 143/2007, from 28th February, about in vitro embryos.

Despite not being a person the embryo is not, certainly, a bunch of cells, a *res*, i.e., a thing. It represents a constitutional value – the objective value of human life – therefore, deserves a relevant constitutional defense, expressed, for instance, in the prohibition of creating embryos solely for experimental purposes. However, it can only aspire to an objective protection, which is necessarily weaker than the subjective one.

Another comment that can be made to article 4/1 of ACHR relates with the expression "conception". Traditionally this term was referred to the moment of fecundation, but nowadays is usually understood (especially by the majority of scientists) as nidation, for the reason that before nidation is completed the existence of the embryo is very fragile, and chances are it never born and ends up being expelled by the female body. This thesis is in complete consonance with the theory of the gradual protection of the embryo and the foetus. An accurate concretization of its principles can be found in the legal regime of abortion dominant in European countries, according to which before nidation the destruction of uterine embryos is not even prohibited. In other words, the second day pill is allowed and freely sold in pharmacies because its use is not considered a modality of abortion, while after nidation the level of prohibition increases as the pregnancy develops (Romeo Casabona, 2003).

In sum, there are not delimited barriers able to define the limits between the absence of protection and the absolute protection (Romeo Casabona, 1994). But we do have, certainly, relevant moments in the development of the embryo: first of all, fertilization, when a new human being gains existence; afterwards, nidation, that confers to the human being a level of certainty and determination (unity and unicity) inexistent until then; and finally birth, which marks the beginning of a human person and the entitlement of rights

3. Acces to reproductive techniques

Access to ART becomes predominantly problematic in light of the consideration of reproduction (either by sexual intercourse either with medical assistance) as a fundamental right or a human right (Raposo, 2005, 2007b, 2010c), just like recognized by many legal authors and also by judicial decisions. If it is a fundamental right, then, it must be demanded a particularly stringent justification in order to restrict the possibilities to use reproductive techniques, a requirement not consistent with the mere invocation of moral conceptions.

According to Portuguese law (article 6/1 law n. 32/2006), only heterosexual marriages and heterosexual stable relationships can use ART (Raposo, 2007b).

Actually, the law only demands the requisite of heterosexually for non married couples, because when it was redacted marriages were, necessarily, between a man and a woman. However, since than the Portuguese legal order allowed marriages between people of the same sex (law n. 9/2010, from 31st May), but the legislation enacted to admit same sex marriage "forgot" to circumvent the situations foreseen in law n. 32/2006, nor this last law was modified in accordance. Therefore, it was the National Council of Medically Assisted Reproduction (CNPMA) which clarified the current interpretation of article 6/1 of law n. 32/2006, but we have many reserves about the legitimacy of the Council to do so, especially because it is restricting fundamental rights, a task only available to the legislator.

Some legal scholars in Portugal have sustained that the text of law n. 32/2006 was still consistent with the prohibition of access to ART by gay married couples, especially when also considered a systematic interpretation of the entire regulation (Loureiro, 2010a). This is indeed correct. But the fact is that the opposite legal interpretation has also some strong grounds on its favor (Raposo, 2010a, 2010b). Therefore, it is required a subsequent legislative intervention to clarify the legal solution, in view of the fact that the explanation of the CNPMA does not have enough authority to solve the dilemma.

Notwithstanding the doubts that still remain, the development which is being witnessed in Portuguese law is notable and well-received. Actually, this is a tendency spreading around Europe, where same sex couples are allowed to use ART also in Belgian, Iceland, Norwegian, The Netherlands, Sweden and Denmark.

On the contrary, the Spanish law uses the expression "every woman" (article 6/1 law n. 14/2006) to delimitate the beneficiaries of reproductive techniques. In other words, those techniques are for women, not for couples, and the target women may be married or single, heterosexual or homosexual. The norm even clarifies that it disregards civil status and sexual orientation.

Pretty much the same applies to English law, the HFEA. Until 2008 the HFEA allowed the access by a single woman or by a lesbian female couple (the use of ART by single men or gay male couples was always more problematic because of the necessary use of surrogacy, admitted with restrictions in English law, therefore, another set of norm applies to this particular case). But imposed a safeguard: the well-being of the future child had to be necessarily contemplated, especially the need for a father, as it was stipulated in § 13(5) of HFEA: "A woman shall not be provided with treatment services, other than basic partner treatment services, unless account has been taken of the welfare of any child who may be born as a result of the treatment (including the need of that child for a father), and of any other child who may be affected by the birth". Thus, although the norm did not impose the presence of a man, it did demand the evaluation of the consequences of his absence for the child. Nonetheless, in 2008 this imposition was modified and today it only states "the need for supportive parenting", wish is a less demanding formula and eases the use of ART by same sex couples. However, questions still arise: the norm refers to economic or affective support? Support to the child or to the other parent? Who evaluates this requisite: the physician, the Human Fertilisation and Embryology Authority or a court of law?

4. Justifying reasons to use ART

Under Portuguese law ART is addressed as a subsidiary mechanism. Only three classes of reasons are admitted

to justify the use of ART (article 4 law n. 32/2006): infertility, treatment of a serious health condition and the risk of transmitting a genetic disease, as infectious diseases or some other kind of pathologies.

Infertility is the less problematic motivation, though it remains the doubt about infertility derived from age, there is, the use of ART in post-menopause women. The so-called "social infertility" – there is, the one that characterizes same sex couples – is also a problematic dimension on the various understandings of infertility.

The second motive is quite obscure, and almost nobody refers it, but it seems that the legislator was referring to the use of ART to provide the so called savior sibling, though it can also be understood as the possibility to use ART in order to apply to genetic therapy.

The last motivation is almost consensual, although neither the law neither a subsequent regulation defines what kind of sicknesses are here included. This silence leaves particularly relevant doubts, namely because not even is demanded the gravity of the disease. The use of reproductive techniques by people with HIV/AIDS was, at some point, a very discussed question in Portuguese legal order, especially because of an opinion issued by the National Council of Ethics and Life Sciences (CNECV), affirming that their access should not be allowed, since persons suffering for HIV/AIDS were going to die in a short period of time, thus leaving a young child without parents (opinion 44/CNECV/04). This was clearly a misleading argument used to hide the real concern of CNECV. The content of the mentioned opinion can only be explained because CNECV was disturbed with some kind of moral prejudice regarding the sexual conduct of people with HIV/AIDS. Nowadays - and this was already true in 2004 - patients with HIV/AIDS can aspire to a life expectancy not much different from that of everyone else. In addition, the CNECV never rejected the use of reproductive techniques by patients suffering from other illnesses, even with a lower life expectancy, but which are not associated to recriminatory behaviors. This note demonstrates that what was at issue was the evaluation of some people's behavior in order to become a parent, in an illegitimate and discriminatory way (Raposo, 2010d). Inversely, the Spanish law does not require any particular reason in order to use ART, and uniquely states that "every woman" (article 6 law n. 14/2006) in good mental and physical conditions may use reproductive techniques. This regulation presents the following particularity: nothing, in its text, demands a specific motivation to access ART, as opposed to what happens in Portuguese law.

In the field of the previous statute (law n. 35/1988, from 22nd November) the solution was similar to the Portuguese one, given that article 1/2 stipulated that the techniques of assisted reproduction had, as main objective, "to medically assist the problems of human sterility in order to facilitate procreation when other therapeutic methods have been discarded for inadequate or ineffective". Nevertheless, and since the norm referred only a main objective, not a exclusive objective, it could be defended at that time that the law did not strictly forbade the use of ART grounded on other motivations, an interpretation actually reinforced by the actual redaction of the norm (Romeo Casabona, 1996).

Therefore, it seems that, at the present time, those techniques are addressed as an alternative way of reproduce in Spanish legal order. Effectively, since the law does not impose any requisite - infertility, or any other - it looks as if a woman may require the use of the techniques for the single fact that she does not have a partner and needs a sperm donor. However, scholars are divided in this issue,

and some of them require female infertility even in cases of single women (Herrera Campos, 1991), while others omit the referred requirement (Romeo Casabona, 1994). This last interpretation seems to be the most accurate in our opinion, for the reason that we cannot "invent" a requisite that the law, itself, does not demand, nor even by means of a systematic interpretation, since we are dealing with fundamental rights.

5. Destiny of surplus embryos

Portuguese law does not dictated a specific number of embryos to be created or to be transferred, nor imposes a maximum limit for it. Instead, the legislator decided – an option that entirely collects our support – to refer the decision to physicians, who shall decide according with medical *legis artis* and in consideration of the particularities of the concrete situation. The only imposition enforced by the law relates with the aim of preventing multiple pregnancies and the respect for informed consent of the parties (article 24 law n. 32/2006).

The described solution is wiser than the one foreseen in Spanish law (article 6/2 law n. 14/2006), which determinates that the maximum number of embryos to transfer in each reproductive cycle is three, but afterwards forgets to define the maximum number of embryos to be created. By not demanding any kind of evaluation on this matter the law is leaving a dangerous open door to create an excessive quantity of embryos, perhaps deliberately to be used in scientific investigation.

Nevertheless, and despite the prudence mentioned in most regulations on this subject, in the majority of cases the number of created embryos exceeds the amount allowed, or recommend, to uterine transference. This failure is dues to limitation intrinsic to the technique. When this happens the surplus embryos are cryopreserved until some other destiny is determinate to them, usually requiring the free and informed consent of the beneficiaries of the techniques (Raposo, 2010c; Sozou et al., 2010). The silence of the beneficiaries, or the inability to achieve a consensus, refers the decision to a court, especially when a member of the couple (usually the woman) desires to transfer the embryos while the other asks for their destruction, opposing the right to reproduce to the right to not reproduce (Raposo, 2008).

The following destinations are foreseen in Portuguese law to surplus embryos when immediate uterine transference is not an option: embryo donation, cryopreservation until further use by the beneficiaries of the techniques and scientific experimentation, all under the previous informed consent of the beneficiaries (articles 9 and 25 law n. 32/2006).

The supra mentioned destinations must be decided in a certain time period, since embryos cannot be everlasting preserved, not as much for scientific reasons but mainly for juridical and ethical motifs. Portuguese legislation imposes the term of three years (article 25/1 law n. 32/2006), during which the beneficiaries have to take a decision, otherwise embryos will be destructed. In practical terms what happens is that the beneficiaries systematically refuse to carry the weight of such a pronouncement, and remain in silent. Though this is an unsustainable situation - because they should be demanded to take the responsibility for their reproductive decisions - the fact is that reproductive centers fear to destroy the embryos without an explicit decision by the beneficiaries, and usually maintain the cryopreservation, frequently at their own expenses. Consequently, the legislator should intervene in this topic in order to clarify the accountability of the beneficiaries concerning the destiny of their embryos.

Spanish law is more flexible regarding this issue, and allows embryos to be preserved until the beneficiary woman maintains her physical conditions, clinically attested, to carry on a pregnancy (article 11/3 law n. 14/2006), which coincides usually, but not necessarily, with her fertile period. Insofar they are preserved the woman can decide what to do with them (if she is married the power to decide belongs equally to her husband, but the laws does not mention the male or female companion), namely if she intends to donate the embryos or to use them in scientific experimentation (articles 11/5 law n. 14/2006). Regarding the possible uses of surplus embryos the solution is similar to the Portuguese one (article 11/4 law n. 14/2006). From a certain perspective in the Spanish regime the possibility of destroying embryos seems more congruent with the remaining legal aspects of the regulation, since this law qualifies the *in vitro* embryo as a pre-embryo, there is, an entity that is not an embryo yet. According with article 1/2 of law n. 14/2006, the pre-embryo is the *in vitro* embryo constituted by a group of cells resulting from the progressive division of the oocyte, from the moment of fecundation until the 14th day, therefore distinguishable from the embryo *proprio sensu*, which corresponds to the next step of the embryonic development until fifty six days after fecundation. Spanish law is one of the few legislations that uses this expression in legal norms. Indeed, in the last couple of years criticism rained down from many quarters to the concept of pre-embryo, accusing this concept of degrading the protection granted to every single kind of human life and, as a result, legal texts and even scientific studies have been abandoning the expression "pre-embryo".

6. Scientific use of embryos

One of the objectives of ART regulation is to prevent that embryo's cryopreservation be maintained *ad eternum*. Not only because scientifically we still have doubts about their conditions to develop after some time of preservation, but also because juridically and ethically the maintenance of a human life in stand by raises severe problems, due to the valor and protection conferred to every kind of human life. Because of all the supra mentioned reasons, at same point embryos need to be destroyed.

Since we cannot force a woman to carry a pregnancy without her will, and also considering that *in vitro* fertilization cannot be performed presently without that lateral negative effect of creating an excessive number of embryos, destruction is accepted as a kind of lesser evil and, paradoxically, some authors do prefer immediate destruction than the scientific use of embryos (Loureiro, 1997; Serrão, 2003).

Nevertheless, it is a waste of valuable resources to simply destroy the embryos without previously withdraw some benefits from them. In fact, scientific studies and experimentation on embryos may be a precious mechanism to understand the functioning of the human body, to solve some of the present limitations of ART, and even to find new ways of combating illnesses that attack humanity. Therefore, in our published works we have been strongly recommending that, before being destroyed, embryos should be used in scientific purposes, as for instance the recollection of stem cells (Raposo & Osuna, 2007).

This is not a purely pragmatic consideration. On the contrary, it is a conclusion justified in the idea of respect for the embryo, since the best way to honor and respect its life is to allow it to contribute in some way to the well-being of mankind, thereby fulfilling the principle of human solidarity.

The kantian principle of non instrumentalization cannot be understood as a total prohibition of using human life in order to obtain benefits to other human life, as long as that use does not impose a death which in not a previous consequence of some other event. Actually, if the kantian principle were to be understood in such an absolute way even organ donation will be prohibited, just as Kant himself advocated (Munzer, 1993). Therefore, the wisest interpretation of the kantian thinking is to forbid only the mere - in the sense of exclusive and without anything more - use of the person as means, but not treating a person as means as long as collaterally treating her as an end in itself. Finally, but not less important, note that all Kantian theory is referred to "persons", there is, born human beings, while here we are talking about non-persons (Devolder, 2005; Ford, 2002; Raposo, 2010c; Raposo & Osuna 2007).

Portuguese law was sensitive to these considerations. As a result, though prohibiting the creation of embryos solely for scientific purposes, does allow embryo experimentation under certain conditions (article 9 law n. 32/2006): i) benefits to mankind must be expected; ii) the scientific project needs the approval of the CNPMA; iii) prohibition of subsequent uterine transfer of the embryos, after their scientific use. Furthermore, only some kind of embryos may be considered: surplus embryos to which no parental project is available; embryos with genetic abnormalities, properly detected by a pre-implantation genetic diagnosis; embryos that, for other reasons, are not fit to uterine transfer; embryos not resulting from the fertilization of an oocyte by a spermatozoa (presumably, embryos obtained by cloning). Note that, in the first two hypotheses, the consent of the beneficiaries of the techniques is required.

Embryo investigation is also allowed by Spanish law and, once again, some conditions must be fulfilled (article 15 law n. 14/2006): i) prohibition of uterine transference of embryos used in experimentation; ii) written consent of the woman, or of the couple; iii) approval of the scientific project by a public entity; iv) implementation of the project in an authorized centre. A further requisite - not expressly demanded in Portuguese law, though we can sustain that it is an implicit one - is that embryos do not surpass the 14th day after fertilization, which actually coincides with the already mentioned period of weaker protection (some people even talk about a pre-embryo during this time, as something which is not effectively an embryo), and that assumes special relevance in criminal law.

The previous law - law n. 35/1988 - provided a stronger protection to surplus embryos, inasmuch restricted pure experimentation (in other words, experimentation without diagnostic, therapeutic or preventive aims regarding the embryo) to non viable embryos. The concept of viability was central under this legal regime. The problem was - and this was actually the main target of criticism - that the law did not provide any definition of viability. Nevertheless, and notwithstanding the mentioned uncertainty, the prohibition of experimentation in viable embryos was the decisive note that made possible to escape to a judgment of unconstitutionality by the Spanish Constitutional Court (Lema Añón, 2000). Differently, the regulation of 2006 came to allow the scientific use of viable embryos, in the supra described conditions, and thus generated complex problems to a constitutional jurisdiction that for almost two decades grounded its decisions in the restriction of experimentation to non viable embryos (Abellán-García Sánchez, 2008). Nevertheless, and until the present day, law n. 14/2006 has not been reported as unconstitutional by the Spanish Constitutional Court.

In Portugal embryonic investigation outside the legal parameters is a criminal activity, sanctioned in article 40 of law n. 32/2006 which, because of its broad terms, criminalizes also the creation of embryos for exclusively scientific purposes. Differently, the Spanish law on assisted reproduction only deals with experimentation without the necessary requirements, labeling it as an administrative infraction, while is the Spanish Criminal Code, in its article 160/2, that punishes as a criminal offense the creation of embryos devoid of reproductive aims. Therefore, neither Spain nor Portugal allow the creation of embryos exclusively to be used in scientific purposes (Devolder, 2005; Harris, 1998; Pattinson, 2002), as permitted in the United Kingdom by the HFEA. Among us embryonic experimentation and the recollection of stem cells can only take place on embryos previously generated with reproductive aims but which afterwards became superfluous. The prohibition of this conduct is grounded in several legal interests, some of them more legitimate and consensual than others: the respect for the fundamental rights of the embryo in itself, human dignity, intangibility of the genetic patrimony and the genetic identity of the human species (Romeo Casabona, 2001; Gracia Martín & Escuchuri Aisa, 2005).

7. Gamete donation

In Portuguese law gamete donation is performed by means of a secret, irrevocable and gratuitous contract (articles 15 and 18 law n. 32/2006). The last qualifier does not ban every single payment, since some amounts are allowed in order to compensate the donor for the inconveniences of the donation (Raposo, 2009b). Such a possibility is not expressly foreseen in law n. 32/2006, but instead in the law that establishes the legal regime concerning the quality and safety of donation, collecting, testing, processing, preservation, storage, distribution and application of tissues and cells of human origin (article 22/3 of law n. 12/2009, from 26th March). Furthermore, the compensation is mentioned in the forms of informed consent prepared by CNPMA and available in its website.

