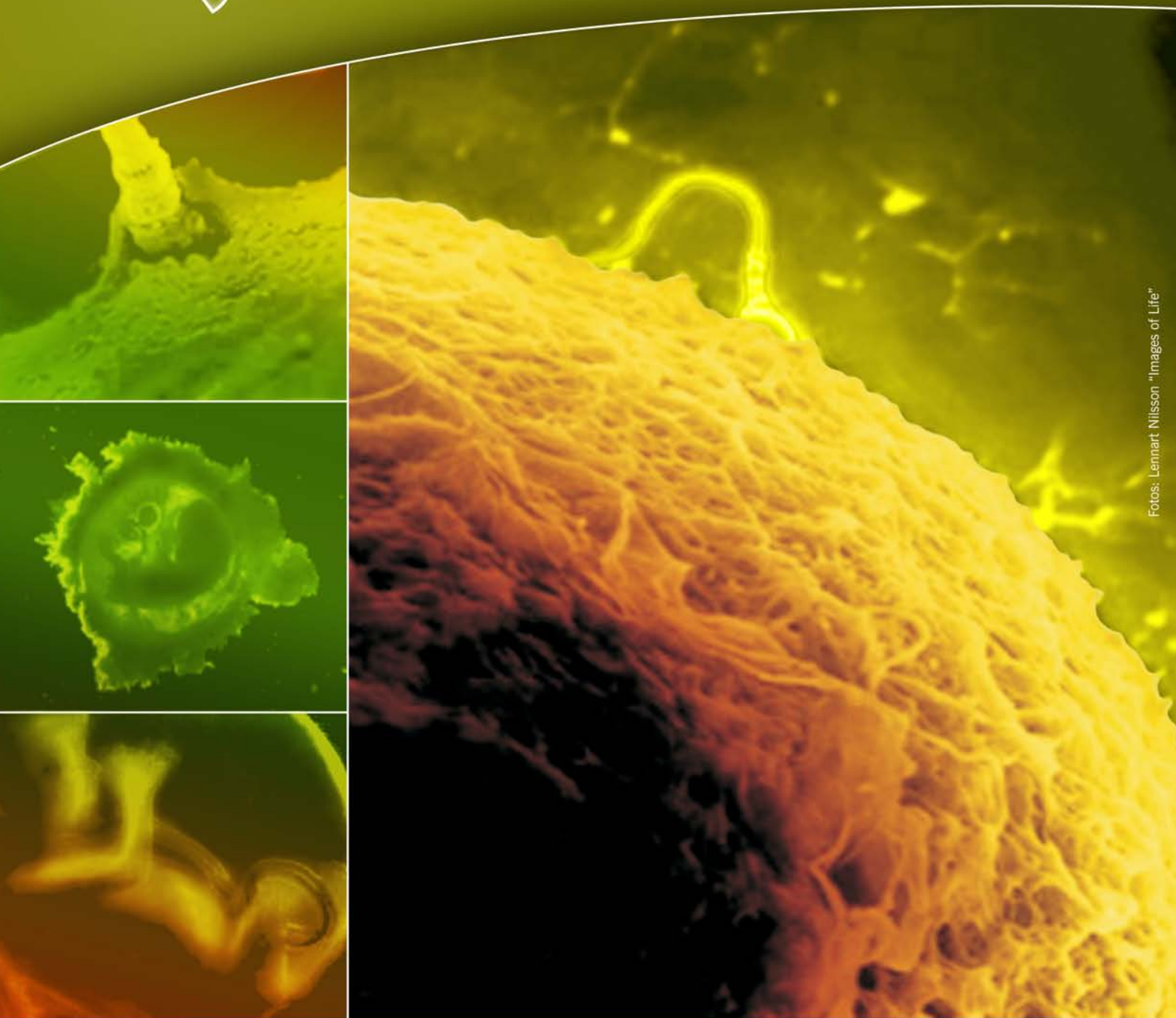


JBRA

Volume 12 | Número 3 | Jul-Ago-Set 2008 | ISSN 1517-5693

JORNAL BRASILEIRO DE
REPRODUÇÃO
ASSISTIDA



Fotos: Lennart Nilsson "Images of Life"



Portfólio completo
para o tratamento
da infertilidade.



GONAL-f
alfafolitropina

Preenchido por massa Injetor

O preenchimento por massa assegura
uma dosagem homogênea e garante
um nível uniforme de atividade de FSH¹⁻³



Luveris
alfalutropina

Benefício da adição
de r-hLH em pacientes
com idade reprodutiva
mais avançada⁴



Cetrotide
acetato de cetrorrelax

Reduz o tempo de
tratamento comparado
ao protocolo longo com
agonista GnRH⁵⁻⁷

VIDREL Seringa
Pré-enchida
alfacoriogonadotropina



O hCG confiável⁸⁻¹³



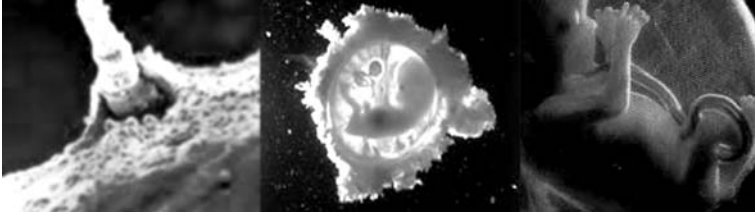
Crinone
progesterona gel 8%

Otimiza o suporte
de progesterona
na fase lútea

Serviço de Atendimento Merck Serono
0800 113320

fertilidade
online.com.br
www.fertilidadeonline.com.br

MERCK
SERONO



JBRA JORNAL BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA

CORPO EDITORIAL NACIONAL

Editor	Clínica	Região
Maria do Carmo Borges de Souza	G&O Barra / UFRJ	RJ

Editor Adjunto

Paulo Franco Taitson	IRH	MG
----------------------	-----	----

Consultor Editorial

José Gonçalves Franco Júnior	CRH	SP
------------------------------	-----	----

Assistente Editorial

Bruno B de Souza		
------------------	--	--

Editores Associados

Edson Borges Junior	FERTILITY	SP
João Batista Alcântara Oliveira	CRH - Ribeirão Preto	SP
Selmo Geber	ORIGEN	MG
Weydson Barros Leal	UFPE	PE

Conselho editorial

Adelino Amaral Silva	GENESIS	DF
Alessandro Schuffner	CONCEBER	PR
Alvaro Petracco	FERTILITAT	RS
Ana Cristina Allemand Mancebo	G&O BARRA	RJ
Aroldo Camargos	UFMG	MG
Bela Zausner	GENESE	BA
Bruno Scheffer	IBRA	MG
Carlos André Henriques	G&O BARRA	RJ
Claudia G. Petersen	CRH - Ribeirão Preto	SP
Condesmar Marcondes Filho	NÚCLEO REPRODUÇÃO	SP
Dirceu Mendes Pereira	PROFERT	SP
Eduardo Pandolfi Passos	SEGIR - UFRGS	RS
Elvio Tognotti	FMUSP	SP
Fabio Firmbach Pasqualotto	UCS - Conception	RS
Humberto Ikuo Shibasaki	UFMT	MT
João Pedro Junqueira Caetano	PRÓ-CRIAR/MATER DEI	MG
Joaquim Roberto Lopes	CENAFERT	BA
Jonathas Borges Soares	PROJETO ALPHA	SP

Jorge Hallak	REPROFERTY	SP
Leila Montenegro Silveira Farah	FERTILITY	SP
Lídio Jair Ribas Centa	ANDROLAB	PR
Luiz Fernando Dale	Centro de Medicina da Reprodução	RJ

Marcos Sampaio	ORIGEN	MG
Mariangela Badalotti	FERTILITAT	RS
Marilza Vieira Rudge	UNESP Botucatu	SP
Mario Cavagna	Hospital Pérola Byington	SP
Newton Eduardo Busso	UNIFERT	SP
Paulo Franco Taitson	IRH	MG
Paulo Serafini	HUNTINGTON	SP
Paulo Spinola	CEPARH	BA
Renzo Antonini Filho	Instituto de Saúde da Mulher	mg

Ricardo Melo Marinho	MATER DEI	MG
Roberta Wonchockier	Projeto Alfa	SP
Roger Abdelmassih	Clinica e Centro de Reprodução Humana	SP

Rosana Maria dos Reis	Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto	SP
-----------------------	---	----

Sidney Glina	Hospital Israelita Albert Einstein	SP
--------------	------------------------------------	----

Silvana Chedid	CEPERH	SP
----------------	--------	----

CORPO EDITORIAL INTERNACIONAL

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

Diretoria da SBRA - 2007/2008

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

Departamento de Publicações

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

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

Departamento de Publicações:

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

Comissão de Atividades Internacionais:

Marcos Sampaio
Ricardo Baruffi

Departamento Científico:

Mario Cavagna
Fabio Pasqualotto
Eduardo Motta

Comissão de Ética e Defesa de Prerrogativa:

Bela Zausner
Arthur Dzik
Lídio Jair Ribas Centa
Luiz Fernando Dale

Comissão de Educação Continuada:

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

Conselho Fiscal:

Joaquim Roberto C. Lopes
Condesmar Marcondes Filho
César
Jonathas Borges

Conselho Consultivo:

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

Comissão de Comunicação:

Paulo Franco Taitson
Lia Ferragut
César Cornet

Relações Governamentais:

Rosaly Rulli Costa
Hitomi Miura Nakagava

PGD:

Coordenador: Selmo Geber
Assumpto Iaconelli Junior
Leila Farah
Mariana Faller

DST:

Caio Parente Barbosa
Waldemar Diniz de Carvalho
Paulo Naud

Endoscopia:

Coordenador: Maria Cecilia Erthal
Paulo Beltrame
Sergio Galbinsky

Endometriose:

Coordenador: Vilmon de Freitas
Elvio Tognotti
João Pedro Junqueira

Enfermagem:

Coordenadora: Suzana Zachia
Renata Trigo
Jacqueline Aranki

Psicologia:

Coordenadora: Ana Rosa

Andrologia:

Coordenador: Edson Borges

Projetos Multicentricos:

Franco Junior

Comissão de Normatização - ANVISA e SELO SBRA

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

Endocrinologia:

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

INFORMAÇÕES GERAIS

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

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

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

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

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

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

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

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

TIPOS DE ARTIGOS PUBLICADOS

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

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

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

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

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

PREPARAÇÃO DOS ORIGINAIS

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

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

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

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

PÁGINA DE ROSTO

A página de rosto deve conter:

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

RESUMO E ABSTRACT

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

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

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

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

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

1. Artigo de periódico

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

2. Livro

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

3. Capítulo de livro

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

4. Artigo de revista eletrônica

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

5. Artigo publicado na Internet:

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

6. Site

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

7. Software

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

TABELAS E FIGURAS

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

Nas tabelas, deverão ser utilizadas apenas linhas horizontais, e cada dado deverá constar em uma célula independente. Explicações sobre itens das tabelas devem ser apresentadas em notas de rodapé identificadas pelos seguintes símbolos, nesta 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 (jornalsbra@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>



Nosso papel é abraçar grandes causas.

wpubliidade.com.br

Compromisso com a qualidade

Merck Serono é a Divisão da **Merck S.A.** especializada em produtos inovadores de prescrição médica. A Divisão foi estabelecida efetivamente em 5 de janeiro de 2007, com a aquisição da **Serono** pela **Merck** e a integração das áreas de negócios das duas empresas.

A **Merck Serono** tem uma forte presença em diversos países, com marcas líderes que atendem os pacientes nas áreas terapêuticas de Oncologia, Neurologia, Saúde

Reprodutiva, Dermatologia, Ortopedia, Saúde Feminina, Cardiologia, Metabolismo e Pediatria.

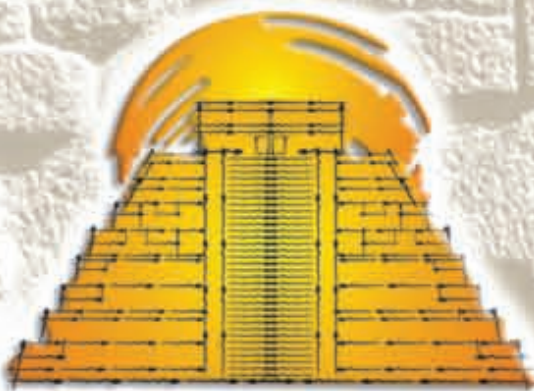
A Divisão **Merck Serono** tem o compromisso de buscar sempre o melhor através da excelência de seus colaboradores e da qualidade de seus produtos.

▶ **Somos a única empresa que possui o portfólio completo para o tratamento da infertilidade.**

Serviço de Atendimento Merck Serono
0800 113320

f@rtilidade
online.com.br
www.fertilidadeonline.com.br

MERCK
SERONO



9o Taller General

Cancún | Abril | 2009

2009 Congreso Geral

Um encontro inesquecível
De 23 a 25 de abril

- Convidados da América Latina e do exterior
- *Prêmio Red-Lara* para melhor trabalho científico (oral e poster)
- Eventos sociais, interação e intercâmbio
- Evento científico de excelente qualidade

Indução da Ovulação
Preservação da Fertilidade
Gestação Múltipla
Vitrificação de Óvulos e Embriões
Genética e Biologia Biomolecular
Os Registros Internacionais de Reprodução Assistida

**Participe você também
dessa evolução**

Informações e inscrições:
info@redlara.com

Realização

Apoio



Schering
Plough

Conheça a Red-Lara www.redlara.com

Editorial
Quality in ART : an improved overall result for a minimal overall cost.

Erik Van Royen

10

Artigo Original
Avaliação do desenvolvimento *in vitro* de embriões humanos após cultivo em microambiente.

Condesmar Marcondes de Oliveira Filho, Carlos Gilberto, Almodin, Vânia Cibele Minguetti-Câmara, Márcia Sister Campos Angélica Pupin Schiavon, Fernanda Carolina Fachini

11

What's the signification of nuclear vacuoles in human sperm?

JG Franco Jr, RLR Baruffi, AL Mauri, CG Petersen, JBA Oliveira, L Vagnini

16

Vitrificação em modelos bovinos: modelo de treinamento

Carlos Gilberto Almodin, Vania Cibele Minguetti-Câmara, Leonardo Matutino Oliveira, Milena Brandão Seko, Isabelle Emanuelle Picada, Antonio Fernandes Moron

20

Artigo de Opinião
Conhecendo a realidade da reprodução assistida no Brasil

Marilena C. D. V. Corrêa

24

Resultados REDE Brasil: um comentário

José Gonçalves Franco Jr

25

Artigo de Atualização
Importância do espermatozóide no desenvolvimento embrionário pré-implantacional

Thiago Plácido, Christiany Victor Locambo, Alessandro Schuffner

26

Aspectos imunológicos da falência ovariana prematura.

Érica Becker de Sousa Xavier, Ana Márcia de Miranda Cota, Renata Costa, Mário Moreira Murta, Leonardo Augusto Meyer de Moraes, João Pedro Junqueira Caetano

33

Eventos

40

Quality in ART : an improved overall result for a minimal overall cost.

Erik Van Royen

Fertility Clinic, Department of Obstetrics-Gynaecology-Fertility, Middelheim Hospital.Belgium

In Europe we have witnessed in recent years the introduction of quality related measures in society in general and in ART more specifically. In countries with a highly developed social security system such as the Scandinavian countries the authorities are concerned about the costs created by early births as a consequence of multiple pregnancy after ART. A therapy that leads to such high extra cost is considered by health economists as lacking in quality.

In our country, Belgium, several laws have been passed to optimise spending of public funds by the authorities. In women below the age of 36 only single embryo transfer is allowed in the first cycle. In the second cycle double embryo transfer is only allowed "if no good quality embryo is available". In further cycles 2 embryos is the maximum below the age of 36. In women between 36 and 40 years of age double embryo transfer is allowed in the first and second and maximum 3ET in the following cycles. For women over 40 years of age there is no limit. In cryo transfers a maximum of DET is imposed for all ages. This law dating from July 2003 in return provided reimbursement of all lab related costs for 6 cycles during a woman's life time.

More recently a new law specifies that all cryo preserved embryos should first be thawed and transferred before a fresh cycle can be started.

We also have seen limitations of the amount of FSH that can be used per fresh IVF/ICSI cycle and also of the application of FSH in IUI cycles.

Will this evolution lead to lower pregnancy results? Not necessarily if we can select the embryo with the highest implantation potential. In our centre we had a multiple pregnancy rate of 43% in 1996. In 1997 started the gradual introduction of SET. In 2007 69% of all transfers was SET and we had a life birth rate of 35% while twinning rate was 7%. In the last 3 years twinning was below 10% and during the last 5 years there was no triplet pregnancy. All of this was accomplished without high tech and with day 3 transfer.

In general we are moving from an unregulated to a more strictly regulated situation aiming at a higher level of quality. Quality meaning an improved overall result for a minimal overall cost. This seems to be an unavoidable evolution and we think it is wise to follow and contribute to it in order to be prepared for the future.

Endereço: Lindendreef 1, 2020 Antwerp, Belgium
Email: eric.van.royen@pandora.be

Avaliação do desenvolvimento *in vitro* de embriões humanos após cultivo em microambiente.

Embryo development in vitro in microenvironment culture

Condesmar Marcondes de Oliveira Filho
Carlos Gilberto Almodin
Vânia Cibeles Minguetti-Câmara
Márcia Sister Campos
Angélica Pupin Schiavon
Fernanda Carolina Fachini

Núcleo Santista de Reprodução Humana

RESUMO

Objetivo: O objetivo desse estudo foi avaliar as taxas de formação de blastocisto e gravidez após cultivo embrionário no sistema WOW, que consiste em um microambiente obtido através de "microfuros" sobre a cavidade de uma placa de cultura.

Metodologia: O presente estudo foi realizado em 14 pacientes entre 20 a 43 anos, que se submeteram ao tratamento por fertilização *in-vitro*. Os embriões foram cultivados em placas WOW até o dia 5 de desenvolvimento (d5). A transferência foi realizada no dia 3 (d3) ou no dia 5 (d5) de desenvolvimento ou em ambos.

Resultados: Dos 112 embriões obtidos, 28 foram transferidos no d3 e 84 colocados em cultivo até o d5, sendo que 21 tornaram-se blastocistos (25%). Das 14 pacientes, 11 tiveram transferência dos embriões classes I e II no d3, permanecendo o restante de seus embriões em cultivo até o d5 e as outras 3 pacientes tiveram transferência apenas no d5. Das 11 pacientes que tiveram transferência no d3, 7 também tiveram blastocistos transferidos no d5 (64%). Então, das 14 pacientes do estudo, 10 tiveram blastocistos para serem transferidos, e um total de 8 pacientes engravidaram (57%).

Discussão: A taxa de gravidez obtida no presente estudo demonstra que o sistema WOW parece uma alternativa promissora para o desenvolvimento *in vitro* de embriões. O efeito pode ser explicado devido à quantidade de meio extremamente baixa em torno do embrião, permitindo ao embrião manter seu próprio microambiente, com a manifestação eficiente de fatores autócrinos e parácrinos.

Palavras-chave: sistema WOW, cultivo de embriões, blastocistos.

ABSTRACT

Objective: The objective of this study was to assess blastocyst development and pregnancy rates after embryo culture in the WOW system, which consists of a microenvironment obtained through "micro-holes" on a culture dish cavity.

Methodology: The present study was carried out in 14 patients aged between 20 and 43 years that were submitted to *in-vitro* fertilization treatment. The embryos were cultured in WOW dishes until day 5 of their development (d5). Transfer was carried out on day 3 (d3), on day 5, or on both days.

Results: From 112 embryos obtained, 28 were transferred on d3, and 84 placed in culture medium until d5, of which 25 became blastocysts (25%). From 14 patients, 11 had classes I and II embryos transferred on d3, and their remaining embryos staying in culture until d5. The other 3 patients had embryos transferred only on d5. From the 11 patients that received the embryos on d3, 7 also had blastocysts transferred on d5 (64%). Therefore, from the 14 patients in the study, 10 received blastocysts, and a total of 8 patients got pregnant (57%).

Discussion: The pregnancy rate obtained in this study demonstrates that the WOW system seems to be a promising alternative for the development of *in-vitro* embryos. The positive effect may be explained by the extremely low amount of medium around the embryo, allowing the embryo to keep its own environment with an efficient manifestation of autocrine and paracrine factors.

Keywords: WOW system; embryo culture; blastocysts.

INTRODUÇÃO

A taxa de sucesso na fertilização *in-vitro* está diretamente ligada a muitas variáveis tais como: protocolo de indução, qualidade oocitária, qualidade do cultivo embrionário, habilidade no manuseio de gametas e embriões e também à receptividade endometrial (Mahadevan, 1998). Os meios de cultivo sem dúvida tiveram alterações intensas, com mudanças e incremento de sais e componentes químicos (Gardner, 1998). Estas alterações possibilitaram a manutenção de embriões por mais tempo em incubadora, possibilitando o desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos (Gardner e Lane, 1998; Murakami et

al., 2004). Recentemente há relatos de não haver diferença na taxa de gestação nas pacientes com idade inferior a 35 anos que recebem um ou dois blastocistos. Porém, a taxa de gemelaridade nestas pacientes aumenta substancialmente. Estes mesmos autores preconizam a transferência de somente um blastocisto para este grupo de pacientes e dois blastocistos para aquelas com idade superior a 35 anos (Kalu *et al.*, 2008; Beesley *et al.*, 2008).

A grande maioria dos embriões humanos concebidos através de fertilização *in-vitro* são rotineiramente transferidos para o útero no dia 2 ou 3, no estágio de desenvolvimento de 4 a 8 células, com taxas de implantação de 10 a 20% normalmente publicadas. Como *in-vivo* os embriões nessa fase de desenvolvimento residem na tuba uterina, entrando no útero somente após compactação, sendo provável que a exposição prematura de embriões em estágio de clivagem no útero comprometa o desenvolvimento e a viabilidade do mesmo (Bavister, 1995).

O cultivo de embriões até a fase de blastocistos leva a melhor seleção embrionária, com maior probabilidade de implantação e melhor sincronismo endometrial (Toledo *et al.*, 2000; Gardner *et al.*, 2000; Cruz *et al.*, 1999; Dickey e Pyrzak, 1999). A maioria dos autores concorda que a transferência em fase de blastocisto pode diminuir a taxa de gestação múltipla e aumentar a taxa de implantação e gestação (Hernandes, 2001; Plachot *et al.*, 2000).

Estudos prévios confirmam que tanto meios sequenciais como co-cultivo podem suportar a cultura embrionária até o estágio de blastocisto ((d'Estaing *et al.*, 2001). Os meios sequenciais satisfazem quanto aos requerimentos nutricionais critério-específico para a formação de blastocistos (Gardner e Lane, 1997). O co-cultivo com células somáticas parece ter efeitos benéficos sobre o desenvolvimento embrionário. O mecanismo de ação pelo qual a co-cultura melhora o desenvolvimento dos embriões é ainda especulativo, mas inclui a possibilidade de remoção de substâncias tóxicas do meio como íons-metais pesados e radicais livres, e a secreção de substâncias embriotróficas como os fatores de crescimento. Apesar da importância dos fatores de crescimento para o embrião ter sido comprovada pela presença de receptores sobre o trofotoderma, não se tem encontrado diferenças nas taxas de gravidez após co-cultivo (Ménézo *et al.*, 1990; Kauma *et al.*, 1995). A utilização de meios sequenciais sem os possíveis efeitos do co-cultivo tem levado a taxas semelhantes (Sakkas *et al.*, 1994, Cohen *et al.*, 1990; d'Estaing *et al.*, 2001).

Na tentativa de melhorar as condições de cultura até o estágio de blastocisto, foi analisado um sistema que mantém a possível atuação dos fatores de crescimento, sem a utilização do co-cultivo. Pois a gota de 20 a 40ul usada tradicionalmente para cultivo dos embriões é grande demais para ter a manifestação eficiente de fatores autócrinos e parácrinos e volumes menores teriam o acúmulo de substâncias tóxicas. O objetivo desse estudo foi avaliar as taxas de formação de blastocisto e gravidez após cultivo embrionário no sistema WOW, que consiste em um microambiente obtido através de "microfuros" sobre a cavidade de uma placa de cultura. Este sistema de cultivo tem sido utilizado por Vajta e colaboradores no cultivo de embriões bovinos, com grande sucesso (Vajta *et al.*, 2000).

MATERIAL E MÉTODOS

Após aprovação pelo comitê de ética do Núcleo de Reprodução Assistida e Hospital Almodin Ltda e consentimento esclarecido e informado, 14 pacientes foram incluídas aleatoriamente neste estudo. As pacientes tinham entre 22 a 42 anos de idade e as causas de infertilidade observadas enquadrava-se em cinco fatores: infertilidade masculina, infertilidade tubária, múltiplas causas, outras somente femininas e não explicadas.

Após rotina básica de propeidética as pacientes iniciaram uso de contraceptivo oral contendo 0,15 mg de desogestrel e 0,03 mg de etinilestradiol (Microdiol®, Organon) diariamente no início do ciclo por no mínimo 19 dias. Para realizar o bloqueio hipofisário foi utilizado acetato de leuprolide (Lupron®, Abbot), como agonista de GnRH, através de aplicações subcutânea, a cada 24 (vinte e quatro) horas, iniciada quando faltavam entre 3 (três) a 8 (oito) dias para o término do uso do contraceptivo e era mantido até o dia do HCG. Após suspensão do anticoncepcional e uso contínuo do agonista de GnRH as pacientes realizam ecografia transvaginal entre o segundo e quarto dia do ciclo menstrual. O estímulo ovariano foi iniciado com FSH recombinante (Gonal®, Serono) ou urinário (Merional®, Meizler), em dose que variou de 150 a 300UI/dia, a critério clínico, entre 18 (dezoito) e 20 (vinte) horas por no mínimo 7 (sete) dias. Nova ecografia era realizada no oitavo dia de estímulo e iniciado uso de hMG (Merional®, Meizler) suspendendo, então, o FSH. Novas ecografias foram realizadas a cada 24h ou 48h e quando 1 (um) ou mais folículos apresentavam diâmetro médio maior ou igual a 18mm, administrava-se hCG, 10.000UI (Choriomon®, Meizler) em média 36 h antes da captação dos oócitos.

A captação era realizada com sedação em regime ambulatorial. Três a quatro horas após a captação os oócitos eram desnudados, com pipetas afiladas em diâmetros diferentes, passando primeiramente pela solução de hialuronidase (no máximo 1 minuto), posteriormente por 5 banhos de GV-HEPES (Ingamed-Brasil) com 10% SSS (Substituto de Soro Sintético) e eram colocados em placas de quatro cavidades com meio de cultivo GV (Ingamed-Brasil) com 10% de SSS onde os oócitos permaneciam até a micromanipulação de gametas.

Quatro a cinco horas após a captação era realizada a micromanipulação. A placa era preparada com uma gota central com 5µl PVP acrescentado de 1µl da suspensão com os espermatozoides e várias gotas de 5µl em torno com HTF-HEPES com 10% SSS no grupo 1 ou GV-HEPES com 10% SSS no grupo 2 onde foram colocados os oócitos, sob óleo. Os espermatozoides, na solução de PVP, foram imobilizados pela cauda e aspirados com a pipeta de microinjeção, passando-os para a gota com o oócito, que era então fixado com a pipeta holding de modo que o corpúsculo polar ficava às 12 ou às 6 horas. A pipeta de injeção, introduzida no ovócito às 3 horas e uma pequena sucção do citoplasma, feita de modo a assegurar a injeção do espermatozoide dentro do citoplasma. Depois da micromanipulação foram colocados individualmente em placas WOW (Ingamed-Brasil) em 400 µl de meio GV com 10% de SSS onde permanecia por três dias. No terceiro dia após avaliação era feita a transferência de 2 embriões e o restante era colocado em placas WOW com 400

μl de meio GVblast (Ingamed-Brasil) onde permaneciam por mais dois dias. Quando se tinha blastocistos era feita nova transferência de no máximo dois embriões. Nos casos de haver excedente, estes eram vitrificados pelo método Vitri-Ingá (Ingamed-Brasil).

O suporte de fase lútea foi iniciado na noite da captação, utilizando progesterona micronizada (Utrogestan®, Farmaquímica), 200mg, intravaginal, a cada 8 horas.

A dosagem do β-hCG (gonadotrofina coriônica subunidade de Beta) foi realizada no 14º dia após a transferência dos embriões. Foi considerada gravidez as pacientes com hCG acima de 50 mUI/ml. A taxa de implantação foi definida somente após batimento cardíaco presentes ao redor da 13ª semana pós-transferência.

RESULTADOS

Dos 112 embriões obtidos, 28 foram transferidos no dia 3 de desenvolvimento e 84 colocados em cultivo até o dia 5 de desenvolvimento. Dos 112 embriões obtidos, 31 tinham de 6 a 8 células e eram classe I ou II (segundo RedLara). Dos 84 embriões deixados em cultivo até o dia 5, 21 tornaram-se blastocistos (25%) sendo transferidos. Das 14 pacientes, 11 tiveram transferência dos embriões classes I e II no dia 3, permanecendo o restante de seus embriões em cultivo até o dia 5 e as outras 3 pacientes tiveram transferência apenas no dia 5. Das 11 pacientes que tiveram transferência no dia 3, 7 também tiveram blastocistos transferidos no dia 5 (64%). Das 14 pacientes do estudo, 10 tiveram blastocistos para serem transferidos (71%), e um total de 8 pacientes engravidaram (57%) (Tabela 1)

DISCUSSÃO

Já é bem estabelecido que a taxa de embriões por volume de meio de cultura é um fator muito importante durante cultivo *in vitro* (Larson e Kubisch, 1999; Lane e Gardner, 2000). Essa constatação levou ao desenvolvimento *in vitro* de embriões humanos em micro-gotas e no caso de embriões bovinos se faz o cultivo com um número grande de embriões, o que é inviável no caso de embriões humanos, pois o número de embriões, por paciente, que se obtém normalmente é pequeno. Entretanto, a tradicional gota de 20 a 40 μl, usada para cultivo dos embriões humanos parece grande demais para se ter a manifestação eficiente de fatores autócrinos e parácrinos e volumes menores teriam o acúmulo de substâncias tóxicas incluindo amônia e radicais livres. No sistema de gotas, além dos materiais solúveis lipídicos do desenvolvimento embrionário serem diluídos, eles também, podem ser absorvidos pelo óleo mineral sobre as gotas. Em estudos sobre densidade de embriões bovinos foi sugerido que a proporção adequada de embriões para 1 μl de meio de cultura seria de "1:1" ou "2:1". (Palasz e Thundathil, 1998) e camundongos (Kato e Tsunoda, 1994; Thouas *et al.*, 2003)

A taxa de gravidez obtida no presente estudo demonstra que o sistema WOW parece uma alternativa promissora para o desenvolvimento *in vitro* de embriões humanos. O efeito pode ser explicado devido à quantidade de meio extremamente baixa em torno do embrião, permitindo uma concentração ideal de fatores embriotróficos circundando o embrião, criando seu próprio microambiente. Fatores embriotróficos têm sido descritos previamente

Tabela 1. Desenvolvimento embrionário em placa WOW.

	Quantidade	Taxa (%)
Idade (média ± DP)	33,5 ± 6,12	
Total de pacientes	14	100
Pacientes com transferência D 3	5	36
Pacientes com transferência D 5	3	21
Pacientes com transferência D3 e D5	6	43
Embriões formados	112	100
Embriões de 6 a 8 células classe I e classe II	42	37
Embriões transferidos D 3	28	25
Embriões em cultivo até D 5	84	75
Blastocistos formados e transferidos	21	25
Taxa de gravidez	8	57

(O'Niel, 1998). Recentes estudos dão evidências que secreção ativa de fatores no meio de cultura por blastocistos de camundongo ocorre e pode influenciar a regulação de desenvolvimento (Diaz-Cueto *et al.*, 2000). Além disso, tem sido sugerido que enzimas proteolíticas secretadas pelo embrião e acumuladas em torno desse teriam um papel importante no afinamento da zona pelúcida de embriões de camundongos (Perona e Wassarman, 1986; Sawada *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1997) e de embriões humanos (Bongso e Fong, 1993).

O sistema WOW já foi testado em embriões bovinos, levando à obtenção de embriões de melhor qualidade. Vajta *et al.* (2000) mostraram que a taxa de blastocistos bovinos foi aumentada pelo sistema WOW. Já, Pereira e colaboradores (2005) não encontraram diferenças no desenvolvimento a blastocisto após cultivaram embriões bovinos em grupos e individualmente, em gotas e no sistema WOW. Entretanto, os embriões cultivados no sistema WOW forneceram embriões de melhor qualidade, isso mensurado pela sobrevida após a vitrificação (Pereira *et al.*, 2005).

Estudo semelhante foi realizado em embriões de porco, avaliando-se 4 diferentes sistemas de cultura (gota, cavidade com 0,5 ml de meio de cultivo e dois tamanhos diferentes de WOW (500 e 1000 μm)). O desenvolvimento a blastocisto usando o sistema WOW com 1000 μm foi significativamente maior que com os outros sistemas de cultura, indicando que o microambiente criado melhorou a produção de blastocistos de ovócitos de porco maturados *in vitro* após ICSI, mas que a eficiência do sistema depende do diâmetro da placa WOW (Taka *et al.*, 2005). O sistema WOW representa uma mudança nas características físicas do ambiente de cultura. Outros sistemas têm sido sugeridos baseados em métodos de microcultura, levando em conta a densidade de embriões no meio de cultura. Thouas *et al.* (2003) cultivaram zigotos de camundongos em pares até o estágio de blastocisto em 1

ul na abertura final de capilares de vidro. Eles verificaram que os blastocistos cultivados nesse sistema continham mais células que os blastocistos cultivados nas microgotas padrão. Este estudo, portanto, demonstra que um volume de 1 ul é suficiente para suportar o desenvolvimento de zigoto a blastocisto. Entretanto, existem autores que sugerem que o desenvolvimento em volumes menores que 10 ul de meio seria comprometido pelo acúmulo de substâncias tóxicas incluindo amônia e radicais livres (Carolan *et al.*, 1996; Sinclair *et al.*, 1997; Johnson e Nasr-Esfahani, 1994). O sistema WOW foi sugerido tentando evitar esse tipo de problema, pois permite, através de sua condição de abertura, a diluição de substâncias tóxicas originárias do metabolismo do embrião.

Com a melhoria recente dos meios de cultivos tem havido relatos de taxas de 50% de obtenção de blastocistos expandidos (Shapiro *et al.*, 2007). Entretanto, como uma grande parte dos embriões humanos fazem bloqueio espécie-específico em 8 células, a maioria dos serviços tem receio de manter os embriões em cultivo até o quinto dia pós-fertilização. Acontece com frequência que grande parte das pacientes que tem seus embriões cultivados até o dia 5 de desenvolvimento podem não ter blastocistos a serem transferidos mesmo com o uso de meios sequenciais ou co-cultivo (Almodin *et al.*, 2001). Neste estudo houve transferência de embriões tanto no dia 3 como no dia 5 de desenvolvimento, com o intuito de não comprometer o tratamento das pacientes. Setenta e um por cento das pacientes tiveram blastocistos a serem transferidos no dia 5, o que leva a acreditar na eficiência do sistema. Apesar da taxa de gravidez bastante satisfatória (57%), a taxa de formação de blastocisto não pareceu muito significativa. Entretanto deve-se levar em consideração que os embriões classes I e II foram transferidos no dia 3 de desenvolvimento. Além disso, os embriões foram cultivados mesmo até o dia 3 também nas placas WOW, o que pode ter influenciado na grande quantidade de embriões classe I e II obtidas no estudo. Os resultados, portanto estão em acordo com os excelentes resultados obtidos com modelos animais com o uso do sistema WOW, demonstrando que o sistema pode melhorar o desenvolvimento embrionário *in-vitro*. Porém, faz-se necessário estudo multicêntrico com maior número de pacientes para melhor avaliação.