The law is silent about the procedure of embryo donation, but everything indicated that it is processed in the same manner. The only remaining doubt involves the existence of the referred compensation, which does not make much sense in this particular point.

The configuration of the contract of gamete donation is quite similar in Spanish law. The contract is also gratuitous, but a compensation is admitted, and in fact foreseen in the law in itself (article 3 law n. 14/2006). Nonetheless, here with a specificity worthy of discussion, related with the revocability of the contract (Gomez Sanchez, 1994; Pantaleón Prieto, 1993). In fact, under Spanish legal order the contract of gamete donation may be revoked in the event the donor needs the gametes for himself/herself – supposedly only because he/she became infertile meanwhile – on the condition he/she reimburses the gamete bank for the costs incurred (article 5/2 law n. 14/2006).

In both legislations the note of gratuity – with the mentioned exceptions in order to compensate some inconvenience of the donor – is imperative, in accordance with the traditional rule that the human body, its parts and fluids, cannot be used for lucrative purposes. This ban is also stated in article 21 of the European Convention on Human Rights and Biomedicine (prohibition of financial gain from the human body).

The Kantian understating of human dignity is one of the main grounds of this rule, but nowadays, with the increasing coincidence between dignity and autonomy, impor-

tant breaches are being open in this rule, also in the field of gamete donation, which actually is more of a selling than a donation in some countries (Raposo, 2009b, 2011). In none of the laws is permitted to the beneficiaries of the techniques to select the characteristics of the donors. It rests with the medical team to operate that selection, which is exclusively oriented by legal and medical criteria. Consequently, the choice of the donor will have in consideration its state of health, since gametes are carriers of sicknesses and abnormalities. Gametes that are not in good conditions cannot, evidently, be chosen, or the reproductive centre risks a case of medical liability. Furthermore, is also considered the phenotypic similarity between the donor and the future parents, given that the ultimate aim of ART is to give rise to a family where the child looks like its parents, as if they all were genetically connected. This last caution is explicitly mentioned in article 6/4 of law n. 14/2006, but not in the Portuguese law, where is absent a norm forbidding the selection of the donor genetic features or even imposing the need to indicate their features. But since law n. 32/2006 forbids the selection of the embryo's characteristics (article 7/2 law n. 32/2006), and even makes incur the doctor in medical liability when this prohibition is ignored, everything points to the conclusion that the same prohibition applies to the selection of gametes.

8. Donor anonymity

According to Portuguese law gamete donation is anonymous, with the exception some particular circumstances circumvented by law (article 15 law n. 32/2006). One of those exceptions allows the access to genetic information unable to identify the donor. On the other hand, it is also legally permitted to be informed about impediments to marriage in order to avoid consanguineous unions, but also maintaining the anonymity. Finally, as the only possibility of breaking anonymity, the law admits that the person born by means of gamete donation gets to know the donor when serious reasons – thereby confirmed by a judicial decision – are at stake. It is not completely clear the exact meaning of this safeguard, but it is reasonable to understand that the “serious reasons” mentioned in the norm are related to the health condition of the child. Let's suppose, for instance, that the child born through gamete donation requires an organ transplant or a bone marrow transplant, and only close relatives are suitable candidates to save its life. In our opinion it is undoubtful that in the described situation anonymity must cede. But the mentioned “serious reasons” are not imperiously restricted to physical health, since another legitimate possibility is to allow the breach of anonymity in case of mental health condition, as for instance a severe depression caused by the uncertainty on the personal identity and the loss of social belonging.

Under no circumstance is foreseen the opposite situation, there is, the possibility for the donor to know its genetic child. The problem with this provision is that the Portuguese Constitution (CRP) includes, in its list of fundamental rights, the right to personal identity (article 26/1 CRP) and to genetic identity (article 26/3 CRP), both of them acting as a constitutional base for a right to each one know his personal history, in other words, a right to know the genetic origin. As a result, the solution of donor anonymity is unconstitutional, even when joined by the referred exceptions (Reis, 2008; Loureiro 1999 and 2010b). Nevertheless, in its decision from 2007, the Constitutional Court adopted a different position, and considered acceptable the solution of article 15, arguing that it establishes a healthy balance between conflicting

rights: the right to private life of the beneficiaries of the techniques and of the donor, and the right to personal and genetic identity of the child.

Similarly, only in exceptional circumstances the Spanish law admits the break of donor anonymity. Those circumstances must necessarily be related with a danger for the life and health of the child (article 5/5 law n. 14/2006). But even when this occurs is not possible to legally establish fatherhood (article 8/3 law n. 14/2006). Just as in Portugal, also in Spain this solution has been much contested, based on article 10/1 of the Spanish Constitution, a norm about personal rights (Carcaba Fernández, 1995).

Despite the legal solution of Iberian countries, around the world we assist to a movement of progressive withdrawal of the anonymity rule in favor of the right to know the donor identity (Bernstein, 2010).

9. Surrogate motherhood

Surrogacy intends to express the contract whereby a woman commits herself to carry out a pregnancy, in the end of which the child is delivered to other contracting part, usually a couple, but theoretically we may also be talking of a single person. Surrogacy was classically applied by women without capacity to get pregnant, but nowadays is also frequently used by gay male couples. The child may be generated with gametes from any of the contracting parts or from donors, but evidently the desirable situation will be to use gametes of at least one of the members of the contracting couple. Concerning female gametes is highly recommended to apply to a donor in order to obtain the oocytes in case the contracting woman is unable to do so, instead of using the oocytes of the surrogate (Raposo, 2003 and 2005).

Portuguese law determinates that the contract of surrogacy is null and void of any legal effect. In other words, it is like it never existed (article 8/1 law n. 32/2006). Therefore, legal motherhood is established according to article 1796/1 of the Civil Code, which stipulates that the legal mother is the woman that gives birth. Thus, the surrogate is always considered the mother, even in cases of purely gestational surrogacy, i.e., when the oocyte belongs to another woman, which may be the contracting part. In Portuguese legal order this fact is irrelevant to the determination of motherhood (article 8/3 law n. 32/2006).

Since filiation is established as prescribed by the general rules of civil law, it also operates the legal presumption that the father is the man married with the woman that gave birth, there is, the husband of the surrogate (articles 1796/2 and 1826/1 of the Civil Code), though this presumption may be overturned by a genetic test presented by the biological father.

Furthermore, surrogacy is a criminal practice when it takes place through a payment. The parties to the contract risk a fine, or even a jail sentence, and the same applies to the one that promoted the celebration of the contract, usually a lawyer (article 39 law n. 32/2006).

The request to the Constitutional Court to declare law n. 32/2006 unconstitutional was based – among many other arguments, as referred – on the solely criminalization of paid surrogacy, leaving outside gratuitous surrogacy, but the Court found that it was not necessary to use criminal law in both cases. However, the constitutional problem does not lie in the option for a limited criminalization, but in the criminalization in itself (Antunes, 2010; Reis, 2010). Indeed, criminal law is illegitimated applied when the aim is to secure a certain moral belief, as it happens in the case of surrogacy, since no legal interest may be envisaged in this criminalization.

The Spanish legal solution (article 10 law n. 14/2006) is similar to the Portuguese one, with the difference – but a very relevant and decisive difference – that Spanish law considers surrogacy merely as an administrative infraction (article 24 n. 14/2006), but not as a crime, which clearly represents a wiser legal solution (even because law n. 14/2006 only contains administrative sanctions, and any criminal penalty related with these questions is contained in the Penal Code).

10. Post-mortem reproduction

Under Portuguese law artificial insemination and in vitro fertilization are forbidden when executed after the death of the man, i.e., post-mortem (Raposo & Dantas, 2010). Conversely, post-mortem embryo transfer is allowed (article 22 law n. 32/2006). The difference in legal regimes may be justified by two different motivations.

In one hand, because the law presumes that in post-mortem embryo transfer the man has previously given his consent to become a father, for the reason that the reproductive process had its beginning when he was still alive.

However, if the acceptance of this practice is founded in the supposed existence of the consent, we have to face a possible obstacle to this argumentation, because we cannot be sure if he merely consented to be a father or, more than that, if he consented to be a posthumous father. In effect, the man may have decided to have a child, but only assuming he would be alive to raise it, and, in the opposite, he would not have consented to bring to the world a child without the presence of a father.

But this argument can easily be contradicted by arguing that in natural reproduction no man is sure that he will be present to see his child born and grow and, obviously, pregnancies are not aborted because of the death of the father.

The other argument related with the analogy between a pregnancy and the uterine transference of already existing embryos has indeed some strong basis, since in both case we have a new human being, while in artificial insemination and in vitro fertilization we are going to create the new human being at that moment. Of course some differences can be pointed out between the existence of a uterine embryo and the existence of a in vitro embryo, namely the fact that in abortion we have a previously nidated embryo, maybe even a fetus, in a more developed state, whereas in the uterine transference of embryos the creature is in a very early stage, and effectively before nidation legal protection is much weaker. Even so, the legislator considered that the existence of an actual human life was not to be unvalued, on the contrary, deserved enough legal protection in order to allow its uterine transference, a solution enforced by the presumption of an existing consent to reproduce on behalf of the man.

The legal solution in Spain is quite different, since every modality of post-mortem reproduction is permitted (article 9 law n. 14/2006), as long as the treatment already started when the male element is deceased or, in alternative, if the man has given his consent in a written form (a document similar to an advance directive to medical treatment). In this last hypothesis the reproductive process must be performed in the twelve months after his death, in order to not disturb the succession on his property. A curious note is that article 9/2 states that the beginning of the reproductive process allows the presumption that the man gave his consent, but since the norm does not clarify if it is a *juris tantum* presumption or a *iure et de iure* presumption – there is, if the presump-

tion can or cannot be overruled - we have to consider that it belongs to the first type and, consequently, admit the destruction of the presumption by relevant facts.

11. Preimplantation genetic diagnosis

Preimplantation genetic diagnosis is a genetic study of the embryo, aimed to detect the presence of genetic or chromosomal abnormalities (Coskun & Qubbaj, 2010). The objective is to perceive relevant genetic diseases before the implantation of the embryo in the mother's uterus and, therefore, transfer only healthy embryos or, at least, embryos that do not carry genes of known genetic diseases running in the family. With this kind of pre-natal exam is possible to choose the embryo or embryos with more chances to survive and, consequently, be born. Thereby, it is feasible to achieve a diminution in the risk of failed pregnancies, still-births, and children with severe abnormalities (Raposo, 2010e).

The Portuguese law and the Spanish law are quite similar regarding their regulations. Preimplantation genetic diagnosis is admitted by both of them in specific circumstances (article 7 of law n. 32/2006 and article 12 law n. 14/2006).

Primarily, to detect which embryos are not in conditions to be transferred to the woman's uterus whenever the legal ground to apply to ART (more precisely, to in vitro fertilization in its multiple modalities) was the concern about the embryo's health, because of a genetic or hereditary disease of the parents.

Besides, it can also be used to select the sex of the embryo, but only when the objective is to prevent the transmission of a genetic or hereditary disease connected with a certain sex (like haemophilia, for instance).

Finally, preimplantation genetic diagnosis may also be a solution to obtain the so called saviour sibling, i.e., a child that is healthy and, in addition, can operate as a compatible donor of genetic material (bone marrow, for instance) to a pre-existing sick sibling (Raposo, 2007a).

The general ban of the choice of the sex of the future child has been a much contested legal solution. In Portugal we still do not have any judicial case on this topic, but in Spain, some years ago, when the law from 1988 was still in force, courts were confronted with a request of this kind that become a case study. The final decision of this case, known as the Mataró case (Carcaba Fernández, 1995; Vidal Martínez, 1991), denied the request of a mother of four boys that claimed for a baby girl, grounded on a risk for its emotional health, since the anguish for a daughter was taking her into a severe depression. Since Spanish law admitted at the time (as it does today) sex selection for therapeutic purposes, the woman invoked a therapeutic aim for her own. However, the Court concluded that the therapeutic purpose mentioned in the law was referred to the born child, not to the parents, and finally stated that, ultimately, the mother is for the child not the child for the mother.

12. A final overview

When compared with the European counterparts, Portuguese and Spanish laws may be classified as liberal regulations, thought the Spanish is more broadminded in its solutions, namely regarding the opening of reproductive techniques to single women and the larger admissibility of post-mortem reproduction.

A note that highlights in both regulations is the trust in the wise judgment of physicians, who are in charge to make medical decisions having in consideration the particularities of each concrete case, instead of being the legislator himself to define, necessarily in abstract

terms, the best solution to situations where a medical judgment is in order. Is a position to be applauded, since the law cannot have the pretension of dictating every single step of science and medicine. This self-limitation is quite evident in the Portuguese law, especially concerning the resolution of questions related with the number of embryos to be created and to be transferred.

Despite of some fragilities, and a few concessions to a narrow understanding of personal autonomy (well exemplified in the prohibition of surrogacy), both these laws have proven to be admirable, having in mind that they born in countries where traditionally religion dominated many of the legal solutions. Even more remarkable is the fact that they remained in force, in spite of severe criticism, and nowadays the intended reforms do not claim for more restriction but for more openness.

REFERÊNCIAS

- Abellán-García Sánchez, F. *Reproducción Humana Asistida y Responsabilidad Médica*. Granada: Editorial Comares; 2001.
- Abellán-García Sánchez, F. *El Estatuto Jurídico del Embrión en España: de la Ley de Reproducción de 1988 a la Clonación Terapéutica de Nuestros Días*. *Revista de Derecho y Genoma Humano*, 2008; 28:59-83.
- Antunes MJ. *Procriação Medicamente Assistida: Questões Novas ou Questões Renovadas para o Direito Penal*. In: *Livro de Homenagem a Jorge de Figueiredo Dias*. Coimbra: Coimbra Editora; 2010.
- Benítez-Ortúzar IF. *Delitos Relativos a la Reproducción Asistida*. In: Vidal-Martínez J, Benítez-Ortúzar J, Vega-Gutiérrez A eds. *Derechos Reproductivos y Técnicas de Reproducción Asistida*. Editorial. Granada: Comares; 1998.
- Bernstein G. *Regulating Reproductive Technologies: Timing, Uncertainty, and Donor Anonymity*. *Boston University Law Review*, 2010;90:1189-2010.
- Berrocal Lanzarot HAY. *De Nuevo Sobre la Reproducción Humana Asistida en España. Análisis Jurídico-Sanitario de la Ley 14/2006, de 26 de Mayo (1.ª Parte)*. *Revista de la Escuela de Medicina Legal*. 2008: 22-42
- Berrocal Lanzarot HAY. *De Nuevo Sobre la Reproducción Humana Asistida en España. Análisis Jurídico-Sanitario de la Ley 14/2006, de 26 de Mayo (2.ª Parte)*. *Revista de la Escuela de Medicina Legal*. 2009: 20-28
- Byk C. *France: Law Reform and Human Reproduction*. In Mclean S ed. *Law Reform and Human Reproduction*. Brookfield USA, Hong Kong, Singapore, Sydney; Dartmouth, Aldershot: 1992.
- Blyth, E. *The United Kingdom – Evolution of a Statutory Regulatory Approach*. In Blyth E, Landau R, eds. *Third Party Assisted Conception Across Cultures- Social, Legal and Ethical Perspectives*. London and New York: Jessica Kingley Publishers; 2004.
- Carcaba-Fernández M. *Los Problemas Jurídicos Planteados por las Nuevas Técnicas de Procreación Humana*. Barcelona: J. M. Bosch Editor; 1995.
- Cassonato C. *Legge 40 e Principio di non Contraddizione: Una Valutazione D'Impatto Normativo*. In: Camassa E, Cassonato C. *La Procreazione Medicalmente Assistita: Ombre e Luci*. Trento: Università degli Studi di Trento; 2005.
- Coskun S, Qubbaj W. *Preimplantation Genetic Diagnosis and Selection*. *Journal of Reproductive and Stem Cell Biotechnology*, 2010;1(1): 120-40.
- Devolder K. *Human Embryonic Stem Cell Research: Why the Discarded-Created-Distinction cannot be based on the Potentiality Argument*. *Bioethics*, 2005;19(2): 167-86.
- Ford N. *The Prenatal Person – Ethics from Conception to Birth*. Oxford: Blackwell Publishing; 2002.
- Garwood-Gowers A. *Contemporary Issues in the Regulation of Artificial Reproduction and Embryology in the UK*. *Revista de Derecho y Genoma Humano*, 2004;21: 67-101.
- Gomez-Sanchez Y. *El Derecho a la Reproducción Humana*. Madrid: Marcial Pons; 1994.
- Gracia Martín L, Escuchuri Aisa E. *Los Delitos de Lesiones al Feto y los Relativos a la Manipulación Genética*. Valencia: Tirant lo Blanch; 2005