Referências bibliográficas

- Almodin C.G., Câmara V.C.M., Pereira L.A.C. Cultura de embriões até o estágio de blastocisto: Comparação entre o uso de meios sequenciais e de co-cultura. JBRs, 23(9):589-595, 2001.
- Bavister B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. Hum. Reprod. Update, 1: 91-148, 1995.
- Beesley R., Robinson R., Propst A., Arthur N., Retzlöff M. Impact of day 3 or day 5 embryo transfer on pregnancy rates and multiple gestations. Fertil. Steril., 2008 Apr 4.
- Bongso A., Fong C.Y. The effect of coculture on human zygote development. Current Opinion in Obstetrics and Gynecology, 5: 585-593, 1993.
- Carolan C., Lonergan P., Kathir H., Mermillod P. *In vitro* production of bovine embryos using individual oocytes. Molecular Reproduction and Development, 45: 145-150, 1996.
- Cohen J., Elsner C., Kort H., Malter H., Massey J., Mayer M.P., Wiemer K. Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement by assisting hatching using micromanipulation. Hum. Reprod., 5: 7-13, 1990.
- Cruz J.R., Dubey A.K., Patel J., Peak D., Hartog B., Gindoff P.R. Is blastocyst transfer useful as an alternative treatment for patients with multiple *in vitro* fertilization failures? Fertil. Steril., 72: 218-220, 1999.
- Diaz-Cueto L., Stein P., Jacobs A., Schultz R. M. Gerton G. L. Modulation of mouse preimplantation embryo development by acrogranin (epithelin/granulin precursor). Developmental Biology, 217: 406-418, 2000.
- Dickey R.P., Pyrzak R. Extraordinary implantation rates with fresh blastocyst transfer: better culture conditions or selection of the best patients? Hum. Reprod., 14: 2178-2180, 1999.
- D'Estaing S.G., Lornage J., Hadj S., Boulieu D., Salle B., Guerin J. Comparison of two blastocyst culture systems: coculture on Vero cells and sequential media. Fertil. Steril., 76: 1032-1035, 2001.
- Gardner D.K. Development of serum-free media for the culture and transfer of human blastocysts. Hum. Reprod., 13 Suppl 4: 218-225, 1998.
- Gardner D.K., Lane M. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? Hum. Reprod. Update 3: 367-382, 1997.
- Gardner D.K., Lane M. Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. Hum. Reprod. 13 Suppl 3: 148-159, 1998.
- Gardner D.K., Lane M., Stevens J., Schlenker T., Schoolcraft W.B. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. Fertil. Steril., 73: 1155-1158, 2000.
- Hernandez E.R. Avoiding multiple pregnancies: sailing uncharted seas. Hum. Reprod. 16: 615-616, 2001.
- Johnson M. H., Nasr-Esfahani M.H. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryo development *in vitro*. BioEssays, 16: 31-38, 1994.
- Kalu E., Thum M.Y., Abdalla H. Reducing multiple pregnancy in assisted reproduction technology: towards a policy of single blastocyst transfer in younger women. BJOG 2008 Jun 2.
- Kato Y., Tsunoda Y. Effects of the culture density of mouse zygotes on the development *in vitro* and *in vivo*. Theriogenology, 41: 1315-1322, 1994.
- Kauma S.W., Matt D.W. Coculture cells that express leukemia inhibitory factor (LIF) enhance mouse blastocyst development *in vitro*. J. Assist. Reprod. Genet., 12: 153-156, 1995.
- Larson M. A., Kubisch H. M. The effects of group size on development and interferon-tau secretion by *in vitro* fertilized and cultures bovine blastocysts. Human Reproduction, 14: 2075-2079, 1999.
- Lee D. R., Lee J.E., Yoon H.S., Lee H. J. Kim M.K., Rosh S. I. The supplementation of culture medium with protease improves the hatching rate of mouse embryos. Human Reproduction, 12: 2493-2498, 1997.
- Mahadevan M.M. Optimization of culture conditions for human *in vitro* fertilization and embryo transfer. Semin. Reprod. Endocrinol. 16: 197-208, 1998.
- Ménézo Y., Guérin J.F., Czyba J.C. Improvement of human early embryo development *in vitro* by co-culture on monolayers of Vero cells. Biol. Reprod., 42: 301-306, 1990.
- Murakami M., Otoi T., Karja N.W., Wongsrikeao P., Agung B., Suzuki T. Blastocysts derived from *in vitro*-fertilized cat oocytes after vitrification and dilution with sucrose. Cryobiology, 48: 341-348, 2004.
- O'Neill C. Autocrine mediators are required to act on the embryo by the 2-cell stage to promote normal development and survival of mouse preimplantation embryos *in vitro*. Biology of Reproduction, 58: 1303-1309, 1998.
- Palasz A. T., Thundathil J. The effect of volume of culture medium and embryo density on *in vitro* development of bovine embryos. Theriogenology, 49: 212 (abstract), 1998.

Pereira D.C., Dode M.A.N., Rumpf R. - Evaluation of different culture systems on the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*, 63:1131-1141, 2005.

Perona R. M., Wassarman P. M. Mouse blastocysts hatch *in vitro* by using a trypsin-like proteinase associated with cells of mural trophoctoderm. *Development Biology*, 114:42-52, 1986.

Plachot M., Belaisch-Allart J., Mayenga J.M., Chouraqui A., Serkine A.M., Tesquier L. Blastocyst stage transfer: the real benefits compared with early embryo transfer. *Hum. Reprod.*, 15 Suppl 6: 24-30, 2000.

Sakkas D., Jacquenoud N., Leppens G., Campana A. Comparison of results after *in vitro* fertilized human embryos are cultured in routine medium and in co-culture on Vero cells: a randomized study. *Fertil. Steril.*, 61: 521-525, 1994.

Sawada H., Yamazaki K., Hoshi M. Trypsin-like hatching protease from mouse embryos: evidence for the presence in culture medium and its enzymatic properties. *Journal of Experimental Zoology*, 254:83-87, 1990

Sinclair K. D., Maxfield E. K., Robinson J. J. *et al.* Culture of sheep zygotes can alter fetal growth and development. *Theriogenology*, 47:380, 1997.

Shapiro B.S., Daneshmand S.T., Garner F.C., Aguirre M., Thomas S. Large blastocyst diameter, early blastulation, and low preovulatory serum progesterone are dominant predic-

tors of clinical pregnancy in fresh autologous cycles. *Fertil. Steril.*, 2007 Sep 28.

Taka M., Iwayama H., Fukui Y. - Effect of the well of the well (WOW) system on *in vitro* culture for porcine embryos after intracytoplasmic sperm injection. *J.Reprod. Development.*, 51:533-537, 2005.

Thouas G.A., Jones G.M., Trounson A.O. The "GO" system - a novel method of microculture for *in vitro* development of mouse zygotes to the blastocyst stage. *Reproduction*, 126:161-169, 2003.

Toledo A.A., Wright G., Jones A.E., Smith S.S., Johnson-Ward J., Brockman W.W., Ng F., Wininger J.D. Blastocyst transfer: a useful tool for reduction of high-order multiple gestations in a human assisted reproduction program. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 183:377-379, 2000.

Vajta G., Peura T.T., Holm P., Páldi A., Greve T., Trounson A.O. *et al.* New method for culture of zone-included or zona-free embryos: the well of the well (WOW) system. *Mol. Reprod. Dev.*, 55:256-264, 2000.

Correspondência:
Carlos Gilberto Almodin
Av. XV de Novembro, 1232
E-mail: almodin@materbaby.com.br
Fone: (44) 3224-3992
Maringá - Pr
CEP: 87.013-230

2009 Congresso Brasileiro De Reprodução Assistida

Agosto de 2009 Curitiba, PR

What's the signification of nuclear vacuoles in human sperm?

Qual é o significado dos vacúolos nucleares no espermatozóide humano?

JG Franco Jr^{1,2}, RLR Baruffi¹, AL Mauri¹, CG Petersen^{1,3}, JBA Oliveira¹, L Vagnini⁴

¹Centro de Reprodução Humana Prof Franco Jr - Ribeirão Preto, SP, Brasil

²Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita - UNESP – Botucatu, SP, Brasil

³Pós-graduando, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita - UNESP – Botucatu, SP, Brasil

⁴CPDP – Centro Paulista de Diagnóstico e Pesquisa – Ribeirão Preto, SP, Brazil.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the extent of DNA fragmentation and the presence of single/denatured or double stranded of DNA in sperm with large nuclear vacuoles (LNV) selected by high-magnification. A total of 30 patients had fresh semen samples prepared by discontinuous concentration gradient. Sperm with normal nucleus (NN) and LNV were selected at 8400x magnification and placed in different slides. DNA fragmentation was determined by TUNEL assay. Denatured and double stranded DNA was identified by acridine orange fluorescence method. The percentage of DNA fragmentation in LNV sperm (29%) was significantly higher ($P < 0.001$) than NN sperm (15.8%). Therefore, cleavage of genomic DNA in low molecular weight DNA fragments (mono and oligonucleosomes), and single strand breaks (nicks) in high molecular weight DNA occur more frequently in LNV. Identically, the percentage denatured stranded DNA in sperm with LNV (67.9%) was significantly higher ($P < 0.0001$) than NN sperm (33%). The high level of denatured DNA in sperm with LNV suggests precocious decondensation and disaggregation of sperm chromatin fibers. Our results support an association between LNV sperm and DNA damage, and the routine selection and injection of morphological motile sperm at high magnification for ICSI. The adverse effect (DNA fragmentation or denaturation) leads to concern particularly about the possibility of iatrogenic transmission of genetic abnormalities.

Keywords: human sperm, nuclear vacuoles, ICSI, DNA fragmentation, denatured stranded DNA

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar a extensão da fragmentação do DNA e a presença de DNA dupla fita ou fita simples (desnaturada) em espermatozóides com vacúolos nucleares largos (VNL) selecionados pela microscopia de alta magnificação. Um total de 30 pacientes tiveram amostras de esperma fresco preparadas

por gradiente descontinuo. Os espermatozóides com núcleo normal (NN) e com VNL foram selecionados a magnificação de 8400x e colocados em laminais diferentes. A fragmentação do DNA foi determinada através do método do TUNEL. O DNA desnaturado (fita simples) e o dupla fita foram identificados pelo método de acridina orange. O percentual de fragmentação do DNA nos espermatozóides VNL (29%) foi significativamente maior ($p < 0.001$) do que nos espermatozóides NN (15.8%). Dessa forma, a quebra do DNA genômico em fragmentos de baixo peso molecular (mono e oligonucleossomos), e quebras em cadeia única (nicks) em DNA com alto peso molecular ocorre mais frequentemente no espermatozóide com VNL. Igualmente, a percentagem de cadeia desnaturada de DNA (fita simples) em espermatozóides com VNL (67.9%) foi significativamente maior ($p < 0.0001$) que em espermatozóides NN (33%). O alto nível de DNA desnaturado em espermatozóides com VNL sugere descondensação e desagregação precoce das fibras da cromatina espermática. Nossos resultados indicam uma associação entre o espermatozóide com VNL e dano no DNA, além de substantiar o uso da alta magnificação na seleção e injeção dos espermatozóides para ICSI.

Palavras-chave: esperma humano, vacúolos nucleares, ICSI, DNA fragmentação, cadeia desnaturada de DNA

INTRODUCTION

It is known that IVF/ICSI is associated with increased (although relatively low) risk of birth defects and genetic and epigenetic abnormalities in children. To date, it is unclear whether the ICSI procedure or the underlying infertility is responsible for these defects (Cox et al., 2002; Hansen et al., 2002; Ludwig et al., 2005). The risk of birth defects (major and minor) was found to be significantly higher (odds ratio ~ 1.5) in children conceived by IVF/ICSI than in those naturally conceived. The prevalence of chromosomal abnormalities (de novo abnormalities) was found to be significantly higher (1.6%/0.5%) in children conceived by ICSI than naturally (Bonduelle et al, 1998). Epigenetics abnormalities, such as errors in DNA methylation,

have been linked to certain rare genetic diseases (Beckwith/Wiedmann and Angelman's syndromes) and, while still rare, are found in slightly more prevalent in children conceived by IVF/ICSI than naturally (Maher et al., 2003).

Successful human reproduction depends in part on the inherent integrity of sperm DNA. There appears to be a DNA damage threshold beyond which embryo development and subsequent pregnancy outcome are impaired. Clinical evidence now shows that sperm DNA damage is detrimental to reproductive outcomes and that spermatozoa of infertile men possess substantially more DNA damage than do the spermatozoa of fertile men. However, our understanding of the causes of sperm DNA damage and the full impact of this sperm defect on reproductive outcomes in human remains undeveloped (Zini and Libman, 2006).

A specific sperm nuclear alteration is the presence of large vacuoles. Ultramorphological investigation has revealed that this sperm malformation has a clear negative association with natural male fertility potential (Bartoov et al., 1994; Mundy et al., 1994). According to Bartoov et al. (2002) selection of morphological motile sperm at high magnification (MSOME) is the only method to precisely detect large nuclear vacuoles in human sperm for ICSI. Berkovitz et al. (2006a) observed that microinjection sperm (IMSI) with a normal nuclear shape but large vacuoles affects ICSI pregnancy outcome (reduce pregnancy rate and increases early abortion). However, the mechanism behind why large vacuoles impair late embryonic development is not clear. The aim of this study was to determine the presence or absence of DNA damage in sperm with large nuclear vacuoles (LNV) selected by high-magnification and submitted to DNA fragmentation analysis and the presence of denatured/single stranded of DNA by acridine orange fluorescence (AOF).

MATERIALS AND METHODS

Study participants and sperm preparation

Fresh semen samples (one per subject) from 30 patients in an unselected group of couples undergoing infertility investigation and treatment at the Center for Human Reproduction Prof. Franco Junior were prepared by Isolate (Irvine Scientific, USA) discontinuous concentration gradient. The final pellet was resuspended in 0.2 ml modified HTF medium (Irvine). An aliquot of 1 µl of sperm cell suspension was transferred to a 5 µl microdroplet of modified HTF medium containing 8% polyvinyl pyrrolidone solution (PVP medium Irvine Scientific-USA). This microdroplet was placed in a sterile glass dish (FluoroDish™-Word Precision Instrument, USA) under sterile paraffin oil (Ovoil-100, Vitrolife, Goteborg, Sweden). The sperm cells, suspended in the microdroplet were placed on a microscope stage above an Uplan Apo x100 oil/1.35 objective lens previously covered by a droplet of immersion oil. In this way, suspended motile sperm cells in the observation droplet could be examined at high-magnification by the inverted microscope (Eclipse TE 2000 U Nikon, Japan) equipped with high-power differential interference contrast optics (DIC/Nomarski). The total calculated magnification was x8400. Sperms with normal nucleus (NN) and sperms with LNV were selected using a micromanipulation system with angled glass micropipets and placed on different slides. Sperm

were smeared in a very small area, which was marked on the back of the slides with a glass pen to help find the sperm under the microscope. LNV sperm was defined by the presence of one or more vacuoles occupying $\geq 50\%$ of sperm head area.

Determination of DNA-fragmentation

DNA fragmentation in spermatozoa cells was measured using the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling (TUNEL) assay which was performed using a *In Situ* Cell Death Detection Kit with tetramethylrhodamine-labelled dUTP (Roche, Monza, Italy). TUNEL identifies single and double stranded DNA breaks by labelling the free 3'-OH termini with modified nucleotides in an enzymatic reaction with terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT). TdT catalyses the polymerization of labeled nucleotides to free 3'-OH DNA ends in a template-independent manner. Slides with selected sperm were air-dried and then fixed at 4°C in Carnoy's solution (methanol/glacial acetic acid, 3:1), and permeabilized with 0.1% Triton X-100 (VETEC Química Fina Ltd, Duque de Caxias, Brazil) in 0.1% sodium citrate at 4°C for 2 min. After washing with phosphate-buffered saline (PBS), the slides were then processed for TUNEL assay. The TdT-labelled nucleotide mix was added to each slide and incubated in the dark in a humidified atmosphere for 2 h at 37°C. After stopping the enzyme reaction, slides were rinsed twice in PBS and then counterstained with Vectashield® Mounting Medium with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole 1.5 µg/ml) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). The final evaluation was realized using a fluorescent microscope and the percentage of TUNEL positive spermatozoa determined. The number of cells per field stained with DAPI (blue) was first counted; in the same field the numbers of cells with red fluorescence (TUNEL positive) was expressed as a percentage of DNA fragmentation. Controls were included in every experiment: for negative control TdT was omitted in the nucleotide mix. Positive controls were generated by pre-incubating the fixed and permeabilized sperm cells using DNase I 1 mg/ml (New England Biolabs, Inc, Ipswich, MA, USA) for 30 min at 37°C. TUNEL labelling of positive controls varied between 89–98% of cells. The same technician, blinded to subject identity, performed all exams (Vagnini et al., 2007).

Determination of denatured/single or double stranded DNA by acridine orange fluorescence

Slides with selected sperm were air-dried and then fixed overnight at 4°C in Carnoy's solution (methanol/ glacial acetic acid, 3:1). After fixation, the slides were air-dried, stained with AOF staining solution for 5 min and then gently rinsed with distilled water. The AOF staining solution was prepared daily as follows: a mixture of 4 ml 0.1M citric acid and 0.25 ml 0.3M Na₂HPO₄·7H₂O, added to 1 ml 1% AOF stock solution in distilled water. AOF stock solution was stored in the dark at 4°C for 4 weeks. In order to reduce variation in fluorescence intensity, each stained slide was read immediately after washing. Sperm denatured/single or double stranded DNA was determined under a fluorescence microscope at x400 and x1000 magnification with 450–490 nm excitation. Sperm with double-stranded DNA were fluorescent green

and those with denatured or single stranded DNA were fluorescent red or yellow. The same technician, blinded to subject identity, performed all AOF procedures.

Sample size and statistical analysis

Sample size was calculated planning a comparison between two proportions control and experimental. Usually, DNA fragmentation and AOF assay both had abnormal values $\leq 30\%$ in the sperm of the fertile male population. Thus a sample size of 350 sperm in each group has a 80% power to detect an increase of 10% with a significance level α of 0.05 (two-tailed). Data were analyzed using InStat version 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) on a Macintosh computer (Apple Computer Inc., Cupertino, CA). The Fisher's exact test was used.

RESULTS

Table 1 and 2 show DNA fragmentation and denatured/double stranded DNA values in sperms with LNV and NN. The percentage of positive DNA fragmentation in LNV sperm was (29%=111/382) significantly higher ($P < 0.0001$) than NN sperm (15.8%=65/410). On the other hand, the percentage of denatured stranded DNA (67.9%=252/371) in LNV sperm was significantly higher ($P < 0.0001$) than in NN sperm (33%=117/354).

Table 1. DNA fragmentation values in sperm with LNV and NN.

DNA fragmentation	Sperm nucleus		
	Large vacuoles	Normal	TOTAL
Positive	111	65	176
Negative	271	345	616
TOTAL	382	410	792

$P < 0.0001$

Table 2. Denatured/double stranded DNA evaluated by AOF in sperm with LNV and NN.

AOF	Sperm nucleus		
	Large vacuoles	Normal	TOTAL
Denatured stranded DNA	252	117	369
Double stranded DNA	119	237	356
TOTAL	371	354	725

$P < 0.0001$

DISCUSSION

The accuracy with which morphological normality of spermatozoa for ICSI can be assessed depends on the resolution power of the optical magnification system. Conventionally, ICSI is performed with a x20/x40 objective, resulting in an overall optical magnification of x200 to x400 (De Vos et al., 2003). However, spermatozoa appearing as morphologically normal at this magnification may in fact carry various structural abnormalities that can only be detected with higher optical magnifications, sperm with vacuoles would be not detected in conventional ICSI (Hazout et al., 2006). This is a serious disadvantage, because microinjection of spermatozoa with vacuolated nuclei is clearly associated with low implantation and pregnancy rates, and with early abortion (Berkovitz et al., 2005, 2006a, 2006b). Berkovitz et al. (2006a) suggested

that vacuolization of the sperm nucleus reflects some underlying chromosomal or DNA defects but has not showed data confirming this hypothesis.

Evaluation of DNA damage by TUNEL was introduced by Gorczyca et al. (1993) to identify a population of spermatozoa in ejaculate that were believed to be apoptotic. Numerous other studies using the same technique have followed (Sun et al., 1997; Muratori et al., 2000) demonstrating that DNA fragmentation assessed by the TUNEL method was not associated with an apoptosis-like phenomenon in ejaculated spermatozoa and that DNA fragmentation should be considered a sign of defective sperm maturation which probably dates back to the time of DNA packaging. The TUNEL assay is usually described as the method for detecting real DNA damage and providing a direct measurement of DNA breaks in sperm (Li et al., 2006). The first part of our data shows that DNA fragmentation values were significantly higher in sperm nucleus with LNV. Therefore, cleavage of genomic DNA in low molecular weight DNA fragments (mono and oligonucleosomes), and single strand breaks (nicks) in high molecular weight DNA occur in sperm with LNV.

Acridine orange staining is an established cytochemical method for determining sperm DNA integrity, allowing the differentiation between normal, double-stranded and abnormal, denatured/single stranded DNA, using the metachromatic properties of the dye (Tejada et al., 1984). Some studies have shown that sperm denatured/single-stranded DNA, detected by AO staining, negatively affects the fertilization process in a classical IVF program (Liu et al., 1994, Hoshi et al., 1996). Increased denatured-stranded DNA in sperm of infertile men after density gradient is linked to results showing fewer embryos suitable for transfer and cryopreservation (Virant-Klun et al., 2002).

The second part of our data showed significantly more denatured DNA in sperm with LNV. This high level of denatured DNA in LNV could mean precocious decondensation and disaggregation of sperm chromatin fibers. Kosower et al. (1992) showed that the color of AOF of sperm nucleus after acetic alcohol treatment is determined by the thiol-disulfide status of DNA-associated protamines. An unwanted high degree of sperm decondensation (disruption of disulphide bridges/red acridine orange fluorescence) can result in asynchronous chromosome condensation and may lead to cytoplasmic fragments in the embryo (Ménézo et al., 2007).

CONCLUSION

Our results support an association between sperm with LNV and DNA damage and the routine use of MSOME/IMSI. The adverse effect (DNA fragmentation or denaturation) leads to concern particularly about the possibility of iatrogenic transmission of genetic abnormalities.

References

- Bartoov B, Eltes F, Pansky M, Langzam J, Reichart M, Soffer Y. Improved diagnosis of male fertility potential via a combination of quantitative ultramorphology and routine semen analysis. *Hum Reprod*, 9:2069-2075, 1994.
- Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezes Y, Barak Y. Relationship between human sperm subtle morphological characteristics and IVF- ICSI outcome. *J Androl*, 23: 1-8, 2002.

Berkovitz A, Eltes F, Yaari S, Katz N, Barr I, Fishman A, Bartoov B. The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Hum Reprod*, 20:185-190, 2005.

Berkovitz A, Eltes F, Ellenbogen A, Peer S, Feldberg D, Bartoov B. Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome? *Hum Reprod*, 21:1787-1790, 2006a.

Berkovitz A, Eltes F, Lederman H, Peer S, Ellenbogen A, Feldberg B, Bartoov B. How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection. *Reprod Biomed Online*, 12:634-638, 2006b.

Bonduelle M, Aytöz A, Van Assche, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Incidence of chromosomal aberrations in children born after assisted reproduction through intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 13:781-782, 1998.

Cox GF, Burger J, Lip V, Mau UA, Sperling K, Wu BL, Horsthemke B. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Gene* 71:162-164, 2002.

De Vos A, Van De Velde H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A. Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 79: 42-48, 2003.

Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to degeneration in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* 207:202-205, 1993.

Hansen M, Kurinczuk JJ, Bower C, Webb S. The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *N Engl J Med* 346:725-730, 2002.

Hazout A, Dumont-Hassan M, Junca AM, Cohen Bacrie P, Tesarik J. High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI. *Reprod Biomed Online*, 12:19-25, 2006.

Hoshi K, Katayose H, Yaganida K, Kimura Y, Sato A. The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. *Fertil Steril*, 66:634-639, 1996.

Kosower NS, Katayose H, Yanagimachi R. Thiol-Disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J Androl* 13:342-348, 1992.

Li Z, Wang L, Cai J, Huang H. Correlation of sperm DNA damage with IVF and ICSI outcomes: A systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet*, 23:367-376, 2006.

Liu DY, Baker HWG A new test for the assessment of sperm zona

pellucida penetration: Relationship with results of other sperm tests and fertilization in vitro. *Hum Reprod*, 9:489-496, 1994.

Ludwig M, Katalinic A, Gross S, Sutcliffe A, Varon R, Horsthemke B. Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples. *J Med Genet* 42:289-291, 2005.

Maher ER, Brueton LA, Bowdin SC, Luharia A, Cooper W, Cole TR, Macdonald F, Sampson JR, Barratt CL, Reik W, Hawkins MM. Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART). *J Med Genet* 40:62-64, 2003.

Ménézo Y, Hazout A, Panteix G, Robert F, Rollet J, Cohen-Bacrie P, Chapuis F, Clément P, Benkhalifa M. Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. *Reprod Biomed Online*, 14:418-421, 2007.

Mundy AJ, Ryder TA, Edmonds DK A quantitative study of sperm head ultrastructure in subfertile males with excess sperm precursors. *Fertil Steril* 61:751-754, 1994.

Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Pecchioli P, Moretti E, Gambera L, Baccetti B, Biagiotti R, Forti G, Maggi M. Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented sperm. *J Androl* 24:253-262, 2000.

Sun JG, Jurisicova A, Casper RF Detection of deoxyribonucleic acid in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod*. 56:602-607, 1997.

Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril*. 42:87-91, 1984.

Vagnini L, Baruffi RLR, Mauri AL, Petersen CG, Massaro FC, Pontes A, Oliveira JB, Franco JG Jr. The effects of male age on sperm DNA damage in an infertile population. *Reprod Biomed Online*, 15:514-519, 2007.

Virant-Klun I, Tomazevic T, Meden-Vrtovec H Sperm single-stranded DNA, detected by acridine orange staining, reduces fertilization and quality of ICSI-derived embryos. *J Assist Reprod Genet* 19:319-328, 2002.

Zini A, Libman J Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *CMAJ* 175: 495-500, 2006.

Correspondência:

Prof. J.G. Franco Junior

Av. Prof. João Fiusa, 689 – CEP 14025-310

Ribeirão Preto – SP - Brazil

E-mail: franco@crh.com.br or crh@crh.com.br





2009 Congresso Geral
Um encontro inesquecível
De 23 a 25 de abril

**Participe você também
dessa evolução**
Informações e inscrições:
info@redlara.com

Vitrificação em modelos bovinos: modelo de treinamento

Cattle oocytes vitrification: a training model

Carlos Gilberto Almodin, Vania Cibele Minguetti-Câmara, Leonardo Matutino Oliveira, Milena Brandão Seko, Isabelle Emanuelle Picada, Antonio Fernandes Moron

Materbaby – Reprodução Humana e Genética
Av. XV de Novembro, 1232
Maringá – Pr
CEP: 87.013-230

RESUMO

A técnica de vitrificação tem sido bastante utilizada na criopreservação de embriões e também ovócitos humanos, com boas taxas de sucesso. Apesar de bastante simples, a técnica necessita de certa habilidade para ser realizada. Assim, esse estudo tem como objetivo propor o treinamento com ovócitos bovinos, mostrando ser possível avaliar os resultados de criopreservação após degelo desses ovócitos.

Palavras-chave: embriões bovinos; oócitos humanos; vitrificação

ABSTRACT

Vitrification method has been used for human embryos and oocytes cryopreservation with successful rates. Although it looks simple, this method requires some skills to be done. Therefore, the aim of this study is to propose some training with cattle oocytes to show how is possible to assess the results of cryopreservation after oocytes thawing.

Key words: cattle embryos; human oocytes; vitrification

INTRODUÇÃO

A criopreservação de embriões humanos tem sido realizada por algumas décadas e traz várias vantagens para as pacientes em tratamento por fertilização *in-vitro* (Trouson & Mohr, 1983). A criopreservação de embriões leva à oportunidade de limitar o número de embriões transferidos, evitando gravidez mutigemelar, além de levar a uma nova tentativa de gravidez sem a necessidade de um novo ciclo de estimulação ovariana. Fato esse que gera alto custo e pode, ainda, gerar riscos potenciais para a paciente, dentre eles, o risco devido à exposição anestesia ou o de desenvolvimento da síndrome de hiperestimulação ovariana. Apesar disso, a criopreservação de embriões continua gerando discussões devido

aos problemas legais, éticos, sociais e práticos quanto à sua utilização.

A técnica padrão de criopreservação de embriões humanos utilizada até o momento consiste no método do resfriamento lento, que apresenta algumas desvantagens. Dentre elas está a necessidade de um equipamento de resfriamento programável de alto custo e o desenvolvimento do procedimento, que é bastante demorado. Apesar de alcançar com sucesso seu objetivo com embriões, esse modelo não tem sido utilizado na criopreservação de ovócitos, pois, ao contrário do que se observa com os embriões, as taxas de sobrevivência de ovócitos são baixas. Porém, sabe-se que a criopreservação de ovócitos, ao invés de embriões humanos, resolveria os problemas éticos e sociais quanto à criopreservação, além de preservar a possibilidade de reprodução de mulheres jovens com câncer que são submetidas a tratamentos quimioterápicos, por exemplo.

A vitrificação parece ser a solução para muitos dos problemas da criopreservação, pois tem sido utilizada com sucesso na criopreservação de embriões e também ovócitos, tanto em animais quanto em humanos (Chen *et al.*, 2000; Ptak *et al.*, 1999). O processo de vitrificação utiliza altas taxas de crioprotetores conseguindo a solidificação da solução sem formação de cristais de gelo a baixas temperaturas (Kuleshova *et al.*, 1999; Rieger, 1998), o que é extremamente benéfico para a sobrevivência das células.

O primeiro sucesso com vitrificação foi conseguido em 1998, quando Vatja e col. relataram a técnica de vitrificação com "Open Pulled Straw (OPS)" com bons resultados em embriões bovinos e Kuleshova e col. um ano mais tarde relataram uma gravidez usando o mesmo método. Desde então, a técnica parece não variar muito entre os diferentes pesquisadores, o que tem variado bastante são os aparatos usados durante o procedimento. A maioria desses aparatos são modificações do OPS (Hamawaki, 1999; Kuwayama, 2005; Lane, 1999; Mukaida, 2001;

2003). Estes têm que levar em consideração o princípio do método, ou seja, manter o embrião em quantidades mínimas de solução e permitir rápido resfriamento e aquecimento. Para utilização desses aparatos e bom desenvolvimento da técnica de vitrificação, necessita-se de treinamento. Para que esta técnica seja realizada com rapidez e eficiência, faz-se necessária a aquisição de um modelo animal para treinamento. Diante disso, o objetivo desse estudo é demonstrar a qualidade do processo de vitrificação de ovócitos bovinos, já que relatos recentes demonstram excelentes taxas de sobrevida destas células (Vajta *et al.*, 1996; Otoi *et al.*, 1998; Fuku *et al.*, 1995; Downey *et al.*, 1995; Keskintepe & Brackett, 1996).

MATERIAIS E MÉTODOS

Os ovários de vacas foram obtidos em abatedouro local. Imediatamente após a abertura do abdômen, os ovários eram retirados assepticamente, sendo colocados em uma cuba previamente esterilizada pelo calor. Os ovários eram retirados aleatoriamente, independente de raça, idade, prenhez ou ciclo, sendo transportados rapidamente para o laboratório em solução salina tamponada (D-PBS; GIBCO Laboratories, Grand Island, NY, USA). No laboratório, os ovários eram colocados sobre um campo estéril, sob o fluxo laminar e os folículos de 2-8 mm de diâmetro, aspirados com seringa descartável de 10 mL, conectada a agulha 25X8 (21G). O líquido folicular obtido era, então, transferido para tubos de centrifuga, que permaneciam alguns minutos à temperatura ambiente para que os ovócitos envoltos por células cumulares sedimentassem. Posteriormente, o sedimento era depositado em placa de Petri com 2 a 3 mL de PBS e examinado sob microscópio estereoscópico para identificação dos ovócitos. Uma vez identificados os ovócitos, estes eram lavados em PBS. Esperava-se encontrar os ovócitos com *cumulus ooforus* bastante compactados, sugerindo que estivessem no estágio de prófase I da meiose I, sendo necessário, portanto, a maturação dos mesmos antes da vitrificação. Para a maturação, os ovócitos eram transferidos do PBS, com o auxílio de pipetas de Pasteur, para placas múltiplas Ingámed (Ingámed, Perobal-Brasil) contendo 0,5 mL de Meio 199 (sal de Earle's, Sigma M-2154). O meio era, então, suplementado com 20% de soro de vaca no cio e FSH ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). No máximo 30 ovócitos eram colocados em cada 0,5 mL distribuídos nas placas. A maturação era realizada em incubadora (Forma modelo 3159) a $38,5^\circ\text{C}$, com atmosfera contendo 5% de CO_2 e umidade máxima por um período de 24 a 26 horas.

Vitrificação

Cem ovócitos foram desnudados de suas células cumulares e da corona após maturação, para a vitrificação, com a utilização de hialuronidase. A vitrificação foi realizada com a utilização do Vitri-Equip (Ingámed, Perobal-Brasil - Figura 1) que consiste em uma caixa de foam contendo duas caixas de aço. Uma maior que recebe as capas das hastas de vitrificação em vapor de nitrogênio para resfriamento prévio e outra contendo nitrogênio para o processo de vitrificação em si e para receber as capas momentos antes de serem preenchidas com as hastas Vitri-Ingá (Ingámed, Perobal-Brasil - Figura 2). Após serem desnudados, os ovócitos eram colocados

em solução de equilíbrio VI-1 (Ingámed, Maringá-Brasil) que contém etilenoglicol e dimetilsulfóxido. Os ovócitos foram equilibrados nessa solução por 5-15 minutos, e então transferidos para 3 gotas sucessivamente de 20 μL de solução de vitrificação VI-2 (Ingámed, Maringá-Brasil) constituída de etilenoglicol, dimetilsulfóxido e sacarose, permanecendo 15 segundos em cada gota. Os ovócitos eram então colocados sobre as hastas Vitri-Ingá (Ingámed, Perobal-Brasil), aparato confeccionado que consiste em uma haste de plástico com uma parte muito fina (filme plástico) conectada a uma parte mais grossa. Os ovócitos eram depositados um ou dois sobre a parte mais fina de cada haste, com o mínimo volume de solução de vitrificação, e então imediatamente imersos em nitrogênio líquido. Quando uma quantidade maior que 1 μL de solução era depositada com os ovócitos sobre a haste, o excesso de líquido era aspirado de volta para a pipeta. O tempo máximo de permanência nas gotas até a imersão no nitrogênio nunca foi superior a 60 segundos, à temperatura ambiente.