- Harris J. Clones, Genes and Immortality. Oxford, New York: Oxford University Press; 1998.
- Herrera Campos R. La Inseminación Artificial: Aspectos Doctrinales y Regulación Legal Española. Granada: Universidad de Granada; 1991.
- Hetz S. Schutzwürdigkeit menschlicher Klone? : Eine interdisziplinäre Studie aus medizinrechtlicher Sicht. Baden-Baden: Nomos; 2005.
- Lema Añón C. Los Problemas Pendientes de la Regulación Jurídica Española sobre Reproducción Humana Asistida: La Sentencia del Tribunal Constitucional y el I Informe de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida (Parte II). Revista de Derecho y Genoma Humano. 2000; 13; 47-67.
- Loureiro JC. O Direito à Identidade Genética do Ser Humano. In AA.VV. Portugal-Brasil Ano 2000. Coimbra: Coimbra Editora; 1999.
- Loureiro JC. Tomemos a Sério os Direitos do Embrião e do Feto. Cadernos de Bio-Ética, 1997;14: 3-63.
- Loureiro JC. Há Mais Vida Para Além da Letra. A Questão das Chamadas Homoparentalidades e a Re(Leitura) da Lei da Procriação Medicamente Assistida. Revista Portuguesa de Bioética, 2010a; 11: 273-93.
- Loureiro JC. O Nosso Pai é o Dador N.º XXX: A Questão do Anonimato dos Dadores de Gâmetas na Procriação Medicamente Assistida Heteróloga. Lex Medicinæ, 2010b; 7(13): 5-42.
- Manetti M. Profili di Illegittimità Costituzionale della Legge sulla Procreazione Medicalmente Assistita. Politica del Diritto, 2004; 3: 453-66.
- Mazzoni, CM. Real Protection for the Embryo. Revista de Derecho y Genoma Humano, 2005; 22:115-32.
- Munzer S. Kant and Property Rights in Body Parts. Canadian Journal of Law and Jurisprudence, 1993; 6(2): 319-41.
- Novak R. Fortpflanzungsmedizinengesetz und Grundrechte. In Bernat ed. Die Reproduktionsmedizin am Prüfstand von Recht und Ethik. Wien: Manzsche Verlags- und Universitätsbuchhandlung; 2000.
- Pantaleón Prieto F. Técnicas de Reproducción Asistida y Constitución. Revista del Centro de Estudios Constitucionales, 1993; 15: 129-60.
- Pattinson S. Influencing Traits before Birth. Hampshire: Ashgate; 2002.
- Raposo VL. Maternidad de Substitución. Revista Latinamericana de Derecho Médico y Medicina Legal, 2003; 8(1): 9-16.
- Raposo VL. De Mãe para Mãe: Questões Éticas e Legais Suscitadas pela Maternidade de Substituição. Coimbra: Coimbra Editora; 2005.
- Raposo VL. Direitos Reprodutivos. Lex Medicinæ, 2005; 2(3): 111-31.
- Raposo VL. Comentário à Recente Lei Espanhola de Reprodução Assistida. Lex Medicinæ, 2006; 3(6):153-65.
- Raposo VL. Pode Trazer-me o Menu, Por Favor? Quero Escolher o Meu Embrião – Os Múltiplos Casos de Seleção de Embriões em Sede de Diagnóstico Genético Pré-Implantatório. Lex Medicinæ, 2007a; 4(8):59-84.
- Raposo VL. Em Nome do Pai (Da mãe, dos dois pais, e das duas mães) – Análise do art. 6º da Lei 32/2006. Lex Medicinæ, 2007b; 4(7):37-51.
- Raposo VL. O Dilema do Rei Salomão: Conflito de Vontades Quanto ao Destino dos Embriões Excedentários. Lex Medicinæ, 2008; 5(9):55-79.
- Raposo VL. O Direito à Vida na Jurisprudência de Estrasburgo. Jurisprudência Constitucional, 2009a:14;59-87.
- Raposo VL. Vende-se Gâmetas em Bom Estado de Conservação – O Obscuro Mercado das Células Reprodutivas. Lex Medicinæ, 2009b:6(12): 47-74.
- Raposo VL. Crónica de um Casamento Anunciado. Revista do Ministério Público, 2010a;30(120): 157-90.
- Raposo VL. Direitos Reprodutivos: Homossexualidade, Celibato e Parentalidade. In Oliveira G, Machado J, Martins R. Consciência, Secularismo e Religião. Coimbra: Wolters Kluwer Portugal, Coimbra Editora; 2010b.
- Raposo VL. In the Borderline of Human Reproduction. In Duguet AM. Droit de la Santé Publique dans un Contexte Transnational. Bordeaux : Les Études Hospitalières Éditions; 2010.
- Raposo VL. Reprodução Assistida e HIV: A Visita da Cegonha. In AA.VV. A Infecção VIH e o Direito. Santarém: SIDAnet; 2010d.
- Raposo VL. As Wrong Actions no Início da Vida (Wrongful Conception, Wrongful Birth E Wrongful Life) e a Responsabilidade Médica. Revista Portuguesa do Dano Corporal, 2010e; 21: 61-100.
- Raposo VL. O Corpo Humano, a "Nova Galinha dos Ovos de Ouro, Lex Medicinæ, 2011; 8(15): 47-64.
- Raposo VL. Dantas E. Aspectos Jurídicos da Reprodução Post-Mortem, em Perspectiva Comparada Brasil-Portugal. Lex Medicinæ, 2010: 7(14); 81-94.
- Raposo VL, Osuna E. Embryo Dignity: The Status and Juridical Protection of the In Vitro Embryo. Medicine and Law. 2007; 26 (4); 737-46.
- Raposo VL, Pereira AD. Primeiras Notas sobre a Lei Portuguesa de Procriação Medicamente Assistida (Lei n.º 32/2006, de 26 de Julho). Lex Medicinæ. 2006: 3(6); 89-104.
- Raposo VL, Prata C, Oliveira, IO. Human Rights in Today's Ethics: Human Rights of the Unborn (Embryos And Foetus)?, Cuadernos Constitucionales de la Cátedra Fadrique Furio Ceriol. 2010: 62/63; 95-114.
- Raposo VL, Reis RV. Assisted Reproductive Technologies in Portuguese Law-Commentary to the Judgment No. 101/2009, of March the 3rd of the Portuguese Constitutional Court. Law and the Human Genome Review. 2009: 31; 125-58.
- Reis RV. O Direito ao Conhecimento das Origens Genéticas. Coimbra: Coimbra Editora; 2008.
- Reis RV. Responsabilidade Penal na Procriação Medicamente Assistida – A Criminalização do Recurso à Maternidade de Substituição e Outras Soluções Criminalmente Duvidosas. Lex Medicinæ. 2010: 7(13); 69-93.
- Romeo Casabona CM. El Derecho y la Bioética ante los Límites de la Vida Humana. Madrid: Centro de Estudios Ramón Areces; 1994.
- Romeo Casabona CM. La Situation Juridique Espagnole. In Bourg C. Des Enfants comme les Autres. Paris: Editions Luc Pire; 1996.
- Romeo Casabona CM. Los Llamados Delitos Relativos a la Manipulación Genética. Cuadernos y Estudios de Derecho Judicial: Genética y Derecho. 2001:36; 329-400.
- Romeo Casabona, C. El Derecho a la Vida: Aspectos Constitucionales de las Nuevas Tecnologías. In AA.VV. El Derecho a la Vida, Actas de la VIII Jornada de la Asociación de Letrados del Tribunal Constitucional. Madrid; Centro de Estudios Políticos y Constitucionales: 2003. P. 49/94
- Serrão, D. Livro Branco – Uso de Embriões Humanos em Investigação Científica. Lisboa: MCES: 2003.
- Sozou P, Sheldon S, Hartshorne G. Consent Agreements for Cryopreserved Embryos: The Case for Choice. Journal of Medical Ethics. 2010: 36; 230-33.
- Stormann M. Genetics and Artificial Procreation in Austria. In Meulders-Klein MT, Deech R, Vlaardingerbroek P. Biomedicine, the Family and Human Rights. The Hague, London, New York Kluwer Law International; 2002.
- Tripodina C. Studio sui Possibili Profili di Incostituzionalità della Legge n.º 40 del 2004 Recante Norme in Materia di Procreazione Medicalmente Assistita. Diritto Pubblico. 2004; 2: 501-48.
- Vidal Martínez J. Elección de Sexo: Comentarios a una Reciente Decisión Judicial Aplicando La Ley Española sobre Técnicas de Reproducción Asistida. Revista General de Derecho.1991; 2535-45.
- Warnock M. Guía Ética para Personas Inteligentes. Madrid: Turner, Fondo de Cultura Económica; 1998.

Revisando os efeitos da concentração de oxigênio sobre o desenvolvimento embrionário

Reviewing the effects of oxygen tension on embryo development

David Barreira Gomes Sobrinho^{1,4,5}, João Batista Alcântara Oliveira^{1,2,3}, Bruno Ramalho de Carvalho⁴, José Gonçalves Franco Júnior^{1,2,3}

¹ Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, Brasil.

² Centro de Reprodução Humana Prof. Franco Jr., Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

³ Centro Paulista de Diagnóstico, Pesquisa e Treinamento, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

⁴ Genesis – Centro de Assistência em Reprodução Humana, Brasília, Distrito Federal, Brasil.

⁵ Endereço para Correspondência: David Barreira Gomes Sobrinho, MD. Genesis - Centro de Assistência em Reprodução Humana. SHLS 716, Bloco "L", Salas "L" 328/331, Centro Clínico Sul - Ala Leste. Brasília, Distrito Federal, CEP: 70.390-907. Telefax: + 55 61 3345-8030. E-mail: david@genesis.med.br.

Os autores do presente estudo declaram que não têm nenhum conflito de interesse sobre o conteúdo discutido no texto, incluindo relações de trabalho, assessoria, honorários e direitos dos autores.

RESUMO

Apesar do conhecimento de que os processos de desenvolvimento e implantação embrionários de mamíferos não ocorrem em concentração atmosférica *in vivo*, é prática comum em laboratórios de fertilização *in vitro* (FIV) a cultura de embriões em concentração próxima a 20% de oxigênio. A discrepância entre as concentrações de oxigênio leva a importantes discussões sobre seus efeitos no desenvolvimento embrionário *in vitro*. Acredita-se que o cultivo de embriões em ambientes com concentração atmosférica de oxigênio pode ser prejudicial à qualidade dos mesmos por predispor-los à interferência negativa de radicais livres de oxigênio (RLO), resultantes do estresse oxidativo, levando a ação deletéria sobre o metabolismo embrionário e a expressão gênica de blastocitos cultivados naquelas condições. Frente aos argumentos favoráveis e contrários a cultura de embriões *in vitro* em concentrações de oxigênio semelhantes às encontradas *in vivo*, este artigo de revisão pretende condensar e debater os dados da literatura acerca da influência da concentração de oxigênio sobre a qualidade de embriões cultivados *in vitro*.

Palavras-chave: baixa concentração de oxigênio, cultura embrionária, FIV/ICSI, gas atmosférico, radicais livres de oxigênio.

ABSTRACT

Despite the fact that the processes of embryo development and implantation of mammals do not occur in atmospheric tension *in vivo*, it is common practice in laboratories for *in vitro* fertilization (IVF) the culture of embryos in an oxygen tension of 20%. The discrepancy between the tensions of oxygen leads to important discussions about their effects *in vitro* embryo development. It is believed that the culture of embryo in atmospheric oxygen tension can be detrimental to the quality of the data for predisposing them to the negative interference of reactive oxygen species (ROS), resulting in oxidative stress, leading to deleterious effects on metabolism embryo gene expression and blastocysts grown in those conditions. Faced with

arguments for and against the culture of embryos *in vitro* oxygen tensions similar to those found *in vivo*, this review article aims to condense and discuss the literature concerning the influence of oxygen tension on the quality of *in vitro* culture.

Keywords: low tension oxygen, embryo culture, gas atmosphere, IVF/ICSI, reactive oxygen species.

INTRODUÇÃO

A cultura de embriões em concentração atmosférica de oxigênio, próxima de 20%, é prática comum em laboratórios de fertilização *in vitro* (FIV) (Bahçeci *et al*, 2005), embora a concentração de oxigênio na cavidade uterina e ovidutos de mamíferos seja inferior a 9% nos diferentes momentos do ciclo reprodutivo, principalmente na fase de desenvolvimento embrionário tardio e implantação (Fischer & Bavister, 1993). Essa significativa diferença entre as concentrações de oxigênio leva a importantes discussões sobre seus efeitos no desenvolvimento embrionário *in vitro*. Apesar de não se conhecer ao certo o significado da reduzida concentração intrauterina de oxigênio, acredita-se que seja parte de um mecanismo de bloqueio da sua toxicidade sobre o blastocisto na fase de peri-implantação (Fischer & Bavister, 1993; Bavister, 2004). O cultivo de embriões em ambientes com concentração atmosférica de oxigênio pode ser prejudicial à qualidade dos mesmos por predispor-los à interferência negativa de radicais livres de oxigênio (RLO), resultantes do estresse oxidativo, o que não ocorreria *in vivo* (Fischer & Bavister, 1993; Guérin *et al*, 2001; García *et al*, 2010). Há dados na literatura sugerindo ação deletéria sobre o metabolismo embrionário (Karagenc *et al*, 2004) e a expressão gênica de blastocitos cultivados naquelas condições (Harvey *et al*, 2004). Frente aos argumentos favoráveis e contrários a cultura de embriões *in vitro* em concentrações de oxigênio semelhantes às encontradas *in vivo*, este artigo de revisão pretende condensar e debater os dados da literatura acerca da influência da concentração de oxigênio sobre a qualidade de embriões cultivados *in vitro*.

ESTRESSE OXIDATIVO

Os efeitos nocivos sobre embriões cultivados em concentrações atmosféricas de oxigênio têm sido atribuídos à geração de RLO, que são capazes de se difundir, passar pelas membranas celulares e alterar a conformação de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Guérin *et al*, 2001). A formação de RLO pode ser proveniente do metabolismo do embrião e dos fluídos foliculares e tubários (Guérin *et al*, 2001). O metabolismo embrionário gera RLO por meio de vários mecanismos metabólicos e enzimáticos, envolvendo principalmente a fosforilação oxidativa e a ação das enzimas nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (NADPH) oxidase e xantina-oxidase, sendo a contribuição relativa de cada variável de acordo com a espécie animal, o estágio de desenvolvimento embrionário e as condições de cultivo (Guérin *et al*, 2001). Ainda, diversos fatores externos podem aumentar a produção de RLO para o embrião, como concentração de oxigênio circundante, cátions metálicos (ferro e cobre), aminoxidase, e até mesmo espermatozoides durante a fertilização *in vitro*, principalmente os que permanecem fora do oócito (Guérin *et al*, 2001).

Os RLO induzem peroxidações lipídicas com repercussão na divisão celular, no transporte de metabólitos e disfunção mitocondrial, sendo relacionados ao bloqueio da clivagem embrionária inicial. No metabolismo das proteínas, podem induzir a formação de disulfeto por oxidação do radical sulfidrila, levando a inativação de enzimas como a gliceraldeído-3-fosfato-deidrogenase, com prejuízos à respiração celular. Ainda, os RLO podem induzir a fragmentação do DNA nuclear, com potencial supressão do desenvolvimento embrionário *in vitro* (Guérin *et al*, 2001). Além de danos diretos e indiretos ao DNA (Iwata *et al*, 2000), estão entre as consequências danos a organelas e membranas (Kwon *et al*, 1999), bloqueio do desenvolvimento embrionário (Guérin *et al*, 2001), depleção de adenosina-trifosfato (Guérin *et al*, 2001), estímulo à apoptose celular (Guérin *et al*, 2001) e alterações da expressão gênica (Harvey *et al*, 2004). O DNA mitocondrial é especialmente susceptível a mutações por causa da falta de histonas que, normalmente, bloqueiam a ação dos RLO. São os defeitos no DNA mitocondrial que irão induzir disfunções metabólicas celulares e, conseqüentemente, retardo ou parada do desenvolvimento embrionário, ou apoptose. O acúmulo de radicais superóxidos e a diminuição dos níveis de superóxido-dismutase estão envolvidos no processo de apoptose, que está relacionada à fragmentação do blastocisto (Guérin *et al*, 2001). Diversos mecanismos de defesa estão presentes no embrião e nos fluidos que o rodeiam, e têm funções complementares (Guérin *et al*, 2001). *In vivo*, a proteção externa, presente nos fluídos foliculares e tubários, é constituída, principalmente por antioxidantes não-enzimáticos, como hipotaurina, taurina e ácido ascórbico; e a interna, constituída, principalmente, por antioxidantes enzimáticos, como superóxido-dismutase, glutational-oxidase e γ -glutamylcisteína-sintetase. O dano oxidativo pode resultar da produção excessiva e/ou da diminuição da *clearance* de radicais livres pelos mecanismos de defesa. Assim, as três estratégias para evitar o estresse oxidativo são prevenção para evitar a formação de radicais livres, neutralização com antioxidantes e reparo através do DNA mitocondrial (Guérin *et al*, 2001).

ESTUDOS EM ANIMAIS

As evidências do efeito prejudicial da concentração atmosférica de oxigênio no desenvolvimento embrionário *in vitro* são baseadas, principalmente, em modelos animais, usando, na grande maioria bovinos e roedores (Harlow & Quinn, 1979; Pabon *et al*, 1989; McKier-

nan & Bavister, 1990; Batt *et al*, 1991; Umaoka *et al*, 1992; Kwon *et al*, 1999; Yuan *et al*, 2003; Karja *et al*, 2004; Leoni *et al*, 2007). Por nunca terem sido expostos a concentrações atmosféricas de oxigênio, os embriões e gametas de várias espécies de mamíferos cultivados nessas condições podem ser submetidos a estresse oxidativo mediado por radicais livres de oxigênio (RLO), que podem comprometer sua capacidade de desenvolvimento (Mastroiani & Jones, 1965; Bayatt-Smith *et al*, 1991; Fischer & Bavister, 1993; Bahçeci *et al*, 2005).