Para estocagem segura, a haste foi coberta com o protetor plástico previamente resfriado em vapor de nitrogênio e o conjunto era colocado em tambor de estocagem.

Degelo

Imediatamente após a retirada do tubo plástico protetor da haste Vitri-Ingá (Ingámed, Perobal-Brasil), a parte mais fina desta era totalmente imersa na solução de aquecimento DV-I (Ingámed, Maringá-Brasil) contendo sacarose a 37°C por 1 minuto. Os ovócitos coletados foram



Figura 1 - Vitri-Equip

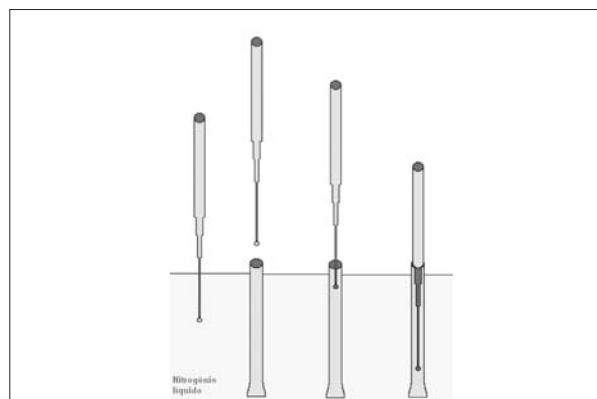


Figura 2 - Hastas Vitri-Ingá



Figura 3 - Antes da MIV (0 horas)

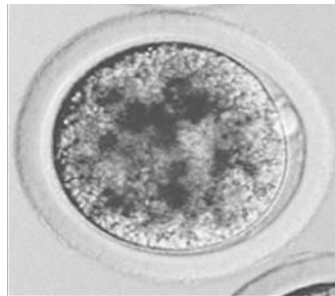


Figura 4 - Após a MIV (24 horas)

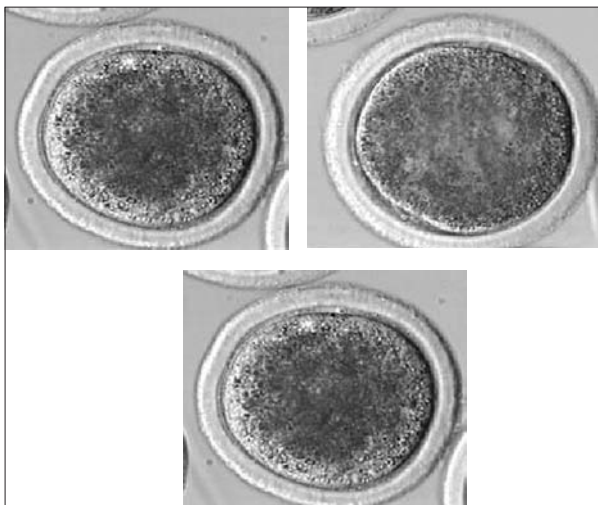


Figura 5 - Representação de variáveis que podem ser encontradas em ovócitos saudáveis. (a) ovócito aparentemente saudável com ausência de alterações citoplasmáticas ou membranas; (b) presença de pequenas pigmentações e depressões no interior, mas pode ser saudável; (c) presença de grande quantidade de grânulos corticais na periferia, porém, aparentemente saudável.



Figura 6 - representação de ovócito com grande vacúolo e fragmentação do citoesqueleto e citoplasma, parecendo não estar saudável.

transferidos para solução diluente de sacarose DV-II (Ingámed, Maringá-Brasil) por 3 minutos à temperatura ambiente, e então lavado em solução tampão DV-III, (Ingámed, Maringá-Brasil) por 2 vezes, 5 minutos cada. Após o degelo, a avaliação da sobrevivência foi realizada através do critério morfológico. A sobrevivência dos ovócitos foi definida pela reexpansão do mesmo, tendo mantido membrana celular intacta, ooplasma normal e zona pelúcida, bem como o espaço perivitelinico de tamanho normal (Figura 3). Os ovócitos que não sobreviveram morfológicamente se encontravam escuros, sem expansão do ooplasma e ou zona pelúcida fragmentada (Figura 4).

RESULTADOS

Dos cem ovócitos vitrificados, 86 sobreviveram e 14 mostraram-se morfológicamente alterados. A figura 3 representa um ovócito bovino antes de sofrer maturação. A figura 4, representa um ovócito já maturado após 24 horas. A figura 5 apresenta exemplos de ovócitos saudáveis, enquanto a figura 6, apresenta um exemplo de ovócito não saudável.

DISCUSSÃO

O aprimoramento técnico e a curva de aprendizado dos embriologistas têm sido árdua devido à falta de cursos específicos e material suficiente para tal. Alguns autores têm relatado experiência com a utilização de gametas de macacos para este fim e relatando, inclusive, o risco de dano gênico quando pessoas sem adequado treinamento utilizam técnica de fertilização *in-vitro* (Santalo *et al.*, 1992). Cientes desta necessidade, autores têm relatado a utilização de gametas e embriões de primatas com êxito no treinamento de técnicos (Hewitson *et al.*, 2004). Porém, nas últimas décadas tem havido utilização, em larga escala, de gametas e embriões de camundongos (Huang *et al.*, 2007). A utilização do desenvolvimento embrionário de camundongos tem sido utilizada também para avaliação de toxicidade, eficiência de materiais e meios de cultivo, sendo essencial no controle de qualidade destes (Perin *et al.*, 2008). Naturalmente, a utilização de gametas e embriões de camundongos tem sido eficiente. Entretanto, em nosso meio, sua utilização tem sido pouco utilizada devido à dificuldade em se obter os gametas e/ou embriões, além do alto custo para sua viabilização. Há relatos da possibilidade do controle de qualidade do laboratório de FIV com a utilização de gametas e embriões bovinos (Almodin *et al.*, 1993). O protocolo bovino tem sido de preço acessível e ao alcance de qualquer centro que tenha por perto um abatedouro em atividade e que disponibilize os ovários de vacas durante o abate. Esse modelo animal é utilizado rotineiramente, auxiliando, assim, o aprendizado dos profissionais.

O congelamento e preservação de embriões têm trazido grandes problemas éticos e morais em vários países. Devido a isso, diversos serviços de Reprodução Humana, que apresentam um estoque de embriões criopreservados, não sabem como proceder com eles. Afinal, além do problema social, sua manutenção resulta em alto custo para as clínicas. Independente da legislação do país, sempre haverá uma discussão quanto à moral, pois cada pessoa possui sua opinião própria, que varia com sua formação ética, moral e religiosa. Logo, independe

do destino destes embriões, dificilmente haverá concordância entre médicos, pacientes e religiosos. A vitrificação tem se apresentado como método extremamente eficiente e oferece a possibilidade de criopreservação de ovócitos com extrema eficiência. Dessa forma, torna-se possível a criação de banco de ovócitos, até então inexistente. Naturalmente, haverá um acréscimo de trabalho nos serviços de reprodução, já que, após o degelo desses ovócitos, haverá necessidade de se realizar uma nova ICSI, enquanto que, com os embriões congelados, isto não seria necessário. Porém, a simplicidade do método e a não necessidade de equipamentos sofisticados para a conclusão da vitrificação, diminui, de maneira sensível, o custo de todo procedimento, além de resolver os problemas morais e éticos gerados anteriormente pelo congelamento de embriões.

Referências bibliográficas

- Almodin C.G., Minguetti-Câmara V.C., Storti S. Controle de qualidade e treinamento técnico com embriões bovinos para laboratório de FIV. Ver. Bras. Ginec. Obst., 6:293-297, 1993.
- Chen S.U., Lien Y.R., Chao K., Lu H.F., Ho H.N., Yang Y.S. - Cryopreservation of mature human oocytes by vitrification with ethylene glycol in straws. Fertil. Steril., 74:804-808, 2000.
- Fuku E.J., Liu J., Downey B.R. - In vitro viability and ultrastructural changes in bovine oocytes treated with a vitrification solution. Mol. Reprod. Dev., 40:177-185, 1995.
- Fuku E., Xia L., Downey B.R. - Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. Cryobiology, 32:139-156, 1995.
- Hamawak A., Kuwayama M., Hamano S. - Minimum volume cooling method for bovine blastocyst vitrification. Theriogenology, 51:165, 1999.
- Hewitson L. Primate models for assisted reproductive technologies. Reproduction, 128:293-299, 2004.
- Huang J.Y., Chen H.Y., Park J.Y., Tan S.L., Chian R.C. - Comparison of spindle and chromosome configuration in in vitro and in vivo-matured mouse oocytes after vitrification. Fertil. Steril., 3: 2007.
- Keskintepe L., Brackett B.G. - In vitro developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. Biol. Reprod., 55:333-339, 1996.
- Kuleshova L.L., MacFarlane D.R., Trounson A.O., Shaw J.M.. - Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. Cryobiology, 38:119-130, 1999.
- Kuwayama M., Vajta G., Kato O., Leibo S.P. - Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. Reprod. Biomed. Online, 11:300-308, 2005.
- Lane M., Schoolcraft W. B., Gardner D. K. - Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. Fertil. Steril., 72: 1073-1078, 1999.
- Mukaida T., Nakamura S., Tomiyama T., Wada S., Kasai M., Takahashi K. Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of a Cryolop containerless technique. Fertil. Steril., 76:618-623, 2001.
- Mukaida T., Nakamura S., Tomiyama T., Wada S., Oka C., Kasai M. Takahashi K. - Vitrification of human blastocysts using cryoloops (clinical outcome of 223 cycles). Hum. Reprod., 18:384-391, 2003.
- Otoi T., Yamamoto K., Koyama N., Tachikawa S., Suzuki T. - Cryopreservation of mature bovine oocytes by vitrification in straws. Cryobiology, 37: 77-85, 1998.
- Perin P.M., Maluf M., Nicolosi D.A.F.J., Saldiva P.H.N. Comparison of the efficacy of two commercially available media for culturing one-cell embryos in the in vitro fertilization mouse model. Fertil Steril 2008 Jan 25.
- Ptak G., Dattena M., Loi P., Tischner M., Cappai P. - Ovum pick-up in sheep: efficiency of in vitro embryo production, vitrification and birth of offspring. Theriogenology, 52:1105-1114. 1999.
- Rieger D. - Effects of the in vitro chemical environment during early embryogenesis on subsequent development. Arch. Toxicol. Suppl., 20:121-129, 1998.
- Santalo J., Badenas J., Calafell J.M., Catala V., Munne S., Egozcue J., et al. The genetic risks of in vitro fertilization techniques: the use of an animal model. J. Assist. Reprod. Genet. 9:462-474, 1992.
- Vajta G., Holm P., Greve T., Callesen H. - Overall efficiency of in vitro embryo production and vitrification in cattle. Theriogenology, 45:683-699, 1996.
- Vajta G., Holm P., Kuwayama M., Booth P.J., Jacobsen H., Greve T., Callesen H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. Mol. Reprod. Dev. 51:53-58, 1998.

Correspondência:

Carlos Gilberto Almodin
Av. XV de Novembro, 1232
E-mail: almodin@materbaby.com.br
Fone: (44) 3224-3992
Maringá - Pr
CEP: 87.013-230

2009 Congresso Brasileiro De Reprodução Assistida

Agosto de 2009 Curitiba, PR

Conhecendo a realidade da reprodução assistida no Brasil

The reality of ART in Brazil

Marilena C. D. V. Corrêa

Médica sanitária, Doutora em Ciências Humanas e Saúde,
Professora-adjunta do Instituto de Medicina Social da UERJ
Pesquisadora associada do CERMES *Centre de Recherches Medicine, Sciences, Santé et Société*.
(CNRS-INSERM-EHESS), França.

Endereço: mcorrea@ism.com.br

RESUMO

Comentários sobre a primeira publicação aberta dos dados brasileiros de Reprodução Assistida. O registro latinoamericano e sua função de excelência na construção da saúde pública.

Palavras-chave: reprodução assistida; estatística e dados numéricos; normas; utilização;

ABSTRACT

Comments about the first open known data of ART in Brazil. The Redlara Latin American Registry and its excellence in the health public information.

No ano de 2004 completaram-se quinze anos de registro dos resultados da aplicação de técnicas de reprodução assistida (RA) na região da América Latina. Coordenada pela Rede Latino-Americana de Reprodução Assistida (Redlara), esta iniciativa de registro anual é altamente relevante; tanto no plano da documentação quanto no da produção de dados que permitirão análises em séries históricas, longitudinais e estudos de outra natureza. Ademais, o esforço de registro periódico por parte da Redlara, a partir do fornecimento de dados de Centros associados e acreditados, representa a busca de excelência no plano da informação para o nível regional latino-americano, seguindo tendência mundial nos países cientificamente mais desenvolvidos e exportadores de tecnologia na área: como é o caso da ASRM e CDC (para os Estados Unidos), HFEA (Inglaterra), FIVNAT (França), ESHRE (Europa), etc. Ainda nesse sentido, o Jornal da SBRA vem prestar um belo serviço à comunidade de especialistas e interessados no tema, ao publicar resultados consolidados para o Brasil, em artigo original intitulado *Registro Latinoamericano - Brasil - 2004*; volume 12(1) 2008, p 21-31.

Não entraremos na análise detalhada daqueles resultados nesta oportunidade, chamando a atenção apenas para

alguns pontos: o aumento em 400% ou 15 vezes das atividades com técnicas de RA, entre 1990 e 2004. Além de crescer, a medicina reprodutiva brasileira apresentou, no período, uma notável intensificação no que diz respeito à incorporação de tecnologia mais sofisticada, evidenciada pelo aumento exponencial do emprego de técnicas de micromanipulação, comparativamente ao uso de técnicas "tradicionais" de FIV: aquelas contribuíram com 87.3% dos procedimentos no país, no último ano estudado.

No Registro Latinoamericano de 2005, já disponível no sítio da Redlara, contam-se 53 Centros brasileiros informantes (*versus* 48 do ano anterior). Veicula-se, através da grande mídia, um número bem mais elevado de clínicas brasileiras de RA, informação proveniente, muitas vezes, de sociedades de especialidades nacionais (SBRA, SBRH) ou do depoimento de seus representantes. Esforços isolados são dignos de reconhecimento, mas nunca é demais lembrar conceitos básicos que orientam a ação da saúde pública e para o avanço do conhecimento científico e das pesquisas acadêmicas no nível global: garantia da fidedignidade dos dados, sua comparabilidade, rastreamento e reprodutibilidade são aspectos de valor fundamental que devem ser visados. Reportar voluntariamente dados a níveis hierarquicamente superiores de registro significa uma contribuição ímpar para a ciência e a saúde pública. E, ademais, constitui, neste caso, atitude moralmente desejável, haja visto o fato de a difusão da reprodução humana assistida comportar implicações sociais e éticas, por vezes ainda controversas no debate público.

Cabe um apelo à comunidade de especialistas da medicina reprodutiva, no sentido de apoiar, cada vez mais, a iniciativa continuada de construção do registro por parte da Redlara, o que, a nosso ver, virá contribuir para o aprimoramento da reprodução assistida em nosso país assim como para uma maior visibilidade e credibilidade desta prática no Brasil e na região.

Resultados REDE Brasil: um comentário

Red Brazil ART results: a comment

José Gonçalves Franco Jr

Centro de Reprodução Humana Prof Franco Jr - Ribeirão Preto, SP, Brasil

A decisão dos centros integrantes da Rede Latino-americana de liberarem por cada país os resultados das técnicas de ART foi um importante passo para identificar como os brasileiros trabalham com Reprodução Assistida. Apesar dos resultados apresentados serem direcionadas para as variáveis mais importantes de prognóstico em ART (crianças por parto, taxas de gestação múltipla, índices de mortalidade neonatal, etc.) alguns *bias* ainda poderiam dificultar as conclusões.

O primeiro seria a falta de informações quanto a contribuição (número de pacientes) de cada centro com relação a variável analisada. Não seria necessário a identificação do centro mas apenas definir o percentual de participação

de cada unidade. Tal fato fica evidente e necessário quando se observa uma taxa de gestação ectópica de 29.9% (47 gestações ectópicas) de um total 157 gestação após criopreservação de embriões. Da mesma forma, conhecer se apenas um ou mais que um centro contribuiu para o total de 9% de gestações triplas ou de número superior.

O segundo viés estaria ligado ao fato de que a Rede Latino-americana reuniu dados de um total de 55 centros brasileiros no ano de 2004, entretanto o número estimado nessa ocasião seria superior a 100.

Finalmente, a decisão é benéfica e salutar mas conclusões definitivas baseadas nesses dados ainda são precoces e merecem uma análise mais cuidadosa.

Importância do espermatozóide no desenvolvimento embrionário pré-implantacional

Spermatozoa and embryo pre implantation development

Thiago Plácido¹, Christiany Victor Locambo², Alessandro Schuffner¹

1- Conceber – Centro de Medicina Reprodutiva, Curitiba.

2- Faculdade de Medicina do ABC, São Paulo

RESUMO

Muito se fala da importância do espermatozóide no desenvolvimento embrionário. Esta revisão demonstra essa importância, ressaltando algumas causas e efeitos paternos no desenvolvimento embrionário.

As deficiências da molécula de DNA do espermatozóide não necessariamente evitam a fertilização, sendo ele ainda capaz de formar um prónucleo normal após a injeção intracitoplasmática (ICSI). Porém, algumas consequências podem ocorrer devido ao *imprinting* genômico e a fragmentação de DNA.

Este trabalho mostra a importância de avaliar não apenas fatores morfológicos, mas também fatores genéticos e epigenéticos do espermatozóide no tratamento de casais inférteis com abortos de repetição.

Palavras-chave: DNA; espermatozóide; implantação

ABSTRACT

A lot of research has been done on the importance of sperm on the embryo development. This analysis shows some causes and paternal effects of this importance, on the embryo development.

The damage of the spermatozoa's DNA molecule does not necessarily avoid the fertilization, as it is still capable of forming a normal pronuclei after intracytoplasmatic sperm injection (ICSI). However, the genomic imprinting and DNA fragmentation can lead to consequences.

This study demonstrates the importance of evaluating not only the morphological aspects but the spermatozoa's genetic and epigenetic aspects in the treatment of infertile couples with recurrent miscarriage as well.

Key Words: DNA; imprinting; sperm

INTRODUÇÃO

Atualmente, cerca de 15 a 20% dos casais em idade reprodutiva são acometidos por problemas de fertilidade, e em cerca de 30% dos casos a infertilidade é atribuí-

da a causas masculinas (WHO, 1999). Várias etiologias foram identificadas como causas da infertilidade masculina, as quais incluem mutações genéticas, aneuploidias, doenças infecciosas, oclusão do ducto ejaculatório, varicocele, exposição à radiação, quimioterápicos e disfunções erétil e ejaculatória (Ollero et al, 2001). No entanto, aproximadamente 40% dos homens inférteis apresentam infertilidade sem causa conhecida, o que representa um sério problema já que nestes casos a terapêutica empírica não tem sucesso (Skakkebaeck et al, 1994; Henkel et al, 2003).

Após a introdução da técnica de injeção intra-citoplasmática de espermatozóide (ICSI) houve uma revolução no tratamento da infertilidade masculina, proporcionando a pacientes antes incapazes de poder reproduzir, a oportunidade de se tornarem pais genéticos. Entretanto, na técnica da ICSI o espermatozóide é injetado diretamente dentro do oócito, sendo eliminadas muitas barreiras naturais que excluiriam um espermatozóide anormal ou com defeitos genéticos de entrar no oócito. Para evitar a ocorrência deste fato, houve a necessidade do desenvolvimento de novas técnicas de acesso a características de amostragem de sêmen. O interesse com a integridade do genoma dos gametas masculinos intensificou-se pela crescente preocupação com a transmissão de doenças genéticas especialmente através da ICSI (Sakkas et al, 1999; Agarwal & Said, 2003; Henkel et al, 2003; Lewis & Aitken, 2005).

OBJETIVO

Este trabalho tem por objetivo elucidar o papel da integridade do espermatozóide na transmissão do material genético aos seus descendentes, e também o potencial efeito paterno aos embriões em fase pré-implantacional.

Espermatogênese

As células germinativas masculinas originam-se a partir das células primordiais provenientes do saco vitelino que chegam as gônadas em formação, onde são convertidas

em espermatogônias. Estas então entram em meiose na puberdade com a produção de testosterona pelas células de Leydig, sendo este processo contínuo até a senescência do indivíduo (Moore et al., 2004).

Espermatogênese é o nome dado ao processo de formação do espermatozóide a partir das espermatogônias, que se multiplicam por mitose proporcionando assim a renovação contínua de material genético, não havendo assim envelhecimento dos gametas como ocorre com os oócitos formados ainda na fase embrionária que serão os mesmos pelo resto da vida da mulher.

As espermatogônias entrarão em meiose formando os espermatócitos primários, secundários e as espermátides, este último grupo apesar de haplóides ainda são células redondas e não funcionais (De Robertis, 2001). Após a formação das espermátides um outro processo ocorre, denominado espermiogênese gonadal (Sofikits et al., 1998), onde se dá o empacotamento da cromatina nuclear, eliminação do citoplasma e formação da vesícula acrossômica a partir do complexo de Golgi, formação da peça intermediária com o acúmulo de mitocôndrias (bainha mitocondrial) e formação da cauda (flagelo) a partir do centríolo.

Efeito Paterno

A boa qualidade do material genético (DNA) é essencial para a perfeita transmissão da informação genética para a próxima geração. As contribuições do material genético são de vital importância para a embriogênese. A soma da contribuição do DNA, controle epigenético, assim como, a regulação da transcrição do DNA, tradução e a função cromossômica são necessárias para o desenvolvimento embrionário (Emery & Carrell, 2006).

Alguns estudos têm mostrado que fatores paternos podem ser responsáveis pelas repetidas falhas em tentativas de técnicas em reprodução assistida (TRA) (Vanderzwalmen et al., 1991; Parinaud et al., 1993; Janny & Menezes, 1994; Hammadeh et al., 1996; Sanchez et al., 1996; Shoukir et al., 1998).

Os danos no DNA não representam uma barreira para a fertilização, porém é possível que venham a causar anomalias congênitas nos descendentes (Donnelly et al., 2000). Apesar das deficiências da molécula de DNA não necessariamente evitarem a fertilização embora causem danos genéticos no espermatozóide, o mesmo ainda é capaz de formar um pronúcleo normal após a injeção intra-citoplasmática (ICSI) (Twigg et al., 1998).

Tesarik e cols. (2002) que o efeito paterno precoce é visível antes da primeira clivagem após a fertilização. A sequência de avaliação dos embriões durante a primeira e subseqüentes divisões mostra a proximidade entre a detecção de anormalidades durante o primeiro ciclo celular e a dificuldade no desenvolvimento. A manifestação precoce da influência paterna no desenvolvimento pré-implantacional caracteriza a falha de mecanismos moleculares e *imprinting* genômico. Uma outra hipótese é que o efeito precoce seja mediado pela disfunção do centrômero ou deficiência de fatores ativadores de oócito. A implicação do empacotamento cromossômico no espermatozóide ou danos de DNA permanece controversa.

Estudos feitos demonstraram também a existência do efeito paterno tardio que pode envolver aneuploidia,

danos de DNA ou empacotamento anormal da cromatina alterando a correta ativação da expressão dos genes paternos (Tesarik et al., 2004).

Diversos estudos têm mostrado que a infertilidade masculina pode ser causada por danos no DNA do espermatozóide (Sun et al, 1997; Morris et al, 2002; Agarwal & Said, 2003; Henkel et al, 2003; Seli et al, 2004; Lewis & Aitken, 2005). Outros estudos avaliaram também a estrutura e integridade do sêmen ejaculado de humanos, reportando o efeito negativo das altas porcentagens de espermatozóides com danos de DNA nas taxas de gravidez em TRA (Filatov et al., 1999; Host et al., 2000; Larson et al., 2000; Morris et al., 2002; Tomsu et al., 2002; Benchaib et al., 2003). Esses estudos têm sugerido que danos de DNA paterno podem servir como um marcador para diagnósticos das adversidades do efeito paterno no desenvolvimento pré-implantacional em humanos. Contudo, nenhuma pesquisa fornece a possível relação entre a fragmentação de DNA em espermatozóides e efeitos paternos precoces na qualidade do zigoto, mas relaciona esses danos com o efeito paterno tardio, que pode causar falhas de implantação e do desenvolvimento após a implantação (Tesarik et al., 2004).

Os exatos mecanismos que levam a esses danos ainda não são completamente entendidos, mas algumas teorias são propostas para explicá-los, como falhas no processo de compactação da cromatina, altos níveis de apoptose e o estresse oxidativo (Agarwal & Said, 2003; Lewis & Aitken, 2005).

Imprinting genômico

Freqüentemente, a epigenia é usada para mostrar a idéia de agentes intrínsecos das células, tecidos ou organismos, influenciando não o código genético, mas sim o padrão da expressão genética. A epigenética é o estudo de como a transcrição dos genes, a expressão e a utilização dos produtos é modificada por fatores extrínsecos diferenciados, para definir e manter as distinções celulares, teciduais ou fenotípicas do organismo (Jonhson, 2005).

O *imprinting* genômico é uma mudança epigenética em que a troca da sequência dos nucleotídeos do DNA não é afetada, somente a natureza e a estrutura da associação das proteínas da cromatina e a modificação da metilação das histonas. Essa mudança epigenética afeta o empacotamento do DNA, o acesso a fatores de transcrição e também o potencial de transcrição. Alguns *imprints* genômicos, são descritos como sendo de origem parental (*imprints* parentais). Esses *imprints* são geralmente desativados durante a gametogênese e então reativados novamente, porém em vias que dependem da gônada em que a meiose ocorre (KEARNS et al., 2000). Assim, no ambiente testicular o *imprinting* ocorre em alguns genes e no ambiente ovariano em outros genes. O fato é que genes alelos paternos e maternos sofrem *imprinting* diferenciados, e essa diferenciação é válida para a expressão, o que significa que seus descendentes são monoalelos para genes parentais com *imprinting* (Jonhson, 2005). O *imprinting* paterno no espermatozóide é modificado durante a passagem pelo epidídimo onde a metilação do DNA é muito reduzida na preparação para a fertilização por uma via passiva de demetilação (EMERY & CARRELL, 2006). Existem também, os *imprints* causa-

dos pelo desenvolvimento, refletindo uma estável ativação dos alelos durante o desenvolvimento embrionário, dando às células e tecidos uma estabilidade no desenvolvimento dos fenótipos. O período entre a fertilização e a implantação é marcado por muitas mudanças na organização do genoma e no *imprint* parental. O que se deve levar em consideração é até onde o desenvolvimento *in vitro* desses embriões é afetado em relação a possíveis mudanças nos *imprints* devido à manipulação, e suas consequências (Jonhson, 2005).

Um estudo analisado por Emery e Carrell (2006) mostrou que erros de *imprinting* experimentalmente induzidos ou ocorridos naturalmente estão relacionados com o desenvolvimento embrionário anormal e abortos. De fato, houve a identificação de um pequeno impacto nas taxas de fertilização, porém uma diminuição na morfologia embrionária e gravidez quando avaliados espermatozoides com alterações na posição da metilação no genoma. É importante mencionar que muitos passos do *imprinting* genômico durante a espermatogênese são descritos, e demonstram a correlação entre prioridade da metilação no espermatozoide, a fertilização e o desenvolvimento embrionário normal.

Apoptose

É caracterizada pela presença de DNA fragmentado nos espermatozoides humanos ejaculados. Este fenômeno é um mecanismo ativo de morte celular programada, diferente da necrose, e acontece pela transcrição de genes e pela ativação de enzimas que agem no processo de autodigestão controlada por proteases endógenas. É um importante processo no quais células indesejadas são excluídas de um organismo durante a remodelação e diferenciação dos tecidos.

A apoptose controla a produção de gametas masculinos e limita o nível de proliferação das células germinativas para que não ultrapasse a capacidade suportada pelas células de Sertoli (Sharma *et al.* 2004). Nas técnicas de reprodução assistida, a fertilização, o desenvolvimento do embrião e as taxas de gravidez podem ser afetados pelo aumento da atividade apoptótica nos espermatozoides. Existe uma correlação negativa entre o desenvolvimento embrionário e a porcentagem de espermatozoides apoptóticos preparados para inseminação, o que indica que anomalias no DNA nuclear do espermatozoide possam ser responsáveis em parte pela baixa qualidade do embrião e/ou seu desenvolvimento (Seli *et al.*, 2004).

Ainda nesse contexto, a falta de efeito da atividade apoptótica na taxa de fertilização nos dias 2 ou 3, pelo fato de que, em humanos o genoma paterno é ativado depois do estágio de quatro células. Antes desse ponto o desenvolvimento embrionário é controlado pelo mRNA herdado da mãe (Tesarik *et al.*, 1986; Braude *et al.*, 1988). Partimos então do pressuposto que os efeitos paternos no blastocisto podem ser mais evidentes depois da ativação do genoma embrionário (Sakkas, 1999).

Em indivíduos com sêmen normal, a apoptose é detectada em uma pequena porcentagem de espermatozoides ejaculados, entretanto espermatozoides de indivíduos com sêmen anormal caracterizam-se por possuir um alto nível de fragmentação de DNA, que é um indicativo de apoptose (Irvine *et al.*, 2000).

Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

No trato reprodutor masculino existe um equilíbrio entre a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e de agentes anti-oxidantes. Quantidades limitadas de ERO são necessárias para a regulação das funções normais do espermatozoide, como a capacitação, reação acrosômica e fusão do espermatozoide no oócito. A produção de excessiva quantidade de ERO no sêmen pode superar a capacidade dos mecanismos de defesa anti-oxidante do espermatozoide e do plasma seminal, causando um estresse oxidativo (Agarwal & Saleh, 2002).

ERO causam danos ao DNA nuclear como modificações e deleções das bases que constituem a molécula, rearranjos cromossômicos e está associado com altas frequências de fragmentação do DNA.

Espécies reativas de oxigênio ou radicais livres, como o radical hidroxila (OH⁻), ânion superóxido (O₂⁻) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), são agentes altamente oxidantes e estão relacionados com a baixa viabilidade e alterações morfológicas nos espermatozoides (Lamirande *et al.*, 1995; Padron *et al.*, 1997).

Os espermatozoides são células altamente vulneráveis aos danos causados por ERO devido a alta quantidade de ácidos graxos poli-insaturados presentes na membrana plasmática. Além disso, as baixas concentrações de enzimas antioxidantes em seu citoplasma reduzido contribuem para torná-los vulneráveis (Sharma & Agarwal, 1996).

Fragmentação de DNA

O uso de espermatozoides com fragmentação de DNA realça a questão de que o zigoto ou o embrião possuem a capacidade de compensar ou corrigir essas deficiências para que o espermatozoide com danos no DNA consiga a fertilização. A relação desses reparos com os danos no DNA indica que há um mecanismo de resposta para o pronúcleo masculino com DNA danificado na fertilização do oócito. Sabe-se que o DNA danificado do espermatozoide na fertilização é um fator em que o embrião em desenvolvimento e o oócito tentarão compensar, porém não se sabe como esses danos comprometerão o desenvolvimento embrionário (Emery & Carrell, 2006).

Ainda não se têm informações em relação aos danos do DNA e as consequências na fertilização, porém sabe-se que esses danos podem afetar no desenvolvimento embrionário, implantação, gestação e descendentes (Sakkas *et al.*, 2000; Seli & Sakkas, 2005).

A relação próxima entre a fragmentação de DNA e a baixa qualidade do sêmen pode mostrar que está ocorrendo uma alteração do processo de maturação, de apoptose ou um desequilíbrio na produção de ERO, o que compromete a formação de espermatozoides saudáveis em sua estrutura e função. Essa relação é particularmente importante nas técnicas de reprodução assistida (TRA), onde um espermatozoide é pré-selecionado pelo embriologista na ICSI, sendo os parâmetros desta seleção imprecisos, e conseqüentemente, aumentando o risco da injeção de um espermatozoide com danos de DNA (Borini *et al.*, 2006).

Espermatozoides com anormalidades morfológicas e danos de DNA têm menor competência para fertilizar um oócito "in vivo" ou por fertilização "in vitro" (FIV) clássica. Essa idéia é partilhada por estudos indicando que a zona pelúcida é capaz de "identificar" alterações genéticas do esper-

matozóide (Menkveld et al., 1991; Van Dyk et al., 2000). A partir desta idéia, Borini et al fizeram um estudo comparativo entre dois grupos de casais, com um grupo submetido ao tratamento por ICSI e o outro por FIV clássica, sendo os maridos dos dois grupos portadores de fragmentação de DNA. O resultado deste estudo evidenciou a relação entre a fragmentação de DNA e abortos no grupo submetido ao tratamento por ICSI. Esse estudo mostrou também que os parâmetros utilizados de avaliação do sêmem segundo a Organização Mundial de Saúde não tem efeito estatístico na gravidez e abortos nos dois grupos estudados, demonstrando então a importância da avaliação do sêmem por meio de técnicas apropriadas para a detecção de fragmentação de DNA e por consequência a determinação da infertilidade masculina.

Greco et al (2006) sugeriram que a infertilidade masculina, com uma alta incidência de danos de DNA na população de espermatozóides ejaculados, comparada com a porcentagem de espermatozóides nos testículos, é muito menor. Esta observação confirma a hipótese de que a maioria dos danos de DNA resulta das alterações decorrentes ao nível pós-testicular, entretanto, não se pode excluir a predisposição do espermatozóide para um tipo de dano nas fases iniciais de formação.

Alguns estudos têm indicado que o resultado da ICSI não está relacionado com a morfologia estrita do espermatozóide usada na micro-injeção. As taxas de fertilização obtidas de amostras de sêmem com morfologia pobre (3% de células normais) não diferem daquelas obtidas com amostras de sêmem com melhor morfologia dos espermatozóides. Similarmente, nenhuma diferença em taxas clínicas de gravidez tem sido observada (Tesarik et al., 2006). Por esta razão, a fragmentação de DNA no espermatozóide deve ser avaliada na qualidade do sêmem. O processo de compactação da cromatina do espermatozóide acontece durante a espermiogênese e depende da atividade de uma nuclease endógena (topoisomerase II) que cria e une fragmentos na molécula de DNA possibilitando a protoaminação. A presença de DNA fragmentado no núcleo do espermatozóide pode indicar anormalidades durante a compactação e um processo incompleto de maturação (Sakkas et al, 1999; Agarwal & Said, 2003; Lewis & Aitken, 2005). Esta hipótese é suportada por observações da presença de espermatozóides com danos no DNA nuclear correlacionados com uma baixa compactação da cromatina devido a uma pobre protoaminação (Gorczyca et al, 1993; Manicardi et al, 1995; Sailer et al, 1995).