As concentrações de oxigênio na cavidade uterina e nos ovidutos de diversas espécies têm sido estudadas há mais de quatro décadas (Mastroianni & Jones, 1965; Garri & Mitchell, 1979; Hammer *et al*, 1981; Fischer & Bavister, 1993) e a maior parte dos estudos demonstra prejuízos do oxigênio em concentração atmosférica sobre embriões cultivados *in vitro* (Bavister, 1995). Tal afirmativa confirma-se pela demonstração de redução da massa celular interna (MCI) e evolução fetal de blastocistos provenientes de embriões de roedores cultivados em oxigênio a 20% quando comparados aos cultivados a 5%, embora não se tenha observado diferenças na evolução a blastocistos ou na morfologia destes (Karagenc *et al*, 2004). O estudo de Fischer & Bavister, 1993, foi o primeiro a posicionar microeletrodos polarográficos no lúmen de útero e tubas de primatas, roedores e coelhos para mensuração das concentrações de oxigênio em diferentes fases reprodutivas, demonstrando concentrações máximas de oxigênio de 40% em relação à concentração atmosférica. Neste estudo, a tensão de oxigênio em macacas *Rhesus* foi de aproximadamente 8% nas tubas e de aproximadamente 2% na cavidade uterina; em roedoras e coelhas, tais concentrações foram, respectivamente, de 5% e 3,5% no momento da implantação embrionária, reforçando a hipótese de que embriões jamais estariam submetidos a concentrações tão elevadas de oxigênio quanto à atmosférica (Fischer & Bavister, 1993).

Em estudos com fertilização *in vitro* (FIV), observa-se maior viabilidade embrionária, além de melhor e maior número de embriões que atingem estágio de blastocisto, entre os cultivados em concentração reduzida de oxigênio quando comparados a embriões cultivados a concentração atmosférica (Harlow & Quinn, 1979; Pabon *et al*, 1989; McKiernan & Bavister, 1990; Batt *et al*, 1991; Umaoka *et al*, 1992; Kwon *et al*, 1999; Yuan *et al*, 2003; Karja *et al*, 2004; Leoni *et al*, 2007). Entretanto, os dados sugerem que a morfologia embrionária, a quantidade de embriões que chegam a blastocistos após FIV ou mesmo os resultados iniciais de implantação, como taxa de gravidez clínica ou bioquímica e/ou implantação, após cultivo em concentrações diferentes de oxigênio, não são preditores precisos dos resultados clínicos finais (Meintjes *et al*, 2009).

Karagenc *et al* (2004) observaram redução do desenvolvimento da massa celular interna e uma queda drástica na proporção de blastocistos transferidos que se desenvolveram em fetos quando embriões foram cultivados em oxigênio atmosférico, apesar da aparência morfológicamente normal destes blastocistos. Essa observação ilustra mais uma vez a falta de confiabilidade da aparência morfológica para avaliar a viabilidade do embrião (Bavister, 2004). Assim, reforça-se a tese de que a verdadeira competência embrionária deve ser confirmada pela ocorrência de nascidos vivos (Karagenc *et al*, 2004; Waldenström *et al*, 2009).

ESTUDOS COM EMBRIÕES HUMANOS

Em vista de implicações éticas, a realização de estudos bem desenhados com embriões humanos torna-se difícil, não se podendo, desta forma, produzir dados com maior

relevância clínica. Apesar de as baixas concentrações de oxigênio concorrer para a viabilidade embrionária e melhor desenvolvimento ao estágio de blastocisto em estudos com FIV em animais, a interferência negativa das concentrações elevadas de oxigênio sobre embriões humanos é controversa. Enquanto alguns estudos demonstraram taxas de implantação e gravidez significativamente maiores em ambientes com oxigênio a baixas concentrações (Catt & Henman, 2000), outros não demonstraram melhorias significativas dos resultados terapêuticos (Dumoulin *et al*, 1995; Dumoulin *et al*, 1999).

O estudo de Dumoulin *et al*, 1999, apresentou evolução mais expressiva de embriões humanos a blastocistos, com maior celularidade, em cultivo em oxigênio a 5%, mas sem diferenças significativas entre as taxas de implantação e gravidez obtidas para os cultivados a 20% (Dumoulin *et al*, 1999). Entretanto, as transferências embrionárias aconteceram no segundo e terceiro dia após a FIV, o que limita conclusões, já que o ambiente intrauterino pode favorecer a implantação, por minimizar ou eliminar efeitos deletérios do estresse oxidativo. O estudo de Catt & Henman, 2000, por outro lado, demonstrou taxas de gravidez superiores para embriões cultivados a menores concentrações de oxigênio (Catt & Henman, 2000).

A discrepância entre os dados de estudos em animais e humanos pode ser parcialmente explicada pela diferença na fisiologia embrionária das espécies, considerando as características específicas de espécies altamente puras dos animais usados em laboratório e da variedade de condições de cultura e transferência embrionária no laboratório (Bavister, 2004).

Ainda, os estudos com embriões humanos que não identificaram benefício de resultados clínicos com baixa concentração de oxigênio foram realizados com transferência em D2 ou D3, não permitindo o benefício da baixa concentração de oxigênio no desenvolvimento do blastocisto e da massa celular interna *in vitro* após a ativação do genoma embrionário (Dumoulin *et al*, 1999; Catt & Henman, 2000; Bahçeci *et al*, 2005). Isso está em contraste com estudos realizados em animais, pois a rotina é a transferência em blastocisto (Umaoka *et al*, 1991, 1992; Karangenc *et al*, 2004).

Fisiologicamente, o útero fornece um ambiente nutricional diferente das tubas uterinas e, portanto, a transferência de embriões em estágio de clivagem causaria estresse homeostático e uma redução do potencial de implantação embrionário (García *et al*, 2010). Consequentemente, a transferência em estágio de blastocisto permitiria uma melhor sincronização com o ritmo das contrações uterinas e o embrião, bem como escolher de maneira mais "natural" embriões com maior potencial de desenvolvimento e implantação (García *et al*, 2010).

Quando as transferências de blastocistos foram avaliadas em um pequeno estudo com 22 pacientes, a taxa de gravidez clínica parece ter melhorado em baixa concentração de oxigênio, embora o número pequeno demais de pacientes não tenha permitido alcançar significância estatística (Kea *et al*, 2007). Seguiram-se estudos maiores que verificaram significativamente melhores resultados em baixas concentrações de oxigênio em transferência de blastocisto (Kovacic & Vlasisavljevic, 2008; Ciray *et al*, 2009; Meintjes *et al*, 2009; Waldenström *et al*, 2009; Kovacic *et al*, 2010). Algumas peculiaridades são relevantes nestes estudos, como maior quantidade de embriões que chegaram a blastocisto em ótima qualidade (Kovacic & Vlasisavljevic, 2008; Ciray *et al*, 2009; Meintjes *et al*, 2009; Waldenström *et al*, 2009), com massa celular interna normal (Kovacic & Vlasisavljevic, 2008), aumento das

taxas de implantação (Meintjes *et al*, 2009), gravidez clínica e nascidos vivos (Meintjes *et al*, 2009; Waldenström *et al*, 2009).

Em um modelo de estudo com oócitos irmãos, Kovacic & Vlasisavljevic observaram melhora em todas as fases do desenvolvimento embrionário – desde D2 até D5 – em baixas concentrações de O₂, identificada através do escore embrionário, do desenvolvimento da massa celular interna, da compactação em mórula e da proporção de embriões em estágio de blastocisto, não verificando diferença se FIV convencional ou com injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Com transferência embrionária realizada apenas em blastocisto, os resultados clínicos evidenciaram uma tendência de melhora em baixa concentração de O₂, porém sem diferença significativa. (Kovacic & Vlasisavljevic, 2008). De maneira semelhante, Ciray *et al* usaram modelo de oócitos irmãos, verificando melhor qualidade dos embriões tanto no 3º quanto no 5º dia de desenvolvimento (Ciray *et al*, 2009).

Meintjes *et al* cultivaram embriões em 5% de O₂ com predominância da transferência em blastocisto, resultando em taxas mais elevadas de implantação, de implantação por nascido vivo, de gravidez clínica e de nascidos vivos (Meintjes *et al*, 2009). Observaram ainda uma maior quantidade de embriões congelados em blastocisto, tanto das pacientes com transferência em D3 quanto em D5, porém sem significância estatística (Meintjes *et al*, 2009). Além disso, Nanassy *et al*, cultivou embriões humanos em condições atmosféricas de O₂ até o 3º dia, passando a cultivá-los em dois grupos – 5% ou 20% – até o 5º dia de desenvolvimento, não observando efeitos benéficos nos estágios avançados do desenvolvimento embrionário (Nanassy *et al*, 2010). Esses resultados sugerem que o efeito benéfico da hipóxia no desenvolvimento embrionário ocorreria ao longo de todas as fases de cultivo *in vitro*, desde oócito antes da fertilização até o estágio de blastocisto (García *et al*, 2010).

Contribuindo com esses dados, Waldenström *et al* (2009) compararam concentração atmosférica e baixa concentração de O₂ em estudo com transferência apenas de blastocistos, observando, com significância, maior desenvolvimento de blastocisto por oócito fertilizado e maior média de blastocistos criopreservados, bem como maior taxa de gravidez, gestação viável e nascidos vivos. Esse estudo acrescenta, ainda, que o cultivo de embriões em concentração fisiológica de O₂ parece ser a melhor alternativa para criopreservação de embriões.

Estudos mais recentes sugerem que a baixa concentração de O₂ pode ter uma aplicabilidade maior com significante melhora dos resultados clínicos em FIV/ICSI em grupos específicos, como mães respondedoras (Kovacic *et al*, 2010) ou mulheres com idade superior há 40 anos (García *et al*, 2010). Kovacic *et al* (2010) realizaram estudo com oócitos em ciclos de ICSI, dividido em três grupos de mulheres: (1) ótimas respondedoras; (2) más respondedoras; e (3) com idade superior há 40 anos (Kovacic *et al*, 2010). Observaram maior quantidade de embriões usados clinicamente, maior quantidade de blastocistos congelados por embriões clivados e maior taxa cumulativa de gravidez. Destacaram-se no grupo de mães respondedoras as taxas superiores de gravidez bioquímica, clínica e em curso, seja por ciclo ou transferência realizada em D3. Em outro estudo, García *et al* (2010) também dividiram as pacientes em três grupos: (1) < 35 anos; (2) entre 35 a 39 anos; e ≥ 40 anos; embora não tenham observado diferenças entre os grupos, destacaram as taxas de implantação, gravidez clínica e nascimento

por transferência, além do número de gestações em curso significativamente superiores em baixas concentrações de oxigênio, apesar da pequena amostra resultante após esta estratificação (García *et al*, 2010).

Pelo exposto, é plausível argumentar que o embrião humano não seja tão sensível à toxicidade do oxigênio nos estágios precoces de desenvolvimento (Bavister, 2004). Assumindo que a massa celular interna do blastocisto é bom marcador da qualidade embrionária e é reduzida preferencialmente em concentrações suprafisiológicas de oxigênio (Bavister, 2004; Karangenc *et al*, 2004) parece lógico fazer transferência embrionária precoce – em D2 ou D3 – para impedir os danos do oxigênio em FIV de embriões humanos, e somente realizar cultura de embriões em baixas concentrações de oxigênio se passar de três dias de cultivo ou quando se pensar em congelamento embrionário (Meintjes *et al*, 2009). Entretanto, essa estratégia parece perigosa, pois os efeitos deletérios do oxigênio podem já estar presentes no embrião precocemente, apesar de só se manifestar no estágio de blastocisto ou mais tardiamente, comprometendo os resultados clínicos (Pabon *et al*, 1989; Bavister, 2004; Meintjes *et al*, 2009).

Finalmente, deve-se enfatizar que as evidências experimentais demonstram que a capacidade de embriões para desenvolver a blastocistos não indica necessariamente uma ausência de toxicidade de oxigênio e suas anormalidades associadas em propriedades da célula, tais como alteração do metabolismo e expressão gênica (Bavister, 2004).

DISCUSSÃO

Os efeitos negativos do oxigênio podem ser potencialmente reduzidos pela adição de neutralizadores de radicais livres e antioxidantes para meios de cultivo (Umaoka *et al*, 1991; Umaoka *et al*, 1992), ou reduzindo a concentração de oxigênio (Dumoulin *et al*, 1999). Na época dos primeiros experimentos, não se comprovaram benefícios clínicos com baixas concentrações de oxigênio para cultivo de embriões humanos (Dumoulin *et al*, 1999) e, por isso, alguns autores optaram por adicionar antioxidantes aos meios de cultivo embrionário (Umaoka *et al*, 1991; Catt & Henman, 2000). Se os efeitos nocivos das concentrações suprafisiológicas de oxigênio em embriões humanos foram neutralizados de forma confiável e inócua pela adição de antioxidantes, esta pode ser uma alternativa menos dispendiosa e laboriosa (Meintjes *et al*, 2009). Entretanto, intuitivamente, parece mais racional evitar a formação de agentes prejudiciais em torno de embriões em desenvolvimento precocemente através de cultivo em concentrações reduzidas de oxigênio, em vez de tentar neutralizar esses agentes após sua formação (Meintjes *et al*, 2009). Além disso, alguns tipos de dano embrionário, como as interferências sobre a expressão gênica, não podem ser evitados pela simples adição de antioxidantes (Harvey *et al*, 2004; Meintjes *et al*, 2009).

Os modelos de incubadoras para cultivo de embriões usados comumente nos centros de reprodução assistida não são ideais para essa finalidade, pois proporcionam concentração atmosférica com 5% de CO₂ e aproximadamente 19% de O₂ (Bavister & Poole, 2005). Para alcançar baixas concentrações de oxigênio na incubadora é necessário um sensor de O₂ e CO₂, que por causa do grande volume da câmara vai requerer por sua vez uma prodigiosa quantidade de N₂ e tempo para expulsar O₂ (Bavister & Poole, 2005). Assim, o custo do gás N₂ torna-se substancial, porque cada vez que a porta da incubadora é aberta, o ambiente dentro da câmara tem que ser reabastecido com N₂ para reduzir a concentração de O₂ novamente (Bavister & Poole, 2005). Assim, o interesse em reduzir custos e tempo favorece a utilização do modelo padrão de

incubadora, apesar do conhecimento das concentrações fisiológicas de oxigênio no aparelho reprodutor feminino (Fischer & Bavister, 1993; Bavister & Poole, 2005). Este dilema entre fatores econômicos e condições ideais de cultura pode ser resolvido de maneira simples, segura e barata com incubadoras que utilizem fluxo contínuo de gás, como mini-incubadoras (Cooke *et al*, 2002; Bavister, 2004; Fujiwara *et al*, 2007) ou sacos selados com gás impermeável (Bavister, 2004; Bavister & Poole, 2005). A mini-incubadora (K-MINC-1000, COOK, Co., Australia) é uma câmara de bancada pequena, que possui aquecedores em cima e em baixa de cada prato para controle direto das condições de cultivo (Fujiwara *et al*, 2007).

Cabe ressaltar que o processo de congelamento e descongelamento embrionário deixa as células mais suscetíveis aos RLO que podem levar a modificações na estrutura espacial da membrana lipídica (Guérin *et al*, 2001). Os embriões também podem ter sensibilidade diferente aos RLO em diferentes estágios de desenvolvimento que são decorrentes das variações nos limiares do mecanismo de defesa (Guérin *et al*, 2001).

É importante observar que redução drástica na concentração de oxigênio *in vitro* também pode ter consequências negativas (Vajta *et al*, 2010). Estudos mostraram que concentração de oxigênio em 2%, embora aumente a taxa de blastocisto, pode causar malformações no desenvolvimento de ruminantes (Thompson & Peterson, 2000).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados disponíveis na literatura levam a crer em resultados reprodutivos mais favoráveis a partir do cultivo de embriões a concentrações baixas de oxigênio, o que se deve principalmente à diminuição dos efeitos negativos do estresse oxidativo sobre o metabolismo e o desenvolvimento embrionário.

Embora os vastos dados obtidos a partir de embriões de roedores, bovinos e primatas não possam ser seguramente extrapolados para embriões humanos, os poucos estudos em nossa espécie sugerem resultados semelhantes e é plausível imaginar melhores resultados clínicos de FIV/ICSI pelo cultivo em concentrações de oxigênio mais próximas do que seriam níveis fisiológicos.

Respeitando os limites éticos, espera-se que estudos bem desenhados no futuro somem dados aos até então disponíveis, que forneçam as evidências necessárias à mudança dos padrões de concentração atmosférica de oxigênio utilizado mais comumente em laboratório de reprodução assistida nos dias de hoje.

REFERÊNCIAS

- Bahçeci M, Ciray HN, Karagenc L, Ulug U, Bener F. Effect of oxygen concentration during the incubation of embryos of women undergoing ICSI and embryo transfer: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online*. 2005;11(4):438-43.
- Batt PA, Gardner DK, Cameron AW. Oxygen concentrations and protein source affect the development of preimplantation goat embryos *in vitro*. *Reprod Fertil Dev*. 1991;3:601-7.
- Bavister B. Oxygen concentration and preimplantation development. *Reprod Biomed Online*. 2004;9(5):484-6.
- Bavister BD, Poole KA. Duration and temperature of culture medium equilibration affect frequency of blastocyst development. *Reprod Biomed Online*. 2005;10(1):124-9.
- Bayatt-Smith JG, Leese HJ, Gosden RG. An investigation by mathematical modeling of whether mouse and human preimplantation embryos in static culture can satisfy their demands for oxygen by diffusion. *Hum Reprod*. 1991;6:52-7.
- Catt JW, Henman M. Toxic effects of oxygen on human embryo development. *Hum Reprod*. 2000;15(Suppl.2):199-206.
- Ciray HN, Aksoy T, Yaramanci K, Karayaka I, Bahçeci M. *In vitro* culture under physiologic oxygen concentration improves

- blastocyst yield and quality: a prospective randomized survey on sibling oocytes. *Fertil Steril*. 2009;91(Suppl 4):1459-61.
- Cooke S, Tyler JPP, Driscoll G. Objective assessments of temperature maintenance using in vitro culture techniques. *J Assist Reprod Genet*. 2002;19:368-75.
- Dumoulin JCM, Meijers CJJ, Bras M, Coonen E, Geraedts JPM, Evers JLH. Effect of oxygen concentration on human *in vitro* fertilization and embryo culture. *Hum Reprod*. 1999;14(2):465-9.
- Dumoulin JCM, Vanvuchelen RCM, Land JA *et al*. 1995 Effect of oxygen concentration on in vitro fertilization and embryo culture in the human and the mouse. *Fertility and Sterility* **63**, 115–119.
- Fischer B, Bavister BD. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil*. 1993;99:673-9.
- Fujiwara M, Takahashi K, Izuno M, Duan YR, Kazono M, Kimura F, Noda Y. Effect of micro-environment maintenance on embryo culture after in-vitro fertilization: comparison of top-load mini incubator and conventional front-load incubator. *J Assist Reprod Genet*. 2007;24:5-9.
- García JI, Sepúlveda S, Noriega-Hoces L. Beneficial effect of reduced concentration with transfer of blastocysts in IVF patients older than 40 years old. *Health*. 2010;2(9):1010-17.
- Garris DR, Mitchell JA. Intrauterine oxygen tension during the estrous cycle in the Guinea Pig: Its relation to uterine blood volume and plasma estrogen and progesterone levels. *Biol Reprod*. 1979;21:149-59.
- Goto Y, Noda Y, Mori T, Nakano M. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. *Free Radic Biol Med*. 1993;15:69-75.
- Guérin P, Mouatassim SEI, Ménéz Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryos and its surroundings. *Hum Reprod Update*. 2001;7(2):175-89.
- Hammer RE, Goldman H, Mitchell JA. Effects of nicotine on uterine blood flow and intrauterine oxygen tension in the rat. *J Reprod Fertil*. 1981;63:163-8.
- Harlow GM, Quinn P. Foetal and placental growth in the mouse after pre-implantation development in vitro under oxygen concentrations of 5% and 20%. *Austr J Biol Sci*. 1979;32:363-9.
- Harvey AJ, Kind KL, Pantaleon M, Armstrong DT, Thompson JG. Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. *Biol Reprod*. 2004;71:1108-19.
- Iwata H, Minami N, Imai H. Postnatal weight of calves derived from in vitro matured and in vitro fertilized embryos development under various oxygen concentrations. *Reprod Fertil Dev*. 2000;12:391-6.
- Karagenc L, Sertkaya Z, Ciray N, Ulug U, Bahçeci M. Impact of oxygen concentration on embryonic development of mouse zygotes. *Reprod Biomed Online*. 2004;9(4):409-17.
- Karja NW, Wongsrikeao P, Murakami M, Agung B, Fahrudin M, Nagai T, Otoi T. Effects of oxygen tension on the development and quality of porcine in vitro fertilized embryos. *Theriogenology*. 2004;62:1585-95.
- Kea B, Gebhardt J, Watt J, Westphal LM, Lathi RB, Milki AA, Behr B. Effect of reduced oxygen concentrations on the outcome of *in vitro* fertilization. *Fertil Steril*. 2007;87(1):213-6.
- Kovacic B, Sajko MC, Vlasisavljevic V. A prospective, randomized trial on the effect on atmospheric versus reduced oxygen concentration on the outcome on intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril*. 2010;94(2):511-9.
- Kovacic B, Vlasisavljevic V. Influence of atmospheric versus reduced oxygen concentration on development of human blastocysts *in vitro*: a prospective study on sibling oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2008;17(2):229-36.
- Kwon HC, Yang HW, Hwang KJ, Yoo JH, Kim MS, Lee CH, Ryu HS, Oh KS. Effects of low oxygen condition on the generation of reactive oxygen species and the development in mouse embryos cultured in vitro. *J Obstet Gynaecol Res*. 1999;25:359-66.
- Leoni GG, Rosati I, Succo S, Bogliolo L, Bebbere D, Berlinguer F, Ledda S, Naitana S. A low oxygen atmosphere during IVF accelerates the kinetic of formation on in vitro produced ovine blastocysts. *Reprod Domestic Anim*. 2007;42:299-304.
- Mastroianni Jr L; Jones R. Oxygen tension within the rabbit fallopian tube. *J Reprod Fertil*. 1965;9:99-102.
- McKiernan SH, Bavister BD. Environmental variables influencing in vitro development of hamster 2-cell embryos to the blastocyst stage. *Biol Reprod*. 1990;43: 404-13.
- Meintjes M, Chantilis SJ, Douglas JD, Rodriguez AJ, Guerami AR, Bookout DM, Barnett BD, Madden JD. A controlled randomized trial evaluating the effect of lowered incubator oxygen tension on live births in a predominantly blastocyst transfer program. *Hum Reprod*. 2009;24(2):300-7.
- Nanassy L, Peterson CA, Wilcox AL, Peterson CM, Hammoud A, Carrell DT. Comparison of 5% and ambient oxygen during days 3-5 of in vitro culture of human embryos. *Fertil Steril*. 2010;93(2):579-85.
- Pabon JE Jr, Findley WE, Gibbons WE. The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. *Fertil Steril*. 1989;51:896-900.
- Thompson JG, Peterson AJ. Bovine embryo culture in vitro: new developments and post-transfer consequences. *Hum Reprod*. 2000; 15(Suppl.5):56-67.
- Umaoka Y, Noda Y, Narimoto K, Mori T. Developmental potentiality of embryos cultured under low oxygen tension with superoxide dismutase. *J In Vitro Fert Embryo Transf*. 1991;8:245-9.
- Umaoka Y, Noda Y, Narimoto K, Mori T. Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. *Mol Reprod Dev*. 1992;31:28-33.
- Vajta G, Rienzi L, Cobo A, Yovich J. Embryo culture: can we perform better than nature? *Reprod Biomed Online*. 2010;20(4):453-69.
- Waldenström U, Engström AB, Hellberg D, Nilsson S. Low-oxygen compared with high-oxygen atmosphere in blastocyst culture, a prospective randomized study. *Fertil Steril*. 2009;91(6):2461-5.
- Yuan YQ, Van Soom A, Coopman FOJ, Mintiens K, Boerjan ML, Van Zeveren A, de Kruif A, Peelman LJ. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured in vitro. *Theriogenology*. 2003;59:1585-96.

Infertilidade masculina e obesidade – associação e bases fisiopatológicas

Male infertility and obesity – association and physiopathology

Ludmila Machado Neves, Michele Lopes Pedrosa, Maria do Carmo Borges de Souza

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Setor de Reprodução Humana, Instituto de Ginecologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

RESUMO

A obesidade tem sido apontada como fator associado à infertilidade masculina em estudos recentes. Essa associação já foi extensivamente demonstrada em mulheres, envolvendo mecanismos de ação sinérgicos, principalmente relacionados à redução da capacidade de ovulação. No entanto, em homens, os estudos são controversos quanto a redução da fertilidade e aos possíveis mecanismos de ação. Embora estudos epidemiológicos apontem para uma correlação entre obesidade masculina e infertilidade, a relevância dessa associação e os mecanismos de ação permanecem desconhecidos. De acordo com meta-análise recente, há forte evidência de que altos níveis de IMC cursam com redução nos níveis de testosterona, SHBG e testosterona livre, porém não se observou evidência significativa de associação entre alterações espermáticas e IMC elevado até o presente momento.

Palavras-chave: Infertilidade, obesidade masculina, alterações seminais, testosterona, SHBG, estradiol.

ABSTRACT

Obesity has been implicated as being associated with male infertility in recent studies. This association has been extensively demonstrated in women, involving synergistic mechanisms of action, mainly related to reduced capacity of ovulation. However, in men, the studies are controversial as reduced fertility and possible mechanisms of action. Although epidemiological studies indicate a correlation between male obesity and infertility, the relevance of this association and mechanisms of action remain unknown. According to recent meta-analysis, there is strong evidence that high levels of BMI occur concomitantly with decreased levels of testosterone, SHBG and free testosterone, but no evidence of significant association between high BMI and sperm changes to the present time.

Keywords: male infertility, obesity, testosterone, seminal changes, estradiol

INTRODUÇÃO

A obesidade tem sido apontada recentemente como um fator de risco possivelmente associado à infertilidade masculina e essa relação vem recebendo atenção crescente, em vista do rápido aumento na prevalência da obesidade no mundo desenvolvido e em desenvolvimento (Hofny *et al.*, 2010). Na mulher, esta associação já foi extensivamente estudada, e sabe-se que a obesidade reduz as taxas de ovulação espontânea, altera os resultados e a eficácia de técnicas de reprodução assistida e afeta negativamente o processo e o desfecho da gestação (Pasquali *et al.*, 2007).

No homem, estudos recentes sugerem que a obesidade pode estar associada a alterações nas características seminais, função endócrina reprodutiva, função sexual e infertilidade masculina (Hammoud *et al.*, 2008) porém os dados são conflitantes e estudos adicionais mostram-se necessários no sentido de estabelecer a consistência e intensidade dessa correlação, ou mesmo de refutar essa hipótese.

Esta revisão tem o objetivo de analisar a literatura disponível acerca da relação entre obesidade masculina e infertilidade, incluindo os possíveis mecanismos fisiopatológicos da associação descrita.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi feito um levantamento dos artigos publicados de 2005 a 2010 na base de dados Pubmed e nas databases disponíveis no Portal Capes com as seguintes palavras-chave: “male obesity” and “infertility” e “elevated BMI” and “semen parameters”, com seleção dos artigos relevantes para esta revisão além de busca das referências neles citadas.

RESULTADOS

1. Estudos Epidemiológicos:

Um estudo feito em 2006 trouxe à tona uma possível associação entre o aumento do IMC e a infertilidade. (Sallmén *et al.*, 2006) publicaram uma análise dos dados extraídos do “Agricultural Health Study” (Alavanja *et al.*, 1996) que estudou 1,329 casais cujos maridos eram aplicadores de pesticidas, mostrando associação entre IMC masculino elevado e infertilidade (*odds ratio* - OR) de 1.12, com intervalo de confiança (IC) = 1.01-1.25. Observou-se um efeito dose-resposta, máximo na faixa de IMC entre 32-34 e um efeito platô acima desta faixa. Entretanto, esse estudo apresentou limitações como a falta de detalhes sobre fatores femininos de infertilidade potencialmente confundidores, a elevada prevalência de infertilidade (28%), a idade elevada dos casais e a exposição a pesticidas.

(Ramlau-Hansen *et al.*, 2007), numa análise maior feita retrospectivamente a partir dos dados da “Danish National Birth Cohort (Olsen *et al.*, 2001), corroboraram os achados de Sallmén, associando subfertilidade conjugal e obesidade feminina e masculina (definida segundo o critério da OMS). O OR encontrado entre subfecundidade e sobrepeso masculino foi de 1.15 (IC 95% 1.09 – 1.22) e entre subfecundidade e obesidade masculina foi de 1.49 (IC 95% 1.34 – 1.64), após correção para IMC feminino e idade dos membros do casal. Ramlau propôs que, como em geral a obesidade é observada nos dois membros do casal, seria mais importante avaliar o risco estimado para os casais do que para homens ou mulheres individualmente. Quando os casais apresenta-

vam sobrepeso, o OR para subfecundidade foi 1.41 (IC 95% 1.28 – 1.56) e quando ambos eram obesos, o OR foi 2.74 (IC95% 2.27 – 3.30), comparados a casais em que ambos apresentavam peso normal.

(Nguyen *et al.*, 2007) também mostraram associação epidemiológica entre obesidade masculina e infertilidade, através de um estudo de coorte, o Norwegian Mother and Child, que investigou mulheres em segundo trimestre de gestação quanto ao tempo necessário para gestar. Infertilidade foi considerada como tempo para gestar maior que 12 meses. A análise final foi feita com 26.303 mulheres, após correção para frequência de relações sexuais, IMC feminino, idade do casal, presença de tabagismo e vários fatores de risco para infertilidade feminina. O estudo demonstrou que casais cujos homens tinham sobrepeso apresentavam certo grau de infertilidade, OR de 1.19 (IC 1.03–1.62), com incidência ainda maior no grupo de casais com homens obesos OR de 1.36 (95% CI 1.12–1.62). O efeito do IMC apresentou efeito dose-resposta como demonstrado por Sallmén, com platô em níveis de IMC maiores que 35. Esse estudo não considerou casais que não conseguiram engravidar, o que pode ter mascarado a análise por não levar em consideração casais com grau de infertilidade mais acentuado, e subestimado o efeito da obesidade na infertilidade masculina. Em contrapartida, o número de casais analisados foi grande e a frequência de relações sexuais foi avaliada, o que permite inferir que a relação entre obesidade masculina e infertilidade pode ser mediada por fatores além da disfunção sexual, o que havia sido sugerido em alguns trabalhos (Hammoud *et al.*, 2008).

Um estudo prospectivo foi feito na “University College of Medicine Hershey Medical Center” (Pauli *et al.*, 2008) na Pensilvânia, observando 87 homens com idade entre 19 e 48 anos pelo período de 3 anos, excluindo os que apresentavam varicocele, história prévia de vasectomia ou qualquer doença clínica relevante ou crônica. Os participantes foram avaliados quanto à história de paternidade e submetidos a exame físico completo com análise de IMC, da espessura da prega cutânea bilateral dos braços e volume testicular. Foram comparadas as características clínicas entre homens com e sem história de paternidade com parceira atual ou prévia. Nesse estudo homens com história de paternidade apresentaram IMC (28.0 kg/m² vs. 31.6 kg/m²; P= 0.037) e espessura da prega cutânea (24.7 mm vs. 34.1 mm; P= 0.016) significativamente menor comparado a homens sem história de paternidade. Na tentativa de buscar as bases fisiopatológicas para uma possível associação entre obesidade masculina e infertilidade, diversos estudos estudaram o impacto da obesidade em dois parâmetros principais: as alterações seminais e o perfil de hormônios reprodutivos.

2. Obesidade e alterações no perfil hormonal:

(MacDonald *et al.*, 2010), em meta-análise publicada em 2010, mostram que a maioria dos estudos existentes até hoje aponta para uma correlação negativa entre obesidade e valores de Testosterona total e SHBG. A mesma relação foi observada para valores de Testosterona livre, porém com menor força de associação. Também parece haver relação positiva entre Estradiol (E2) e IMC, embora poucos estudos que apontam essa associação tenham significância estatística. A maioria dos estudos analisados não demonstra associação entre IMC e gonadotrofinas. Valores elevados de IMC mostraram efeito negativo sobre níveis de Inibina B.

(Jensen *et al.*, 2004) estudaram 1.558 militares jovens e observaram uma redução nos níveis de inibina B, SHBG, Testosterona e um aumento de Estrogênio nesses homens, comparados aos controles. Não houve, no entanto, um padrão de dose-resposta com o aumento do peso e as alterações observadas.

(Hofny *et al.*, 2010), em estudo caso-controle, ao analisar um grupo de 42 homens obesos férteis (controles) e 80 homens obesos inférteis oligozoospermicos de mesma faixa etária, encontrou entre os obesos oligozoospermicos um IMC médio mais elevado (33.49 ± 0.43 vs. 31.21 ± 0.39) e maiores valores médios de FSH, LH, E2, PRL e Leptina comparados aos obesos férteis. O IMC elevado foi relacionado positivamente com a dosagem de LH e leptina e negativamente com a dosagem sérica de testosterona.

(Pauli *et al.*, 2008) demonstraram que os níveis séricos de Testosterona se correlacionam negativamente com o IMC (r = -0.38, IC= -0.55 a -0.18, p= <0.001) e com a espessura da dobra cutânea (r= -0.30, IC= -0.48 a -0.09, p=0.005). A percentagem de Testosterona livre foi correlacionada positivamente com o IMC (r = 0.23, IC= 0.02 a 0.42, p=0.035). O IMC também foi relacionado negativamente à dosagem de Inibina B (r = -0.21, IC -0.41 a -0.002, p=0.048) e de FSH (r = -0.22, IC -0.41 a -0.01, p=0.042) e positivamente relacionado com os níveis de Estradiol (r = 0.34, IC 0.13 a 0.51, p=0.001).

Esse padrão hormonal já havia sido observado por (Hammoud *et al.*, 2008), numa revisão bibliográfica realizada em 2008, que descreveu o estado como um “Hipoandrogenismo Hipogonadotrófico Hiperestrogênico”. O aumento de Estrona e Estradiol seria atribuído a um aumento na aromatização periférica de androgênios, segundo estudo feito com administração de inibidores de aromatase para homens com obesidade avançada portadores de hipogonadismo hipogonadotrófico (de Boer *et al.*, 2005).

Uma vez que os estrogênios agem no hipotálamo afetando os pulsos de GnRH e na hipófise, regulando a secreção de LH e FSH, o efeito esperado do seu aumento seria a redução na produção de FSH e LH, com conseqüente redução na função testicular e na produção testicular de Testosterona. Esse foi um dos mecanismos fisiopatológicos inicialmente propostos para as alterações hormonais descritas (Hammoud *et al.*, 2008). Entretanto, se e como essas alterações seriam responsáveis pela redução das taxas de fecundidade e paternidade em homens obesos ainda são perguntas que ainda não foram respondidas.

3. Obesidade e alterações seminais

(Hammoud *et al.*, 2008) em um estudo retrospectivo com 526 casais em um centro de infertilidade com homens de idade média 32.08 ± 0.3 anos, excluindo aqueles com fator de infertilidade masculina conhecido observou um efeito dose-resposta entre obesidade masculina e incidência de oligozoospermia: Peso normal 5.32%, sobrepeso 9.52%, e obesos 15.62% (p=0.011). A prevalência de baixa motilidade progressiva também foi maior com o aumento do IMC: Peso normal 4.52%, sobrepeso 8.93%, e obesidade 13.28% (p=0.018). A incidência de disfunção erétil não variou entre as categorias de IMC após correção para fatores potencialmente contribuintes.

(Jensen *et al.*, 2004) observaram que entre homens sem outras causas conhecidas de infertilidade, mas com sobrepeso, 24.4% tinham oligozoospermia (contagem de espermatozoides <20 milhões/ml), comparado com 21.7%

entre homens com peso normal. Não foi encontrada associação significativa entre obesidade e alterações de volume seminal ou motilidade espermática. Algumas limitações desse estudo foram o tamanho reduzido da população avaliada com obesidade e o uso de apenas uma amostra de sêmen para avaliação, o que pode ter mascarado o real perfil do sêmen de ambos os grupos.