A análise seminal é essencial na avaliação da infertilidade masculina, mas os parâmetros analisados convencionalmente como concentração, motilidade e morfologia não revelam defeitos mais sutis dos espermatozóides. Aproximadamente 15% dos pacientes com fator masculino de infertilidade apresentam análise seminal normal. Estudos recentes sugerem que o *status* do DNA do espermatozóide é um parâmetro independente da qualidade espermática que tem uma boa capacidade diagnóstica e prognóstica (Agarwal & Said, 2004; Agarwal & Allamaneni 2005; Lewis & Aitken, 2005).

Diversas técnicas foram desenvolvidas para avaliar a integridade da cromatina espermática e estabelecer uma significativa correlação com a infertilidade masculina. A capacidade de estas técnicas avaliarem os danos ao DNA

do espermatozóide depende de muitos aspectos técnicos e biológicos. Alguns testes atualmente avaliam a fragmentação do DNA do espermatozóide, incluindo Terminal deoxinucleotidil transferase Uracil Nick End Labeling (TUNEL), teste da estrutura da cromatina espermática (SCSA), teste de laranja acridina (AOT), eletroforese em gel de células individuais (COMETA), detecção de quebras no DNA por Hibridação "in situ" de Fluorescência (DBD – FISH) e teste da dispersão da cromatina espermática (SCD) (Muriel et al, 2006).

A técnica do TUNEL (Terminal deoxinucleotidil transferase Uracil Nick End Labeling) detecta quebras em DNA de dupla fita e simples fita quantificando a incorporação da desoxiuridina trifosfato (dUTP) nas terminações livres 3'OH do DNA numa reação enzimática catalisada pela enzima desoxinucleotideo terminal transferase (TdT) criando um sinal o qual aumenta com o número de quebras do DNA. A incorporação deste nucleotídeo pode ser quantificada por citometria de fluxo e microscopia de luz ou fluorescência (Gorczyca et al, 1993).

O teste da cromatina espermática, cuja sigla em inglês é SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) é uma técnica já bem estabelecida desenvolvida a mais de duas décadas (Evenson et al, 1994; Evenson et al, 1999; Evenson & Jost, 2000). Baseia-se no princípio que espermatozóides com anormalidades em sua cromatina têm uma maior suscetibilidade a denaturação sob indução física (ácida ou calor). Esta denaturação é determinada com o uso de um corante metacromático, a laranja de acridina que ao se intercalar em DNA dupla fita emite cor verde (DNA intacto) e em DNA simples fita emite cor vermelha (DNA fragmentado) (Evenson et al, 1994; 1999). A quantificação é feita de acordo com a proporção de fluorescência verde/vermelha medida por citometria de fluxo e analisada por um *software* que cria um gráfico mostrando a porcentagem de espermatozóides que apresentam o seu DNA danificando estabelecendo o índice de fragmentação do DNA dos espermatozóides (DFI) (Evenson et al, 1999; 2002).

O teste de laranja acridina, AOT (acridine orange test), é uma técnica simples que se baseia no mesmo princípio do SCSA, ou seja, mede a suscetibilidade de denaturação "in situ" pela quantificação da fluorescência emitida usando o corante laranja acridina que ao se intercalar em DNA dupla fita emite coloração verde (DNA intacto) e em DNA simples fita emite coloração vermelha (DNA danificado). Sua avaliação é feita por microscopia de fluorescência (Hoshi et al, 1996).

O ensaio COMETA ou eletroforese em gel de células individuais, introduzida por OSTLING & JOHANSON (1984), quantifica danos ao DNA em células individuais. Nesta técnica as células são lisadas para retirar todas as proteínas e submetidas a uma corrente elétrica em um microgel de agarose (eletroforese). Sob condições neutras temos a migração de fragmentos de DNA dupla fita que formam uma imagem semelhante a um cometa. Sing et al (1988), com o uso da eletroforese sob condições alcalinas aumentaram a sensibilidade da técnica que passou a detectar quebras em DNA dupla fita e simples fita também. Collins (2002) confirmou que a técnica do COMETA sob condições neutras tem maior sensibilidade para identificar quebras em DNA dupla fita e pouca para detectar quebras em DNA simples fita quando comparado com a técnica em condições alcalinas.

A técnica da Detecção de quebras no DNA por Hibridação "in situ" por Fluorescência (DBD-FISH – DNA Breakage Detection - FISH) é sensível para detectar e quantificar quebras no DNA em células individuais em todo genoma ou em áreas específicas da molécula de DNA. As células em um microgel de agarose sobre uma lâmina são lisadas e os nucleóides (núcleos desproteinizados) resultantes são expostos a uma denaturação controlada, geralmente com agentes alcalinos. Como consequência temos a formação de ssDNA, do inglês, single strand DNA ou DNA de fita simples, a partir das terminações das quebras no DNA. (Fernández & Gonsálvez, 2002; Muriel *et al*, 2004).

Estas áreas de ssDNA são susceptíveis a hibridação com sondas fluorescentes, e este é o princípio do DBD-FISH, ou seja, a quantidade de ssDNA geradas pela alcalinização é proporcional ao grau da fragmentação do DNA e com a hibridação das sondas que emitirão os sinais de fluorescência (Fernández & Gonsálvez, 2002; Fernández *et al*, 2003).

O teste da dispersão da cromatina espermática (do inglês Sperm Chromatin Dispersion - SCD) foi introduzido para avaliar a fragmentação do DNA do espermatozoide. Nesta técnica os espermatozoides em um microgel são tratados com uma solução ácida para denaturar o DNA e extrair as proteínas nucleares. Os espermatozoides que tiverem o DNA intacto formarão um halo que corresponde à fita de DNA sem as proteínas ligadas à estrutura residual nuclear. A presença de quebras no DNA promove a dispersão do halo dos nucleóides e é o princípio deste teste, portanto os espermatozoides cujo DNA estiver fragmentado não formarão ou será um halo bem reduzido (Fernández *et al*, 2003; 2005).

A preparação e escolha dos espermatozoides nem sempre reflete a qualidade das células injetadas dentro do ócito. Além disso, a morfologia individual dos espermatozoides não tem sido avaliada quando são injetadas células retiradas do epidídimo ou do testículo, ou quando um espermatozoide morfologicamente anormal é usado para a microinjeção (na maioria dos casos porque nenhuma outra célula espermática estava disponível) (De Vos *et al.*, 2003).

CONCLUSÃO

O espermatozoide pode causar anormalidades no desenvolvimento embrionário no estágio anterior ao primeiro ciclo celular após fertilização. Essa deficiência no espermatozoide não pode ser observada pelos parâmetros normais de avaliação da qualidade do sêmen, e também não afeta as taxas de fertilização após a técnica de ICSI. Mais trabalhos devem ser realizados para determinar o mecanismo dessa deficiência no desenvolvimento embrionário e as estratégias de diagnóstico e cura. Um dos mecanismos prioritários a serem estudados deve ser o *imprinting* genômico.

A fragmentação de DNA parece não afetar o desenvolvimento pré-implantacional do embrião, mas tem uma grande interferência nas taxas de implantação, no desenvolvimento pós-implantacional do embrião e abortos, sendo assim a fragmentação deve ser considerada na avaliação da qualidade do espermatozoide se observado aborto de repetição em casais em tratamento por ICSI. Na FIV clássica, a fragmentação parece afetar menos as taxas

de gravidez e aborto, porém mais estudos devem ser realizados para uma melhor conclusão dessa hipótese.

Referências Bibliográficas

Agarwal A, Allamanesi SS. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fertil Steril*. 84(4):850-3, Oct 2005.

Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update*, 9(4):331-45, Jul-Aug 2003.

Agarwal A, Said TM. Sperm chromatin assessment. In: *Textbook of ART*, 2nd Edition, (Editors: D.K. Gardner, A. Weissman, C.M. Howles, and Z. Shoham), Taylor & Francis Group, plc, London, UK, Chapter 7, pp. 93-106, 2004.

Agarwal A, Saleh RA. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance and treatment. *Uro Clin North America*, vol. 29 (4):01-12, November 2002.

Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, Guérin JF. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy in an assisted reproduction technique. *Hum Reprod* 18, 1023-10128, 2003.

Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, Coticchio G. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod* 21 (11), 2876-2881, 2006.

Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four-and eight cell stages of preimplantation development. *Nature*, 332:459-61, 1988.

Collins AR. The comet assay. Principles, applications, and limitations. *Methods Mol Biol*. 203:163-77, 2002.

van Dyk Q, Lanzendorf S, Kolm P, Hodgen DJ, Mahony MC. Incidence of aneuploid spermatozoa from subfertile man: selected with motility versus hemizona bound. *Hum Reprod* 15, 1529-1536, 2000.

Donnelly ET, O'Connell M, McClure N, Lewis SEM. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. *Human Reproduction*, Vol. 15, No. 7, 1552-1561, July 2000.

Emery BR, Carrell DT. The effect of epigenetic sperm abnormalities on early embryogenesis. *Asian J Androl* 8 (2), 131-142, 2006.

Evenson D, Jost L. Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability. *Methods Cell Biol*. 42 Pt B:159-76, 1994.

Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod*. 14(4):1039-49 Apr, 1999.

Evenson D, Jost L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods Cell Sci*. 22(2-3):169-89, 2000.

Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl*. 23(1):25-43 Jan-Feb, 2002.

Filatov MV, Semenova EV, Vorob'eva OA, Leont'eva AO, Drobchenko EA. Relationship between abnormal sperm chromatin packing and IVF results. *Mol Hum Reprod* 5, 825-830, 1999.

Fernandez JL, Gosalvez J. Application of FISH to detect DNA damage. DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH). *Methods Mol Biol*. 203:203-16, 2002.

Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl*. 24(1):59-66 Jan-Feb, 2003.

Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, Enciso M, Lafromboise M, De Jonge C. Simple determination of

- human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril*. 84(4):833-42 Oct, 2005.
- Greco E, Scarcelli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferreco S, Franco G, Anniballo N, Mendoza C, Tesarik J. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 20 (1), 226-230, 2005.
- Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 53, 1945-1951, 1993.
- Hammadeh ME, al-Hasani S, Stieber M, Rosenbaum P, Kupker D, Diedrich K, Schmidt W. The effect of chromatin condensation (aniline blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme. *Hum Reprod* 11, 2468-2471, 1996.
- Henkel R, Kierspel E, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Schill WB, Kruger TF. DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reprod Biomed Online*. 7(4):477-84, Oct-Nov 2003.
- Hoshi K, Katayose H, Yanagida K, Kimura Y, Sato A. The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. *Fertil Steril*. 66(4):634-9 Oct, 1996.
- Hsueh AJ, Eisenhauer K, Chun SY, Hsu SY, Billig H. Gonadal cell apoptosis. *Recent Prog Horm Res*. 51:433-55, 1996.
- Irvine DJ, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne P A, Aitken R J. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl*, 21:33-44, 2000.
- Janny L, Menezo YJR. Evidence of strong paternal effect on human preimplantation embryo development and blastocyst formation. *Mol Reprod Dev* 38, 36-42, 1994.
- Jonhson MH. The problematic in-vitro embryo in the age of epigenetics. *RBM Online* 10, 88-96, 2005.
- Kearns M, Preist J, Mcdonald M. Complex patterns of inheritance of imprinted murine suggest incomplete germ line erasure. *Nucleic Acids Reserch* 28, 3301-3309, 2000.
- Lamirande E, Leduc BE, Inasaki A, Hassouna M, Gagnon C. Increased reactive oxygen species formation in semen of patients with spinal cord injury. *Fertil Steril*, vol. 63 (3): 637-642, March 1995.
- Larson KL, Dejourge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 15, 1717-1722, 2000.
- Lewis SE, Aitken RJ. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res*. 2005 Oct; 322(1):33-41. Epub, Nov 2005.
- Manicardi GC, Bianchi PG, Pantana S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod*. 52(4):864-7, Apr 1995.
- Menckvelt R, Franken DR, Kruger TF, Oehninger S, Hodgen GD, Sperm selection capacity of human zona pellucida. *Mod Reprod Dev* 30 (4), 346-352, 1991.
- Moore KL, Persaud TVN. *Embriologia Clínica*. Ed. Elsevier, 7ª edição, 2004.
- Morris ID, Ilott S, Dixon L, Brison DR. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod*. 17(4):990-8, Apr 2002.
- Muriel L, Garrido N, Fernandez JL, Remohi J, Pellicer A, de los Santos MJ, Meseguer M.; Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 85(2):371-83. Feb 2006.
- Naaby-Hansen S, Flickinger CJ, Heer JC. Two-dimensional gel electrophoretic analysis of vectorially labeled surface proteins of human spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 56, 771-787, 1997.
- Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, Evenson D, Thomas AJ JR, Alvarez JG. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod*. 16(9):1912-21, Sep 2001.
- Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 30;123(1):291-8 Aug, 1984.
- Parinaud J, Mieusset R, Vieitez G. Influence of sperm parameters on embryo quality. *Fertil Steril* 60, 888-892, 1993.
- Pradon OF, Brackett NL, Sharma RK, Lynne CM, Thomas AJ, Agarwal A. Seminal reactive oxygen species and sperm motility and morphology in men with spinal cord injury. *Fertil Steril*, vol. 67 (6): 1115-1120, June 1997.
- de Robertis EMF, Hib J. *Bases da Biologia Celular e Molecular*. Ed. Guanabara Koogan, 4ª edição, 2006.
- Sailer BL, Jost LK, Evenson DP. Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *J Androl*, 16(1):80-7, Jan-Feb 1995.
- Sakkas D. The use of blastocyst culture to avoid inheritance of an abnormal paternal genome after ICSI. *Hum Reprod*, 14:4-5, 1999.
- Sakkas D, Manicardi GC, Bizzaro D, Bianchi PG. Possible consequences of performing intracytoplasmic spermatozoa injection (ICSI) with sperm possessing nuclear DNA damage. *Hum Fertil* 3, 26-30, 2000.
- Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod*. 4(1):31-7, Jan 1999.
- Sanchez R, Stalf T, Khanaga O, Turley H, Gips H, Schill WB. Sperm selection methods for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and andrological patients. *J Assist Reprod Genet* 13, 228-233, 1996.
- Schröter S, Osterhoff C, Mcardle W, Ivell R. The glycocalyx of the sperm surface. *Human Reproduction*. Update, 5 (4) 302-313, 1999.
- Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakkas D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 82(2):378-83, Aug 2004.
- Seli E, Sakkas D. Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. *Hum Reprod Update* 11 (4), 337-349, 2005.
- Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*, vol. 48: 835-850, 1996.
- Sharma RK, Said T, Agarwal A. Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome, *Asian J Androl*. 6(2):139-48, Jun 2004.
- Shoukir Y, Chardonens D, Campana A, Sakkas D. Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence? *Hum Reprod* 13, 1632-1637, 1998.
- singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 175(1):184-91 Mar, 1988.
- Skakkebaek NE, Giwercman A, Kritser D. Pathogenesis and management of male infertility. *Lancet* 343: 1473-9, 1994.

Sofikistis N, Miyagawa I, Yamamoto Y, Loutradis D, Mantzavinos T, Tarlatzis V. Human Reproduction Update, 4 (3), 197-212, 1998.

Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. Biol Reprod. 56, 602-607, 1997.

Tesarik J. Sperm nuclear DNA damage: update on the mechanism, diagnosis and treatment. RBM Online 12 (6), 715-721, 2006.

Tesarik J, Mendoza C, Greco E. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. Hum Reprod 17, 184-189, 2002.

Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation, Human Reproduction Vol.19, No.3 pp. 611-615, 2004.

Tesarik J, Kopecny V. Nucleic acid synthesis and development of human male pronucleus. J Reprod Fertil 86, 549-558, 1989.

Tesarik J, Kopecny V. Assembly of the nucleolar precursor bodies in human male pronuclei is correlated with an early RNA synthetic activity. Exp Cell Res 191, 153-156, 1990.

Tesarik J, Kopecny V, Plachot M, Mandelbaun J. Activation of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and changes in the ribosomal content of human embryos developing in vitro. J Reprod Fertil, 78: 463-70, 1986.

Tomsu M, Sharma V, Miller D. Embryo quality and IVF treatment outcomes may correlate with different sperm comet assay parameters. Hum Reprod 17, 1856-1862, 2002.

Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ. Oxidative damage to DNA human spermatozoa does not preclude the pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 13, 1864-1871, 1998.

World Health Organization - Who Laboratory manual for examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 1999.

Vanderzwalmen P, Berin-Segal G, Geertz L, Debauche C, Schoysman R. Sperm morphology and IVF pregnancy rate: comparison between Percoll gradient centrifugation and swim-up procedures. Hum Reprod 6, 581-588, 1991.

de Vos A, Van de Velde H, Joris H, Verheven G, Devroey P, Van Steirteghem A. Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. Fertility and Sterility, vol. 79, no. 1, January 2000.

Correspondências para:

Alessandro Schüffner
Avenida República Argentina, 210/17º andar
Curitiba – PR
CEP: 80240-210
e-mail: alessandro@clinicaconceber.com.br

Agradecimentos

À equipe da pós-graduação do Instituto Sapientiae de Ensino e Pesquisa



9º Taller General
Cancún | Abril | 2009

2009 Congresso Geral
Um encontro inesquecível
De 23 a 25 de abril

Participe você também dessa evolução
Informações e inscrições:
info@redlara.com

Aspectos imunológicos da falência ovariana prematura.

Premature ovarian failure: imunological aspects.