(Fejes *et al.*, 2005) estudaram 81 casais que se apresentaram para tratamento de infertilidade, excluindo aqueles com causas secundárias de infertilidade e foram analisadas duas amostras seminais, sendo usada para análise a amostra com melhores valores. Houve correlação negativa entre circunferência do quadril e concentração de espermatozoides ($r = -0.24$, $p = 0.033$) e a contagem total de espermatozoides se correlacionou negativamente com o peso, a circunferência da cintura e do quadril ($r = -0.024$, $p = 0.031$; $r = -0.26$, $p = 0.007$; $r = -0.22$, $p = 0.009$). Os autores não relataram associação entre IMC ou peso e concentração espermática.

(Pauli *et al.*, 2008) não encontraram correlação entre o IMC ou espessura da dobra cutânea com qualquer parâmetro de análise seminal, incluindo densidade, volume, motilidade total e percentual como determinada por Kruger. Apenas a dosagem de Inibina B foi associada à análise seminal da motilidade ($r = 0.23$, $p = 0.045$).

O papel da inibina B como marcador de espermatogênese já havia sido demonstrado por (Kumanov *et al.*, 2006), através de um estudo prospectivo com 75 pacientes com infertilidade e 12 controles com mesma idade média, com status de fertilidade provado. Nesse estudo foram feitas dosagens de LH, FSH, Prolactina, Inibina B e foi mensurado o volume testicular de todos os pacientes, e esses parâmetros foram correlacionados com a análise seminal segundo os parâmetros da OMS, chegando à conclusão de que a dosagem de Inibina B poderia ser um marcador de fertilidade inclusive melhor que a dosagem de FSH ou LH uma vez que a concentração de Inibina B nos pacientes com infertilidade poderia prover informação útil sobre a espermatogênese, podendo ser um marcador mais direto desse processo.

Para (Hofny *et al.*, 2010), valores de IMC elevado se relacionam positivamente com anomalias na morfologia espermática e negativamente com a concentração e motilidade espermáticas. A leptina sérica teve correlação positiva com a idade do paciente e com anomalias na morfologia espermática e correlação negativa significativa com os níveis de testosterona, a concentração e motilidade espermáticas, dados que sugerem que a Leptina poderia desempenhar um papel de mediador entre a obesidade e a infertilidade masculinas.

(Tena-Sempere *et al.*, 1999) já haviam sugerido um efeito da Leptina sobre a fertilidade, através de um estudo feito em cobaias, que mostrou que a Leptina inibia a secreção de Testosterona; enquanto (Soyupek *et al.*, 2005) observaram que a expressão de receptores de leptina é diferente entre homens férteis e inférteis, propondo um impacto da leptina de duas formas diferentes – diretamente, através de receptores de membrana em tecidos periféricos e indiretamente pelo sistema neuroendócrino.

PERSPECTIVAS

Considerando a obesidade como um fator relacionado negativamente à fertilidade masculina, surge um novo questionamento: As técnicas atuais empregadas para emagrecimento estariam relacionadas a uma melho-

ra na fertilidade masculina? Um estudo realizado em homens submetidos à cirurgia de by-pass gástrico em Y de Roux mostrou que essa técnica poderia estar relacionada com um efeito colateral de parada na espermatogênese (Frega *et al.*, 2005). Outro estudo recente, (Rivaroli *et al.*, 2010) compararam os parâmetros seminais de um paciente submetido à cirurgia, com um grupo de 3 pacientes obesos e outro grupo controle, com espermograma considerado normal segundo os parâmetros da OMS. Esse estudo observou que o grupo de pacientes obesos apresentou menor volume, concentração total e concentração/ml de espermatozoides e morfologia normal, comparado ao grupo controle, além de uma menor quantidade de espermatozoides rápidos e direcionais (tipos A e B). No indivíduo que foi submetido a cirurgia, foi observada normozoospermia, além de volume, vitalidade e morfologia espermática em valores normais. Esses achados sugerem que a cirurgia de Bypass não seja responsável pelas alterações seminais observadas por (Frega *et al.*, 2005), mas sim a própria obesidade. Esse estudo dispôs de uma pequena amostra de pacientes, e novos estudos nesse sentido precisam ser formulados. No entanto, ele levanta a possibilidade de que o tratamento para a obesidade masculina possa ser um aliado na busca pela fertilidade nesses homens.

DISCUSSÃO

Embora os estudos epidemiológicos apontem para uma associação entre sobrepeso, obesidade e infertilidade masculina, ainda não há subsídios na literatura para afirmar que a relação de fato existe. Estudos sobre alterações seminais relacionadas ao IMC são conflitantes e meta-análise recente (MacDonald *et al.*, 2010) não encontrou evidência significativa de associação entre alterações espermáticas e IMC elevado até o presente momento. No entanto, há forte evidência de que altos níveis de IMC cursam com redução nos níveis de testosterona, SHBG e testosterona livre, e alguns estudos observaram aumento dos níveis de Estradiol em homens obesos (MacDonald *et al.*, 2010),

Acredita-se que o padrão hormonal de hipoandrogenemia observado nesses homens poderia alterar a espermatogênese e consequentemente a fertilidade masculina.

No entanto, os dados disponíveis são conflitantes e precisam ser complementados com estudos populacionais prospectivos com maiores amostras. Dessa maneira, poderemos definir com maior precisão a existência e a magnitude dessa relação e determinar o efeito da perda de peso sobre a fertilidade masculina.

Correspondência

Ludmila Machado Neves

Rua Girassol, 584, ap. 402B, Vila Madalena, São Paulo, SP
CEP: 05433002.

ludmila_machadoneves@yahoo.com.br

REFERÊNCIAS

Alavanja MC, Sandler DP, McMaster SB, Zahm SH, McDonnell CJ, Lynch CF, Pennybacker M, Rothman N, Dosemeci M, Bond AE, Blair A. The Agricultural Health Study. *Environ Health Perspect*, 1996;104:362–9.

de Boer H, Verschoor L, Ruinemans-Koerts J, Jansen M. (2005). Letrozole normalizes serum testosterone in severely obese men with hypogonadotropic hypogonadism. *Diabetes Obes Metab*, 2005; 7:211–5.

Dohle GR, Colpi GM, Hargreave TB, Papp GK, Jungwirth A, Weidner W. EAU Guidelines on Male Infertility, *European Urology*, 2005;48: 703–11.

- Hofny ER, Ali ME, Abdel-Hafez HZ, Kamal Eel-D, Mohamed EE, Abd El-Azeem HG, Mostafa T. Semen parameters and hormonal profile in obese fertile and infertile males. *Fertil Steril*, 2010;94: 581–4.
- Fejes I, Koloszar S, Szollosi J, Závaczki Z, Pál A. Is semen quality affected by male body fat distribution? *Andrologia*, 2005;37:155–9.
- Hammoud AO, Wilde N, Gibson M, Parks A, Carrell DT, Meikle AW. Male obesity and alteration in semen parameters. *Fertil Steril*, 2008;90(6):2222–5.
- Jensen, TK, Andersson AM, Jorgensen N, Andersen AG, Carlsen E, Petersen JH, Skakkebaek NE. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertil Steril*, 2004; 82:863–70.
- Kumanov P, Nandipati K, Tomova A, Agarwal A. Inhibin B is a better marker of spermatogenesis than other hormones in the evaluation of male factor infertility. *Fertil Steril*, 2006; 86 (2):332–8.
- MacDonald AA, Herbison GP, Showell M, Farguhar CM. The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with meta analysis. *Hum Reprod Update*, 2010;16:293–311.
- Nguyen RH, Wilcox AJ, Skjaerven R, Baird DD. Men's body mass index and infertility. *Hum Reprod*, 2007;17:2488–93.
- Olsen J, Melbye M, Olsen SF et al. The Danish National Birth Cohort—its background, structure and aim. *Scand J Public Health*, 2001;29:300–7.
- Pauli EM, Legro RS, Demers LM, Kunselman AR, Dodson WC, Lee PA. Diminished paternity and gonadal function with increasing obesity in men. *Fertil Steril*, 2008;90:346–51.
- Pasquali R, Patton L, Gambineri A. Obesity and Infertility. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2007;14:482–7.
- Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Nohr EA, Bonde JP, Sorensen TI, Olsen J. Subfecundity in overweight and obese couples. *Hum Reprod*, 2007;22:1634–7.
- Sallmen M, Sandler DP, Hoppin JA, Blair A, Baird DD. Reduced fertility among overweight and obese men. *Epidemiology*, 2006;17:520–3.
- Soyupek S, Armagan A, Serel TA, Hoscan MB, Perk H, Karaoz E, Candir O. Leptin expression in the testicular tissue of fertile and infertile men. *Arch Androl*, 2005;51:239–46.
- Tena-Sempere M., Pinilla L, Gonzalez LC, Diéguez C, Casanueva FF, Aguilar E. Leptin inhibits testosterone secretion from adult rat testis in vitro. *J Endocrinol*, 1999;161:211–8.

Gravidez obtida pela técnica “Real Time Lapse Embryoscope”

Case Report: Pregnancy obtained by “Real Time Lapse Embryoscope”

Juliano Brum Scheffer¹, Paola Xavier¹, Bruno Brum Scheffer¹, Rafaela Brum Scheffer¹

¹ Instituto Brasileiro de Reprodução Assistida- IBRRA – Belo Horizonte (MG), Brasil

RESUMO

A curiosidade humana e os avanços tecnológicos nos permitiram participar ativamente no processo de fertilização nos proporcionando um maior entendimento de nossa existência. Com a fertilização in vitro foi possível analisar as primeiras etapas da fertilização e embriogênese humana (Payne et al., 1997). Entretanto, esta análise foi superficial e a maior parte do desenvolvimento e das mudanças morfológicas foram deduzidas e baseadas em observações com horas de intervalo, visando pouca interferência e o bem estar dos embriões (Payne et al., 1997). Avaliação acurada da qualidade embrionária e a seleção ótima dos embriões são particularmente importantes ao tratamento de reprodução assistida para a taxa de sucesso. O uso de um instrumento automático com programação específica de aquisição de imagens embrionárias permite coletar dados mais exatos e precisos do desenvolvimento do embrião e quantificar os momentos exatos da clivagem de cada embrião. Descreveremos uma gravidez obtida pela fertilização in vitro com o monitoramento da fertilização e do desenvolvimento embrionário pela “real time lapse embryoscope”, após o consentimento da paciente.

Palavras-chaves: Fertilização in Vitro, Embrião, Real Time Lapse Embryoscope, Gravidez

ABSTRACT

The human curiosity and technological advances have allowed us to actively participate in the fertilization process in providing a greater understanding of our existence. With in vitro fertilization was able to analyze the early stages of human fertilization and embryogenesis (Payne et al., 1997). However, this analysis was superficial and most of the development and morphological changes were derived and based on observations with hours apart, little interference order and welfare of embryos (Payne et al., 1997). Accurate evaluation of the embryo quality and selection of excellent embryos are particularly important in assisted reproductive treatment to the success rate. The use of an automated tool to schedule specific embryonic imaging allows us to collect more accurate date and precise embryo development and to quantify the exact time of each embryo cleavage. We describe a pregnancy obtained by in vitro fertilization through a monitoring of fertilization and embryonic development by the real time lapse embryoscope.

Keywords: Fertilization in Vitro, Embryo, Real Time Lapse Embryoscope, Pregnancy

INTRODUÇÃO

Em 1994, Nagy et al. realizaram uma pesquisa descrevendo suas observações após realizar injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Os óvulos foram

observados de duas em duas horas após a injeção, porém os resultados foram inconclusivos devido à dificuldade de detectar o momento das mudanças morfológicas, concluindo pela ineficiência deste sistema.

A tecnologia do “real time lapse” supera estas limitações, proporcionando imagens contínuas e de alta resolução, possibilitando uma análise detalhada de vários componentes das células e dos embriões, assim como detectando precisamente tempo de clivagem, fragmentação, multinucleação e outros eventos importantes da fecundação in vitro (FIV) (Iwata et al., 2010). Além disso, proporciona acesso on-line para analisar o desenvolvimento dos embriões, mesmo de fora do laboratório.

Unindo estas imagens em um vídeo torna-se possível estudar e saber o momento das alterações no óvulo e/ou no embrião. Facilita portanto a escolha do melhor embrião a ser implantado, aumentando as chances de sucesso da gravidez e nascimento, além de diminuir as chances de gravidez múltipla (María et al., 2010; Herrero et al., 2010; Noyes et al., 2008).

Estudos comprovaram que o “real time lapse” não afeta a taxa de fertilização ou desenvolvimento dos embriões, por não ser uma técnica invasiva nem expor os embriões a quantidades nocivas de luz (Van Den Berg et al., 1995; María et al., 2010). Torna-se então uma técnica capaz de observar em tempo real a atividade celular durante a fertilização e a embriogênese (Payne et al., 1997).

DESCRIÇÃO DO CASO

Paciente KGC, 37 anos, solteira. Infertilidade primária. Sem parceiro desejava obter uma gravidez através do programa de sêmen de doador, obedecendo às normativas da Resolução CFM e da ANVISA. A paciente recebeu e concordou com o consentimento livre e esclarecido sobre o programa de doação de gametas. Menarca aos 12 anos, ciclos regulares, intervalos de 28 dias. Negava dismenorréia e dispareunia. Índice de massa corporal de 21 Kg/m², história patológica pregressa, familiar e genito-urinário sem anormalidades. Tabagista, 6 cigarros/dia. Sem cirurgias anteriores. Ao exame clínico ginecológico, nenhuma anormalidade. Dosagens hormonais de 3º dia do ciclo: FSH=7.14UI/L, E2=115.1pg/mL, P4=0.65ng/mL, LH=7.7UI/L, e AMH=2.16ng/mL. Sorologias para doenças infecto-contagiosas negativas. Histeroscopia observava pequeno pólipó em orifício interno anatômico que foi removido e o anátomo-patológico não evidenciou atipias. Ultrassonografia transvaginal sem anormalidades morfológicas, 14 folículos antrais precoces em ambos ovários. Indicada a FIV com oócitos próprios, concordou com a observação da fertilização e do desenvolvimento embrionário através do “real time lapse embryoscope”.

Estimulação Ovariana Controlada (EOC) + Transfereência Embrionária (TE)

No ciclo menstrual anterior à estimulação ovariana, a paciente utilizou contraceptivo oral ciproterona + etinilestradiol (Diane 35® /Schering) e no 21º dia do ciclo menstrual, iniciou com 20 unidades/dia de agonista de GnRH (GnRH-a; Acetato de Leuprolida - Lupron® SC - 2,8ml / Paris, França / Abbott) até no 1º dia da menstruação. Após a confirmação da dessensibilização pituitária ($E2 < 30 \text{ pg/mL}$ e ausência de folículos de tamanho superior a 6mm, espessura endometrial $< 5 \text{ mm}$), a paciente reduziu para a metade a dose do agonista de GnRH e iniciou a estimulação com FSH recombinante (Gonal F® SC- Bari, Itália / Serono) na dose de 225UI/dia + hMG altamente purificado (Menopur® SC /Kiel, Alemanha / Ferring) na dose de 75UI/dia nos 3 primeiros dias. Após este período, a dose foi então ajustada de acordo com a dosagem hormonal de E2 e US, em intervalos de 2 dias. A duração da estimulação ovariana foi de 8 dias e a administração do hCG recombinante (Ovidrel® SC /Serono) ocorreu quando a paciente apresentou > 5 folículos acima de 16mm de diâmetro, $E2 > 2200 \text{ pg/mL}$, $P4 < 1,4 \text{ ng/mL}$, $LH < 5 \text{ mUI/mL}$. A punção ovariana ocorreu 36 horas após o Ovidrel guiada pelo US. Foram coletados 17 óocitos sendo 15 metáfase II. A ICSI foi, então, realizada e obtivemos 11 embriões. Após o terceiro dia de fertilização, foram transferidos 2 embriões Tipo A através de cateter Wallace (18mm), e os 9 embriões restantes sofreram o processo de congelamento rápido - vitrificação.

A paciente manteve adesivos transdérmicos de estrogênios (300mg/ a cada 48h), a progesterona micronizada intravaginal (800mg/dia), o ácido acetilsalicílico oral (100mg/dia) e iniciou a utilização de nifedipina (Adalat Retard® - Bayer 30mg/dia) até o teste de gravidez, 12 dias após a TE. Após BhCG +, ultrasonografia transvaginal em 15 dias evidenciou saco gestacional único e batimentos cardíofetais positivos. No momento a paciente está em acompanhamento de pré-natal.

Laboratório de Fertilização In-Vitro (FIV)

Após a punção folicular, os 17 óocitos obtidos foram incubados em meio "human tubal fluid" (HTF / Lifeglobal ref. GMHT-100) suplementado a 10% de albumina (Life Global ref. GHSA 005) em incubadora a 5,5% de CO_2 a 37 graus Celsius por quatro horas. Em seguida, realizou-se a decumulação oocitária utilizando-se "hialuronidase" (IRVINE ref. 90101) e os 15 óocitos metáfase II foram microinjetados utilizando-se os meios PVP (IRVINE ref. 90123) e HTF modificado (IRVINE ref. 90126). Terminada a microinjeção os óocitos foram incubados em meio HTF (Lifeglobal ref. GMHT-100) em incubadora a 5,5% CO_2 e 37 graus Celsius. Após 17 a 19 horas da microinjeção foram observados 13 óocitos fecundados (dois prónucleos e dois corpúsculos polares). Os óocitos fecundados foram incubados no Primo Vision, utilizando o meio - Global - (Lifeglobal ref. LGGG020).

Real Time Lapse Embryoscope (Cryo Innovation®)

O Primo Vision (Cryo Innovation®) foi programado para tirar fotos a cada 15 minutos durante três dias, ao final dos três dias foram selecionados os dois embriões de qualidade tipo A (oito células, grau de fragmentação 0% e simetria um) para implantação, congelados 9 embriões e dois embriões descartados. A qualidade embrionária foi avaliada nos estágios precoces (clivagem precoce) e dia dois e dia três. Embriões foram classificados em Tipo A quando apresentavam em dia três, 6 a 8 células e $< 10\%$ de fragmentação tipo I e ausência de multinucleação. Tipo B quando apresentavam 2 a 5 células e entre 10 a

15% de fragmentação tipo I - II e ausência de multinucleação. Considerado fragmentação tipo I quando tinha volume mínimo e tipicamente associado a um somente blastômero; fragmentação tipo II localizado e ocupava predominantemente o espaço perivitelino.

Congelamento pré-embrionário através da Vitrificação pelo método Cryotop

Os nove embriões restantes foram congelados pelo método Cryotop como descrito pelo autor Kuwayama et al., 2005. Os embriões foram equilibrados em 7.5% (v/v) ethylene glycol (EG) + 7.5% dimethylsulfoxide (DMSO) em TCM199 medium +20% synthetic serum substitute (SSS), referido como "solução ES" a temperatura ambiente por 10 minutos. Após este tempo, os embriões foram então colocados na "vitrification solution-VS" parecida com a solução ES exceto pela concentração de 15% EG + 15% DMSO + 0.5 m sucrose. Depois de 1 minuto nesta solução, os embriões foram colocados no Cryotop strip (Kuwayama et al., 2005) e imediatamente submerso em nitrogênio líquido.

DISCUSSÃO

O "real time lapse" (Cryo Innovation®) é capaz de monitorar mudanças de temperatura, de pH, de umidade, exposição a luz não controlada, correntes elétricas ou eventuais movimentos que possam estar danificando o desenvolvimento do embrião (Escrich et al., 2010; Ramsing et al., 2006; Scott et al., 2006). Possui uma luz mínima de LED verde precisamente ajustada somente no momento de captura da imagem, o total de luz usada durante cinco dias é cerca de 10% do que um embrião é exposto na avaliação de rotina sem o embrioscópio. Apesar desses benefícios, alguns trabalhos não demonstraram aumento significativo na taxa de gravidez com o "real time lapse".

Meseguer et al., 2010 demonstrou que a taxa de gravidez bioquímica com (ES) ou sem (SI) embrioscópio foi similar $SI=59\%$ vs $ES=64\%$, $p=0.51$ assim como a taxa de gravidez evolutiva $SI=49\%$ vs $ES=55\%$, $p=0.44$.

María et al., 2010 relatou uma distribuição similar na qualidade embrionária com ou sem embrioscópio $A=33.1\%$ vs 35.6% , $B=17.1\%$ vs 15.7% , $C=20.4\%$ vs 20.6% , $D=29.4\%$ vs 28.1% , $p=0.941$; na taxa de blastocistos $ES=54.8\%$ vs $SI=50.6\%$, $p=0.399$; e na taxa de gravidez $ES=42,8\%$ vs $SI=42.1\%$.

O embrioscópio também permite a avaliação da maturação oocitária podendo auxiliar nos tratamentos de maturação in vitro (MIV) (Escrich et al., 2010) indicado principalmente em paciente com ovários polimicrocísticos, possibilitando, talvez, o aumento da taxa de implantação do embrião através da MIV.

O relato do caso ilustra a utilização do "real time lapse embryoscope", demonstrando como é a avaliação dos embriões sem perturbar as condições da incubadora e podendo fazer uma melhor seleção dos embriões a transferir por possibilitar uma retrospectiva precisa do desenvolvimento embrionário (Herrero et al., 2010) evitando assim a gravidez múltipla e suas consequências. Apesar da equipe clínica indicar a transferência de um único embrião, a paciente desejou e consentiu a transferência de dois embriões e pôde através do acesso on-line averiguar o desenvolvimento dos seus próprios embriões mesmo estando fora do laboratório.

Conforme a literatura científica, seja em estudos animais ou humanos, apesar do aumento absoluto das taxas de gravidez com o embrioscópio mas sem significância estatística, novos trabalhos ainda são necessários para maior esclarecimento, confirmação dos resultados, elucidação dos benefícios e novas descobertas acerca do tema.

REFERÊNCIAS

Escrich L, Grau N, Garcia-Bautista A, et al. Real-time evaluation of the different stages of meiosis during spontaneous in vitro maturation of human GV oocytes. *Fertil Steril*. 2010; 94:S141.

Herrero J, Alberto T, Ramsing NB, et al. Linking successful implantation with the exact timing of division events obtained by time-lapse system in the embryoscope. *Fertil Steril*. 2010; 94:S149.

Iwata K, Yumoto K, Mochida T, et al. Analysis of compaction initiation in human embryos using time-lapse cinematography. *Fertil Steril*. 2010; 94:S88.

Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online*. 2005 Nov;11(5):608-14.

María C, Nicolás G, Inmaculada PC, et al. comparative study of embryo quality, blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients sharing embryoscope and standard incubator. *Fertil Steril*. 2010; 94:S78.

Mesenguer M, Hilligsoe KM, Pedersen KS, et al. Pregnancy rates after incubation in new time-lapse incubator (embryoscope) providing detailed information about embryo

development compared to incubation in a standard incubator. *Fertil Steril*. 2010; 94:S150.

Nagy ZP, Liu J, Joris H, et al. Time-course of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in human oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1994; 9:1743-1748.

Noyes N, Kramer Y, Fino ME, et al. Continuous microscopic time-lapse evaluation of early embryo development provides new clues for optimal embryo selection. *Fertil Steril*. 2008; 90:S344.

Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD. Preliminary observation on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod*. 1997; 12: 532-41.

Ramsing NB, Callesen H. Detecting timing and duration of cell division by automatic image analysis may improve selection of viable embryos. *Fertil Steril*. 2006; 86:S189.

Scott L, Finn A, Legge D, et al. Non-invasive, real-time respirations measurements of human oocytes and embryos: a future means of embryo selection? *Fertil Steril*. 2006; 86:S88.

Van den Berg M, Davis PW, Merriam J. A retrospective analyse on unfertilized and presumed parthenogenetically activated human oocytes demonstrates a high frequency of sperm penetration. *Hum Reprod*. 1995; 9:2381-2388.

NEW TITLE "BIOETHICAL ISSUES IN AND FROM LATIN AMERICA"

We present a new book in the collection "Bioethical Issues", under the direction of Professor Maria Casado (UNESCO Chair in Bioethics, University of Barcelona).

The book *Bioethical Issues in and from Latin America* (Ed. Civitas, Navarra, 2012. ISBN: 978-84-470-3892-3) has been coordinated by Professor Maria Casado (OBD) and Professor Florencia Luna (FLACSO). This book aims to show a Latin American bioethics, different from that which appears as the official story, through a selection of authors and subjects that shows a way of doing bioethics usually silenced. A kind of bioethics whose opinions do not receive so much coverage in the media, but which, however, unites relevant people who are concerned about certain problems, expressing them in plain terms with the aim of providing feasible, non-dogmatic solutions that allow us to continue advancing in the same direction. This can be achieved through consensus by improving as much as possible the data and promoting debate on such relevant issues that affect the lives of those involved. This is an interdisciplinary reflection, not only philosophical, medical or legal reflection and this implies a wide-ranging pluralistic and multi-disciplinary conception of bioethics based on rigorous scientific knowledge and analysis of the arguments and reasons which support each of the various options at stake. The context of this style of bioethics is based on recognised human rights, i.e., on the international instruments which establish a range of rights that are fundamental for humans. These human rights are not so much a slogan but a unique, legally binding, minimum level of ethics.



The book is divided into three parts: an overview of bioethics in Latin America, which intends to provide the main themes that run through certain characteristics of Latin America as the presence of religion, violence, poverty, or the distance between theory and practice. The second part, Bioethics and Health in Latin America, attempts to show the current situation, knowing that these issues are problematic in all parts of the world but in Latin America with its own characteristics. The third part is devoted to issues related to research, an area of enormous relevance to the region, which is actually a section with remarkable specificity.

For more information of the book and the collection "Bioethical Issues" please visit www.bioeticayderecho.ub.es/publicaciones

Available online at <http://tienda.derecho.com/cuestiones-de-bioetica-en-y-desde-latinoamerica.html>



CURSOS PRÉ CONGRESSO	
22 de Agosto – quarta-feira	
Sala 1	
Oncofertilidade – Coordenação: Carlos Gilberto Almodin	
Sala 2	
O que o especialista em Reprodução Assistida deve saber sobre Ultrassonografia Ginecológica - Coordenação: Wagner Busato	
Sala 3	
MANHÃ	
Andrologia aplicada a Medicina Reprodutiva	
O que precisamos saber em 2012: Coordenação: Edson Borges Jr.	
TARDE	
O que o especialista deve saber: Produção Científica	
Coordenação: José Gonçalves Franco Jr., Maria do Carmo Borges de Souza e Paulo Taitson	
Sala 4	
Biópsia de Blastocisto - Coordenação: Alan Trounson e Maria Cristina Biazotti	
CONGRESSO	
23 de Agosto – quinta-feira	
Auditório A	Auditório B
08:00 - 09:30 Mesa Redonda: Endométrio Coordenador: Artur Dzik	08:00 - 10:00 MESA REDONDA: CRIOPRESERVAÇÃO Coordenador: Ricardo Azambuja
08:00 - 08:20 Endométrio este desconhecido Rosaly Rulli	08:00 - 08:30 Melhor conduta para embriões biopsiados Maria Cecilia Cardoso
08:20 - 08:40 Preparo endometrial - Ciclo a fresco e ciclo congelado Jairo Garcia	08:30 - 09:00 Ovócito à Blastocisto, qual a melhor técnica? Vania Minguetti
08:40 - 09:00 Como eu manuseio o endométrio na falha de implantação Selmo Geber	09:00 - 09:45 Atualização em Vitriificação: onde estamos hoje? Juergen Liebermann
09:00 - 09:30 Debate e Conclusão	09:45 - 10:00 Debate
	10:00 - 10:30 Coffee break

Auditório A	
09:30 - 10:00 Painel Como eu faço Indução da ovulação Coordenador: José Gonçalves Franco Jr Debate: João Pedro Junqueira, Nelson Antunes Jr., Silvana Chedid	
LH é importante? Bela Zausner	
Quando cancelar a indução? Luiz Fernando Dale	
Como usar antagonista? Ricardo Luiz R. Baruffi	
Existe espaço para agonista? Selmo Geber	
10:00 - 10:30 Coffee break	
10:30 - 11:00 Conferência Indução de ovulação Presidente: Maria do Carmo Borges de Souza Conferencista: Jairo Garcia	
11:00 - 12:30 Simpósio Satélite Merk Sero	
12:30 - 14:00 Almoço	
14:00 - 15:30 Simpósio Satélite MSD	
15:30 - 16:10 Conferência Preservação da fertilidade e abordagem clínica da oncofertilidade Presidente: Marcelo Rocha Conferencista: Clarisa Gracia Debate: Mario Cavagna e José Gonçalves Franco Jr.	

Auditório B	
10:30 - 12:30 MESA REDONDA: DIAGNÓSTICO PRÉ-IMPLANTACIONAL Coordenador: José Roberto Alegretti	
10:30 - 11:00 BIÓPSIA D3 x D5 Françoise Elia Mizrahi	
11:00 - 11:30 CGH array X FISH Paulo Perin	
11:30 - 12:00 MELHOR DIA PARA TRANSFERÊNCIA Joyce Fioravanti	
12:00 - 12:30 DISCUSSÃO	
12:30 - 14:00 Almoço	
14:00 - 16:00 MESA REDONDA: CULTIVO EMBRIONÁRIO Coordenador: Raquel Alvarenga	
14:00 - 14:30 IVM Adriana Bos Mickichi	
14:30 - 15:00 Marcadores Embrionários: onde estamos? Edson Guimarães Lo Turco	
15:00 - 15:45 Cultura de embriões: meios de melhorar formação do blastocisto que resultam em melhor evolução Juergen Liebermann	
15:45 - 16:00 DISCUSSÃO	
16:00 - 16:30 MESA REDONDA: AVALIAÇÃO TIME-LAPSE Coordenador: Claudia Petersen	
16:00 - 16:20 Experiência Européia Buenaventura Coroleu	

Auditório A		Auditório B		Auditório A		Auditório B		
16:10 - 17:10	Temas Livres 1 Coordenador: Adelino Amaral Silva Debatedores: Paulo Franco Taitson e Maria do Carmo Borges de Souza	16:20 - 16:50	Experiência Brasileira Raquel Cossioello	14:10 - 15:40	Painel CONDUTAS EM REPRODUÇÃO ASSISTIDA Coordenador: Carlos Roberto Izzo Debatedores: Pedro Augusto A. Monteleone e Gilberto Costa Freitas	09:00 - 18:00	Consenso de Psicologia em Reprodução Humana (Sala 1) Presidente: Coodenador: Katia M. Straube e Rose Melamed	
17:10 - 17:30	Coffee break	16:50 - 17:10	DISCUSSÃO	14:10 - 14:30	Idade e Tratamentos de Reprodução Assistida Buenaventura Coroleu			
17:30 - 19:00	Mesa Redonda Endometriose e infertilidade Coordenador: Assumpto Iaconelli Jr.	17:10 - 17:30	Coffee break	14:30 - 14:50	Realidade da IVM Nilo Frantz			
17:30 - 17:50	Avançamos na fisiopatologia da endometriose? Genético?Imunológico? Eduardo Pandolfi Passos	17:30 - 18:30	ASSEMBLÉIA PRONUCLEO	14:50 - 15:10	Manejo das pacientes portadoras de HIV e Hepatites em RHA Waldemar Carvalho			
17:50 - 18:10	Quando indicar videolaparoscopia Carlos Alberto Petta			15:10 - 15:40	Debate			
18:10 - 18:30	Otimização no tratamento de RA em pacientes com endometriose Buenaventura Coroleu			15:40 - 16:10	Conferência SBRA e Pro Núcleo Controle de qualidade de laboratório e embriões Presidente: Claudia Petersen Conferencista: Juergen LiebermanN Debatedores: Raquel Alvarenga e Rita de Cássia Sávio Figueira			
18:30 - 19:00	Discussão 19:00 Sessão Solene de Abertura			16:10 - 16:30	Coffee break			
				16:30 - 18:00	Mesa Redonda Desafios do direito da medicina reprodutiva Presidente: Carlos Fonseca Monnerat Coordenador: Deborah Ciocci			
				16:30 - 16:50	Responsabilidade civil e penal dos serviços de RHA Ericson Gavazza Marques			
				16:50 - 17:10	Limites e legalidades na doação de gametas José Rogério Cruz e Tucci			
				17:10 - 17:30	RHA em situações especiais: concepção pós-mortem, útero de substituição, sexagem, etc. Deborah Ciocci			
				17:30 - 18:00	Debate			
				18:00 - 19:00	Assembléia SBRA (em outra sala)			
				21:00	Jantar de Confraternização			
24 de Agosto – sexta-feira								
Auditório A		Auditório B						
08:00 - 09:30	Mesa Redonda Andrologia Coordenador: Lídio Centa Jr.	08:00 - 09:00	Temas Livres 2 Coordenador: Luiz Fernando Dale Debatedores: George Hamilton Caldas e Luiz Augusto Batista					
08:00 - 08:20	Estilo de Vida: a fertilidade do homem pode ser realmente melhorada? Paulo Franco Taitson	09:00 - 09:30	Palestra Decisões clínicas sobre alterações endometriais ultra-sonográficas Presidente: Maria do Carmo Borges de Souza José Gonçalves Franco Jr.					
08:20 - 08:40	Investigação Laboratorial Masculina: o que muda para os tratamentos de ICSI Fábio Firmbach Pasqualotto	09:30 - 10:10	Conferência Pesquisa da Reserva Ovariana Presidente: Adelino Amaral Silva Conferencista: Buenaventura Coroleu Comentadores: Marcello Pereira Valle e Roberto Antunes					
08:40 - 09:00	Existe diferença nos bebês nascidos de ICSI? Edson Borges Jr.	10:10 - 10:30	Coffee break					
09:00 - 09:30	Debate	10:30 - 12:00	Mesa Redonda Para onde estamos caminhando? Coordenador: Paulo Serafini					
09:30 - 10:10	Painel Como eu faço Suplementação Lútea Coordenador: Antonio Cesar Barbosa Debatedores: Kazue Harada Ribeiro, Joaquim Roberto Costa Lopes, Lister Salgueiro	10:20 - 10:50	Laboratório Juergen Liebermann					
	Até quando? Rui Alberto Ferriani	10:50 - 11:10	Transferência de Embrião Único (SET) Buenaventura Coroleu					
	Quando associar estradiol Luiz Eduardo Albuquerque	11:10 - 11:30	A próxima geração da criopreservação – Liofilização de embriões Pasquale Patrizio					
	Quando usar anticoagulante? Eduardo Leme Motta	11:30 - 12:00	Discussão					
	Há espaço para hCG? Álvaro Petracco	12:00 - 13:30	Almoço					
10:10 - 10:30	Coffee break	13:30 - 14:30	Temas Livres 3 Coordenador: Carlos Gilberto Almodin Debatedores: Vinicius Medina Lopes e Eduardo Pandolfi Passos					
10:30 - 11:10	Conferência Células tronco em Reprodução Humana Presidente: Rui Alberto Ferriani Conferencista: Alan Trounson Debatedores: Lygia da Veiga Pereira e Marcos Sampaio	14:30 - 16:00	Mesa Redonda Validação de processos e procedimentos em clinica de Reprodução Coordenador: Alvaro Ceschin					
11:10 - 12:00	Sessão Interativa Avaliação da pré Fertilização in vitro Coordenador: Newton Eduardo Busso Debatedores: Elvio Tognotti, Jonathan Borges Soares, Leopoldo de Oliveira Tso e Antonio Helio Olinari	14:30 - 14:50	Validação de Processos. E agora? Patricia Tavares					
	Temas Sorologia do Casal Cavidade Uterina Reserva Ovariana Sêmen	14:50 - 15:10	Gestão da Qualidade: garantindo a segurança do paciente Maressa Ribeiro					
12:00 - 13:30	Almoço	15:10 - 15:30	Como a Anvisa avalia validação nos BCTG Marina Ferreira Gonçalves					
13:30 - 14:10	Conferência Metabolomas Presidente: Bela Zausner Conferencista: Pasquale Patrizio Comentadores: Cristiano Eduardo Busso e Nilka Donadio	15:30 - 16:00	Debate					
		16:10 - 16:30	Coffee break					
		16:30 - 18:00	Simposio Satélite Ferring					
25 de Agosto – sábado								
Auditório A		Auditório B						
09:00 - 09:40	Conferência Fatos e Mitos em RH Presidente: Carlos Gilberto Almodin Conferencista: Jairo Garcia Debatedores: Dirceu Mendes Pereira e Jonathas Borges Soares	09:00 - 12:00	Mesa Redonda ENFERMAGEM EM REPRODUÇÃO ASSISTIDA Coordenação: Andréa Carolina M Magalhães e Amanda Torres R. Marçal					
09:40 - 10:40	Temas livres 4 Coordenador: Selmo Geber Debatedores: Edilberto Araujo Filho e Bruno Ramalho de Carvalho	09:00 - 09:20	Atribuições Gerais da Equipe de Enfermagem em Reprodução Assistida Yácará Ribeiro Pereira					
10:40 - 11:00	Coffee Break	09:20 - 09:40	Descrição dos procedimentos cirúrgicos e assistência de enfermagem Claudia Velloso					
11:00 - 12:30	PAINEL Desafios em Reprodução Humana Presidente: Condesmar Marcondes de Oliveira Filho Coordenador: Hitomi Miura Nakagava	09:40 - 10:00	Prevenção e Controle da Síndrome do Hiperestímulo Ovariano Giselle Soares Dias					
11:00 - 11:15	Alan Trounson	10:00 - 10:20	Discussão					
11:15 - 11:30	Pasquale Patrizio	10:40 - 11:00	Coffee Break					
11:30 - 11:45	Bela Zausner	11:00 - 11:20	Suporte de Enfermagem ao Casal após o insucesso no tratamento Junia Renata Araujo					
11:45 - 12:00	Jairo Garcia	11:20 - 11:40	Orientações para pacientes que fazem parte do Programa de Ovodoação Sandra Cavichiolo					
12:00 - 12:30	Discussão	11:40 - 12:00	Discussão					
		12:30 - 13:30	Premiação dos melhores trabalhos e Encerramento.					

2012**FEVEREIRO****04 de fevereiro**

Simpósio: Avanços na Medicina Reprodutiva - Interações da clínica com o laboratório
Local: Hotel Windsor Barra - Rio de Janeiro - RJ
Apoio: SGORJ E SBRA
e-mail: ginecologista@cmb.com.br

ABRIL**11 a 14 de abril**

V Congresso Mineiro de Ginecologia e Obstetrícia/ XVII Congresso de Ginecologia e Obstetrícia da Região Sudeste/ III Colpominas
Realização: SOGIMIG
Local: Centro de Convenções Expominas – Belo Horizonte/MG
Informações e inscrições:
(31) 3291-9899
www.cmgo2012.com.br

21 a 24 de abril

ASA 37th Annual Meeting - American Society of Andrology
Hilton Tucson El Conquistador / Tucson, Arizona
www.asa.org

MAIO**17 a 20 de maio**

The 2nd International Congress on Cardiac Problems in Pregnancy (CPP 2012)
Local: Berlin - Germany
www.cppcongress.com

23 a 25 de maio

38° Congresso Pernambucano de Ginecologia e Obstetrícia
Local: Centro de Convenções - Olinda - PE
Realização: SOGOPE
secretaria@sogope.com.br
http://www.sogope.com.br

24 a 26 de maio

VII Congresso Brasileiro de Climatério e Menopausa
Realização: SOBRAC – Associação Brasileira de Climatério
Local: São Paulo – SP (Centro de Convenções Frei Caneca)
www.menopausa.org.br

30 de maio a 01 de junho

19° Congresso Espírito Santense de Ginecologia e Obstetrícia
Realização: SOGOES
www.sogoes.com.br

JUNHO**07 a 09 de junho**

XXXVI Congresso de Ginecologia e Obstetrícia do Rio de Janeiro
Local: Centro de Convenções Sulamérica - Av. Paulo de Frontin, 1 - Cidade Nova - RJ
Realização: SGORJ
sgorj@sgorj.org.br

13 a 16 de junho

I Congresso Goiano de Ginecologia e Obstetrícia
22° Congresso de Ginecologia e Obstetrícia do Brasil Central da FEBRASGO
IV Congresso Internacional de Ginecologia e Obstetrícia de Goiás
37ª Jornada Goiana de Ginecologia e Obstetrícia
Local: Centro de Convenções de Goiânia - Goiás
ginecologia@sggo.com.br

27 a 29 de junho

45° Congresso de Ginecologia e obstetrícia do Distrito Federal,
6° Congresso Internacional de Ginecologia e Obstetrícia do DF e 1° Congresso Internacional de Controvérsias em Ginecologia e Obstetrícia do DF
Local: Centro de Convenções Ulysses Guimarães – Brasília – DF
www.sgob.com.br

28 a 30 de junho

XII Congresso Brasileiro de Ginecologia e Obstetrícia da Infância e Adolescência
Local: Maksoud Plaza Hotel, em São Paulo, SP
http://www.sogorn.com.br

JULHO**1 a 4 de julho**

28th Annual Meeting - ESHRE 2012 - Istanbul, Turkey.
European Society of Human Reproduction and Embryology
www.eshre.org

18 a 21 de julho

11° Congresso Brasileiro de Videocirurgia
Local: Windsor Barra Hotel - Rio de Janeiro – RJ
e-mail: congresso@sobracil.org.br
www.sobracil.org.br/congresso

26 a 28 de julho

XI Congresso Sul Brasileiro de Urologia
Hotel Infinity Blue – Recanto das Águas na cidade de Balneário Camboriú – SC.
www.praxis.srv.br

AGOSTO**15 a 18 de agosto de 2012**

XXII Congresso Brasileiro de Citopatologia
Local: Mar Hotel - Recife - PE
http://www.xxiicbc2012.com.br/

22 a 25 de agosto

XVI Congresso Brasileiro de Reprodução Assistida Sofitel Jequitimar Guarujá
http://www.sbra2012.com.br/

SETEMBRO**14 a 17 de setembro**

63rd Annual Meeting of the German Society of Urology (DGU)
Hamburg – Germany
Organisation: INTERPLAN
E-mail: 2011@dgu.de
Website: www.dgu-kongress.de/index.php?id=571

OUTUBRO**7 a 12 de outubro**

XX FIGO WORLD CONGRESS OF GYNECOLOGY AND OBSTETRICS
http://www.figo2012.org/fellowship/

10 a 14 de outubro

XIV Simpósio Brasileiro de Patologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia e V COLPOVIX
Local: Centro de Convenções de Vitória – ES
Realização: SOGOES
http://www.sogoes.com.br

26 a 26 de outubro

84th Congress of the SIU – Rome – Italy
E-mail: info@siu.it
Website: www.siu.it

25 a 27 de outubro

19° Congresso Baiano de Obstetrícia e Ginecologia
Local: Bahia Pestana Hotel
Realização: SOGIBA
http://www.sogiba.com.br/

28 a 31 de outubro

XVI Congresso Sul-Brasileiro de Ginecologia e Obstetrícia
I Jornada Sul-Brasileira de Mastologia
Costão do Santinho
Resort - Florianópolis

Menopur® (menotropina - LH 75 U.I. + FSH 75 U.I.).

USO ADULTO. INDICAÇÕES Mulheres: Esterilidade com insuficiência ovariana hipo – ou normogonadotrófica: estimulação do crescimento folicular, incluindo mulheres com síndrome de ovário policístico que não responderam ao tratamento com citrato de clomifeno. **Homens:** Esterilidade com hipogonadismo hipo – ou normogonadotrófico: em combinação com HCG, para estimular a espermatogênese. **CONTRAINDICAÇÕES Em Mulheres:** tumores na glândula pituitária ou no hipotálamo e no útero, ovários e mamas; gravidez e lactação; sangramento ginecológico de etiologia desconhecida; hipersensibilidade aos componentes da fórmula. aumento dos ovários ou cistos que não tenham sido causados por síndrome de ovário policístico; níveis altos de LH e FSH indicando uma insuficiência ovariana primária. Menopur® não deve ser administrado nos casos de: falência primária ovariana; má-formação de órgãos sexuais incompatíveis com a gravidez; tumor fibroide do útero incompatível com a gravidez. **Em Homens:** câncer de próstata; tumores no testículo. As seguintes condições devem ser tratadas antes do início da terapia: disfunções da glândula tireoide e do córtex da glândula supra-renal; hiperprolactinemia; tumores na glândula pituitária ou no diencéfalo (hipotálamo). **CUIDADOS**

E ADVERTÊNCIAS Não deve ser utilizado para induzir a ovulação em mulheres cujos ovários foram involuntariamente hiperestimulados. A terapia requer monitorização da resposta ovariana verificada apenas pela ultrassonografia ou em combinação com a mensuração do nível de estradiol sanguíneo. Alguns pacientes podem apresentar baixa resposta. Pacientes que estão sob estímulo do crescimento folicular para técnicas de reprodução assistida podem apresentar aumento ovariano ou desenvolver hiperestimulação. **Uso em idosos e crianças** Menopur® é um medicamento de uso adulto. **Gravidez e Lactação** Menopur® não deve ser utilizado por mulheres grávidas ou lactentes. **INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS** O uso concomitante de Menopur® com o citrato de clomifeno pode aumentar a resposta folicular. Quando for utilizado um agonista de GnRH, uma dose mais alta de Menopur® deve ser necessária para atingir uma resposta folicular adequada. **REAÇÕES ADVERSAS** dores abdominais, náusea, aumento do abdômen, dor e reação no local da injeção, cefaleia, hiperestimulação dos ovários, dor pélvica, febre, ascite, hidrotórax, oligúria, hipotensão e fenômenos tromboembólicos. Em casos muito raros, pode causar a formação de anticorpos tornando o tratamento ineficaz.

POSOLOGIA Para indução do crescimento folicular em procedimentos de baixa complexidade (coito programado e inseminação intrauterina) em mulheres normo ou hipogonadotróficas a dose depende da reação ovariana, a qual deve ser definida através de exames ultrassonográficos dos ovários e mensuração dos níveis de estradiol. Se a dosagem de Menopur® for muito alta, podem ocorrer crescimentos foliculares uni e bilaterais múltiplos. Em geral, a terapia é iniciada dentro dos 7 primeiros dias do ciclo menstrual com uma dosagem inicial 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 ajuste na dose não deve ser feito em frequência maior que 7 dias. 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. A dose máxima diária não deve ultrapassar 225 U.I. Caso a paciente não responda após 4 semanas de tratamento, o tratamento deve ser reiniciado com uma dosagem inicial maior do que a do ciclo anterior. Para induzir a ovulação, após uma resposta ótima do tratamento com Menopur®, utiliza-se 5.000 ou 10.000 U.I. de HCG injetado por via intramuscular, 1 dia após a última administração de Menopur®. **Importante:** recomenda-se que a paciente tenha relação sexual no dia e no dia seguinte da administração do HCG. Como alternativa, a inseminação intrauterina pode ser realizada. **OBSERVAÇÃO:** Após a administração de uma dose muito alta de Menopur®, a administração subsequente de HCG pode causar uma hiperestimulação involuntária dos ovários. Neste caso, o tratamento deve ser interrompido tanto com Menopur® ou com HCG e a paciente deverá utilizar um método anticoncepcional ou evitar relações sexuais até o início da próxima menstruação. A dosagem de Menopur® em programas de fertilização assistida (FIV/ICSI) pode variar de pessoa para pessoa. De um modo geral recomendam-se os seguintes esquemas posológicos: Quando for utilizado agonista de GnRH em depósito, a terapia com Menopur® deve ser iniciada aproximadamente 2 semanas após o início do tratamento com o agonista. A dose inicial recomendada de Menopur® é 150 - 225 U.I. por, pelo menos, 5 dias iniciais do tratamento. Baseado na monitorização clínica (ultrassonografia do ovário em combinação ou não com a mensuração do nível de estradiol sanguíneo) as doses subsequentes devem ser ajustadas de acordo com a resposta individual e não devem exceder a quantidade de 150 U.I. por ajuste. A dosagem máxima diária não deve exceder 450 U.I. por dia e na maioria dos casos não é recomendada a utilização acima de 20 dias. Caso não seja utilizado o agonista de GnRH, a terapia com Menopur® deve ser iniciada no 2º ou 3º dia do ciclo menstrual. É recomendada a utilização de esquemas de variação de doses acima citadas. Quando um número adequado de folículos atingir um tamanho apropriado, uma única injeção de 10.000 U.I. de HCG deve ser administrada para induzir a maturação folicular final, na preparação da aspiração de oócitos. As pacientes devem ser cuidadosamente monitoradas por, pelo menos, 2 semanas após a administração de HCG. Caso seja obtida uma resposta em excesso de Menopur®, deve-se interromper o tratamento e descontinuar o uso de HCG e as pacientes devem utilizar um método contraceptivo de barreira (por exemplo: camisinha) ou evitar relações sexuais até iniciar-se a próxima menstruação. **No Homem:** Inicialmente, 1.000 - 3.000 U.I. de HCG são administrados 3 vezes por semana, até atingir-se um nível sérico de testosterona normal. Então, 75 - 150 U.I. de Menopur® são administradas 3 vezes por semana, por alguns meses e de acordo com o critério médico. Orientar a/o paciente quanto ao protocolo de uso, para que não haja comprometimento do sucesso terapêutico.

Venda sob prescrição médica. Material de uso exclusivo à classe médica. A persistirem os sintomas, o médico deverá ser consultado. Reg. MS: 1.2876.0011 Farm. Resp.: Helena Satie Komatsu - CRF/SP: 19.714 - Laboratórios Ferring Ltda. Praça São Marcos, 624 - 05455-050 - São Paulo - SP / CNPJ: 74.232.034/0001-48 / SAC: 0800 772 4656.

Contraindicação: Para mulheres com tumores no útero, nos ovários e nas mamas. **Interações medicamentosas:** O uso concomitante com o citrato de clomifeno pode aumentar a resposta folicular.

Referências: **1** Ziebe, S. *et al.* Influence of ovarian stimulation with HP-hMG or recombinant FSH on embryo quality parameters in patient undergoing IVF. Human Reproduction, 22(9): 2404-2413, 2007. **2** Weghofer, A. the impact of LH-containing gonadotropin on diploidy rates in preimplantation embryos: long protocol stimulation. Human Reproduction, 23(3): 499-503, 2008. **3** Al-Inany HG, *et al.* Efficacy and safety of human menopausal gonadotrophins versus recombinant FSH: a meta-analysis. Reprod Biomed OnLine. 16:81-88, 2008. **4** Coomarasamy, A. Urinary hMG versus recombinant FSH for controlled ovarian hyperstimulation following an agonist long down-regulation protocol in IVF or ICSI treatment: a systematic review and meta-analysis. Human Reproduction, 23(2): 310-315, 2008. **5** Wely, V. *et al.* Recombinant versus urinary gonadotrophin for ovarian stimulation in assisted reproductive technology cycles. Cochrane Database Syst Rev. 16(2):CD005354. Review, 2011. **6** Al-Inany HG. *et al.* Highly purified hMG achieves better pregnancy rates in IVF cycles but not ICSI cycles compared with recombinant FSH: a meta-analysis. Gynecol Endocrinol. 25(6):372-8, 2009. **7** Platteau P. *et al.* Highly purified hMG versus recombinant FSH for ovarian stimulation in IVF cycles. Reprod Biomed Online 17(2):190-8, 2008. **8** Andersen, AN. *et al.* Clinical outcome following stimulation with highly purified hMG or recombinant FSH in patients undergoing IVF: a randomized assessor-blind controlled trial. Human Reproduction, 21(12): 3217-3227, 2006. **9** Bosch, E. *et al.* Highly purified hMG versus recombinant FSH in ovarian hyperstimulation with GnRH antagonists - a randomized study. Human Reproduction, 23(10): 2346-2351, 2008. **10** Jee BC. *et al.* Clinical efficacy of highly purified hMG versus recombinant FSH in IVF/ICSI cycles: a meta-analysis. Gynecol Obstet Invest., 70(2):132-7, 2010.



Laboratórios Ferring - Brasil
Pça. São Marcos, 624 - 05455-050 - São Paulo - Brasil
PABX - 55 11 3024.7500



MEN AN 112 Maio 2012

CONTRIBUINDO PARA MELHORES RESULTADOS¹⁻⁷



O TRATAMENTO COM MENOPUR® PROMOVE:

-  Maior proporção de embriões de alta qualidade quando comparado ao rFSH^{1,2}
-  Menores níveis de progesterona ao final da estimulação vs. rFSH, o que pode resultar em melhor receptividade endometrial para a implantação do embrião^{8,9}
-  Taxas de gravidez em curso e de nascidos vivos significativamente maiores comparado com rFSH^{3-7,10}



 FALE FERRING
0800 772 4656

Laboratórios Ferring - Brasil
Pça. São Marcos, 624 - 05455-050 - São Paulo - Brasil
PABX - 55 11 3024.7500

FERRING
PHARMACEUTICALS