Érica Becker de Sousa Xavier, Ana Márcia de Miranda Cota, Renata Costa, Mário Moreira Murta, Leonardo Augusto Meyer de Moraes, João Pedro Junqueira Caetano

Clínica Pró-Criar/Mater Dei
Belo Horizonte

RESUMO

Falência ovariana prematura (FOP) é uma síndrome clínica de etiopatogenia variada, caracterizada pela interrupção da função ovariana antes dos 40 anos de idade, com incidência em torno de 0,9%. Pode ocorrer por disfunção folicular ou depleção dos folículos ovarianos. Há evidências de que a FOP possa ser causada também por um distúrbio auto-imune. Não há um padrão único de apresentação clínica. Apresenta um perfil hormonal de hipoestrogenismo hipergonadotrófico. As pacientes com disfunção folicular ainda têm folículos no ovário e podem retomar sua função ovariana e, conseqüentemente, sua fertilidade. A perda precoce da função ovariana tem implicações psicossociais e médicas. Nestes casos é necessária reposição hormonal para evitar efeitos deletérios causados pela deficiência precoce de hormônios esteróides. Para definirmos medidas preventivas, a fisiopatologia deve ser bem estabelecida. Sem dúvida, uma das maiores repercussões negativas da patologia encontra-se no campo da infertilidade.

Palavras-chave: ovário, imunologia; metabolismo.

ABSTRACT

Premature Ovarian Failure (POF) is a clinical syndrome with multiple causes. It is characterized by an interruption in ovarian function before the age of 40's. It's incidence is about 0,9%, and occurs as a consequence of follicular disfunction or because follicular exhaustion. There are evidences suggesting that POF can be part of an auto-immune disease. There is not an unique clinical pattern. These patients have hipergonadotrophic hipoestrogenism. The women with follicular disfunction still have ovarian follicles and can resume their ovarian function, and consequently, their fertility. POF has social, psychological and clinical impact. It's important to replace hormone to these patients. The POF's phisiopathology have to be

better understood for a more effective treatment. One of the worse consequences of this disturbance is in the fertility field.

Key words: ovary, follicular immunology, metabolism.

INTRODUÇÃO

Falência ovariana prematura (FOP) é considerada uma síndrome clínica definida por interrupção da função ovariana antes dos 40 anos de idade (amenorréia, hipoestrogenismo e níveis elevados de FSH). É um distúrbio de etiopatogenia variada, no qual alterações cromossômicas, genéticas, enzimáticas, imunológicas, iatrogênicas ou infecciosas podem estar envolvidas. Estas alterações podem acometer o ovário em qualquer estágio da vida (pré-puberal, puberal, reprodutivo). É importante observar que a definição da idade de 40 anos para o ponto de corte no diagnóstico de FOP é arbitrária. Se definirmos anormalidade como valores alterados em 2 ou mais desvios padrões em relação à idade média da menopausa, então a idade de 43 anos seria mais apropriada como idade mínima limite da menopausa natural (Hoek *et al.*, 1997).

A incidência de FOP na população é em torno de 0,9% (Coulam *et al.*, 1986) e de 0,1% abaixo de 30 anos (Kalan-taridou *et al.*, 1998). Em mulheres com amenorréia primária, sua prevalência é de 10 a 28% e de 4 a 18% em mulheres com amenorréia secundária (Anasti, 1998).

Há evidências de que alguns casos de FOP ocorrem devido a uma falha no reconhecimento do sistema imune do que é "self" e do que é "non-self", levando a um distúrbio de auto-imunidade ovariana. Estas evidências sugerem que alguns casos de FOP façam parte do grupo das doenças auto-imunes que afetam as glândulas produtoras de hormônios, definidas como endocrinopatias auto-imunes (Hoek *et al.*, 1997).

A perda precoce da função ovariana tem implicações psicossociais e médicas, sendo necessário o uso de reposição hormonal para evitar efeitos deletérios relacionados

à deficiência precoce dos hormônios esteróides (Kalantaridou *et al.*, 1998).

Histórico

Em 1939 foi feita a primeira observação com relação à presença de níveis elevados de FSH urinário em mulheres com “menopausa prematura”. O quadro clínico da síndrome foi descrito pela primeira vez em 1950 por Atria, o qual relatou casos de 20 mulheres com idade inferior a 35 anos em amenorréia secundária, apresentando fogachos, infertilidade e endométrio atrofico.

Em 1960, Hertz descreveu quatro casos de pacientes com níveis elevados de gonadotrofinas, mas numerosos folículos à biópsia ovariana (Anasti, 1998).

A FOP foi definida em 1967 por Moraes-Ruehsen e Jones como ausência não fisiológica da menstruação após a puberdade e antes da idade de 40 anos, sendo portanto uma amenorréia secundária. Estes autores relataram três casos de mulheres resistentes à terapia de indução da ovulação, resistência ovariana denominada como Síndrome de Savage, que era o nome de uma das pacientes (Hoek *et al.*, 1997).

Quadro Clínico

Manifesta-se como amenorréia secundária. Não há um padrão característico de apresentação clínica mas geralmente há história menstrual normal, idade habitual da menarca, seguida por ciclos regulares. O distúrbio pode se apresentar com oligomenorréia ou amenorréia abrupta, tendo um perfil hormonal de hipostrogenismo hipergonadotrófico (Hoek *et al.*, 1997). A idade do surgimento da falência ovariana depende, dentre outras variáveis, da velocidade do processo de atresia folicular (Sedmak *et al.*, 1987; Rebar and Cedars, 1992).

No início, a FOP foi considerada um evento irreversível e descrito como menopausa precoce. Entretanto, mulheres jovens com falência ovariana prematura e cariótipo normal podem apresentar função ovariana intermitente. Metade das pacientes apresentam fenômenos vasomotores decorrentes do hipostrogenismo, tais como fogachos e sudorese (Hoek *et al.*, 1997). Níveis séricos de FSH acima de 40UI/l eram associados à infertilidade permanente devido à ausência de folículos primordiais. Em 1992, Rebar e Cedars descreveram a ocorrência de ovulação em 5 pacientes com FSH > 40UI/l, sendo que uma engravidou (Rebar and Cedars, 1992). Desta forma, foi demonstrado que uma única dosagem de FSH > 40UI/l é insuficiente para o diagnóstico de depleção folicular.

Dinâmica Ovariana

A menopausa é, a princípio, um evento fisiológico. O número de folículos primordiais decresce com a idade e o desaparecimento destes no ovário é o evento responsável pelo término da função ovariana que ocorre nesta época (Hoek *et al.*, 1997).

Na 5ª semana de gestação, as células germinativas primordiais originam-se do saco vitelino próximas à origem do alantóide, migrando em seguida para as cristas gonadais. Estas células germinativas (oogônias) proliferam-se por mitose, alcançando o pico de 5 a 7 milhões

por volta da vigésima semana de gestação. A partir deste momento, as oogônias iniciam o processo de meiose, formando os oócitos primários, e o processo de atresia se inicia. Este processo de atresia ocorre principalmente pela morte programada da célula (apoptose). Ao nascimento, existem 1 a 2 milhões de células germinativas, ou seja, já ocorreu uma perda de mais de 80% do número inicial. No menacme, o número de oócitos é de cerca de apenas 300.000, sendo que destes apenas 400 a 500 irão se desenvolver completamente e ovular nos próximos 35 a 40 anos. O mecanismo pelo qual os folículos primordiais são ativados e entram no “pool” dos folículos primários ainda permanece obscuro (Anasti, 1998).

A partir do nascimento, a taxa de atresia folicular é relativamente constante até a idade de 37,5 anos, quando há 25.000 oócitos (Lobo, 2003). A partir daí, a atresia se acelera até a idade média da menopausa (51 anos), quando só restam 1.000 oócitos. A taxa de atresia acelerada na idade de 37-38 anos está geralmente associada com elevação do FSH e redução da fecundidade e com aumento da taxa de aneuploidia. O aumento do FSH implica em recrutamento excessivo, o que leva à perda acelerada de oócitos (Lobo, 2003). Não está clara a causa do aumento da taxa de atresia a partir dos 37,5 anos.

Neste ponto temos uma dissociação entre as funções endócrinas e gametogênicas do ovário. A primeira permanece inalterada enquanto uma perda acelerada ocorre no número e qualidade dos gametas.

Somente 10% das mulheres entram na menopausa antes de 45 anos e menos de 1% antes do 40 anos (McKinlay *et al.*, 1992).

Nikolaou e Templeton, em 2003, levantaram a hipótese de haver uma janela de 13 anos entre o início do processo acelerado de atresia folicular (38 anos) e a idade média da menopausa (51 anos) (Nikolaou and Templeton, 2003). Neste período, a fecundidade está reduzida, apesar da função endócrina inalterada. Com isso, se uma mulher entra na menopausa aos 45 anos, o processo de atresia acelerado se iniciou aos 32 anos de idade. Por isso, o tratamento da infertilidade deve ser precoce para se prevenir a falência reprodutiva (Lobo, 2003). A premissa é interessante, mas ainda não tem aplicabilidade prática, apesar de ter trazido importantes questionamentos para estudos futuros.

Quadro 1

<p>Disfunção Folicular auto-imunidade anormalidades nos receptores gonadotrópicos deficiências enzimáticas (colesterol desmolase, 17α-hidroxilase e 17-20 desmolase) iatrogênica (quimioterapia, radiação) idiopática</p> <p>Depleção Folicular anormalidades do cromossomo X mutação no DNA mitocondrial galactosemia agentes virais iatrogênica (quimioterapia, radiação) idiopática</p>

Adaptado de Kalantaridou *et al.*, 1998.

Etiologia

A FOP ocorre por disfunção folicular ou depleção dos folículos ovarianos. Pacientes com disfunção folicular ainda têm folículos no ovário e podem ser capazes de retomar sua fertilidade (Quadro 1)

Auto-imunidade

O fator imune é reconhecido como um mecanismo de falência ovariana. A ooforite auto-imune pode ocorrer por meio de uma resposta celular ou humoral. Esta parece ser a causa dominante de FOP reversível (Kalantaridou *et al.*, 1998).

A FOP pode se apresentar como componente da Síndrome Auto-Imune Poliglandular em associação com Doença de Addison, hipotireoidismo, hipoparatiroidismo ou candidíase mucocutânea (Anasti, 1998).

Anormalidades nos receptores gonadotróficos

Segundo Takebayashi e cols. (Qin Wang *et al.*, 2002), em seu artigo que avaliou mutações nos genes do Hormônio anti-Mülleriano e seu receptor nas células da granulosa ovariana, tais mutações são observadas tanto em pacientes com FOP quanto naquelas com SOP, embora não sejam frequentes.

Deficiências enzimáticas

As deficiências enzimáticas de colesterol desmolase, 17 α -hidroxilase, 17-20 desmolase impedem a síntese estrogênica e levam à amenorréia e falência no desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários, apesar da presença de folículos ovarianos. A deficiência de colesterol desmolase resulta na ausência de síntese de hormônios esteróides. Estas pacientes raramente têm sobrevida longa. Pacientes com deficiência de 17 α -hidroxilase desenvolvem hipertensão, hipocalemia e falência ovariana secundária à falência da esteroidogênese adrenal e ovariana.

Apesar de serem ambas catalizadas pelo complexo citocromo p450, pacientes podem ter deficiência de 17-20 desmolase sem deficiência concomitante de 17 α -hidroxilase. Estas pacientes têm falência da função ovariana com função adrenal normal (Kalantaridou *et al.*, 1998; Anasti, 1998).

Iatrogênica

Pode ocorrer a destruição iatrogênica dos folículos por agressão física, como radioterapia, quimioterapia, cirurgias ovarianas. O risco de FOP em quimioterapia depende da idade da paciente, tipo da droga, dose e duração do tratamento (Kalantaridou *et al.*, 1998). Geralmente a paciente mais jovem é mais resistente aos efeitos gonadotóxicos dos agentes quimioterápicos. Apesar do desenvolvimento de amenorréia e elevação das gonadotrofinas, em algumas pacientes jovens a função ovariana retorna. O risco de falência ovariana pela radioterapia também depende da idade da paciente e da dose recebida. Fator importante é a posição dos ovários em relação ao campo de irradiação (Stillman *et al.*, 1981).

Pode ocorrer FOP após cirurgias que lesem o ovário,

causando depleção folicular acelerada. Nestes casos, o aparecimento de FOP está relacionado ao dano tecidual.

Anormalidades do cromossoma X

A anormalidade cromossômica mais comum em mulheres com FOP é o mosaicismismo do cromossomo X (45XO/46XX; 46XX/47XXX). Anormalidades cromossômicas são detectadas em 40% a 50% das pacientes com amenorréia primária (Kalantaridou *et al.*, 1998). Em fetos com cromossomo X único (Síndrome de Turner, 45XO), há desenvolvimento ovariano normal intra-útero, mas um processo de atresia folicular acelerado leva à FOP (Singh and Carr, 1966). Ambos os cromossomos X têm que estar presentes para se evitar esta atresia acelerada.

A localização do centro de inativação no cromossomo X humano é em Xq13. Deleções ou mutações perto de Xq13 podem iniciar o centro de inativação X e causar um fenótipo "Turner-like" (Kalantaridou *et al.*, 1998).

Mutação no DNA mitocondrial

Lee *et al.*, ao analisar as mutações de DNA mitocondrial, encontraram 83,2% de mutação linear, 5,2% transversas, e, ainda, raros os casos de deleção ou inserção. A alta incidência de FOP em parentes das mães das pacientes acometidas indica o possível envolvimento do DNA mitocondrial em sua fisiopatologia (Lee *et al.*, 2005).

Galactosemia

É um distúrbio autossômico recessivo raro, resultante da deficiência da enzima galactose-1-fosfato uridil transferase (GALT). Existe uma associação de FOP com galactosemia, mas a fisiopatologia deste evento é indefinida.

Chen *et al.*, em 1981, sugeriram que a ocorrência de FOP nestas pacientes seria causada pela diminuição no número inicial de oogônias induzida pela galactose (Chen *et al.*, 1981). Entretanto, em 1984, Levy *et al.*, em um relato de autópsia de uma neonata que tinha galactosemia, revelaram histologia ovariana habitual, deduzindo que a atresia folicular acelerada ocorria após o nascimento e antes da puberdade (Levy *et al.*, 1984). Há relato de alteração do FSH e de sua ação nas pacientes com galactosemia (Prestoz *et al.*, 1997), embora outros tenham encontrado ação normal das gonadotrofinas (Kaufman *et al.*, 1994). Portanto, o mecanismo exato da FOP causada pela galactosemia ainda está para ser esclarecido (Anasti, 1998).

Agentes infecciosos

Ooforite por caxumba é descrita como etiologia da falência ovariana prematura (Kalantaridou *et al.*, 1998).

Diagnóstico

São importantes anamnese e exame físico detalhados, além da dosagem de gonadotrofinas. Deve-se questionar sobre passado de cirurgia ovariana, radioterapia e quimioterapia, para excluir causa iatrogênica. Deve-se também prestar atenção à história de doenças auto-

imunes. Perda de peso, anorexia, dores abdominais, fraqueza, aumento da pigmentação da pele são sinais que sugerem Doença de Addison.

Na história familiar, questionar sobre a ocorrência de Doença de Addison, tireoidopatia, Diabetes Melitus, Lupus Eritematoso Sistêmico, artrite reumatóide, vitiligo, Doença de Crohn, Síndrome de Sjögren e FOP.

O nível de FSH é desproporcionalmente maior que o de LH. Deve-se realizar mais de uma dosagem de gonadotrofinas, pois seus níveis são flutuantes. Estas pacientes produzem estrogênios intermitentemente e podem ovular apesar das gonadotrofinas elevadas (Kalantaridou *et al.*, 1998). Com este retorno transitório da função ovulatória existe a possibilidade de gestação (Hoek *et al.*, 1997).

Os exames laboratoriais importantes para o diagnóstico de FOP são: pelo menos duas medidas séricas de FSH > 40 UI/l; cariótipo (naquelas pacientes com menos de 35 anos); rastreamento de alterações auto-imunes. No sentido de rastrear doenças auto-imunes deve-se solicitar: TSH, T4 livre, glicemia de jejum, cálcio, fosfato, vitamina B12, anticorpo antinuclear, fator reumatóide (Anasti, 1998).

Kinch *et al.*, em 1965, foram os primeiros a identificar dois tipos histopatológicos de falência ovariana prematura: um folicular e um afolicular (Kinch *et al.*, 1965). Na forma afolicular, há depleção total dos folículos ovarianos e, portanto, perda permanente da função ovariana. Na forma folicular, as estruturas foliculares ainda estão preservadas e há, portanto, possibilidade de retorno espontâneo ou induzido da função ovariana. Esta forma se subdivide em: ovários com poucos folículos presentes e ovários com numerosos folículos primordiais (Síndrome de Savage). Algumas formas foliculares podem progredir para a forma afolicular. Auto-imunidade ovariana é uma possível causa tanto para a forma afolicular quanto para a forma folicular. Mehta *et al.*, em 1992, fizeram um estudo com avaliação ultra-sonográfica de 17 mulheres com FOP e 20 mulheres na pós menopausa e observaram folículos ovarianos em 41% das pacientes com FOP e folículos de apenas 2 mm em 5% das pacientes na pós menopausa (Mehta *et al.*, 1992). Este estudo corroborou a idéia de uma forma folicular da FOP.

A menopausa normal é uma condição irreversível, enquanto a FOP caracteriza-se por função ovariana intermitente em metade dos casos (Kalantaridou *et al.*, 1998). Geralmente as pacientes com FOP têm fertilidade normal antes de desenvolverem a síndrome, isto é, desenvolveriam infertilidade secundária (Sedmak *et al.*, 1987; Rebar and Cedars, 1992).

A FOP pode estar associada a desordens endócrinas auto-imunes, tais como falência adrenal auto-imune (Doença de Addison), Diabetes Melitus, hipotireoidismo (Kalantaridou *et al.*, 1998).

ASPECTOS IMUNOLÓGICOS

a- A Resposta Imune

A função mais importante do sistema imune é a discriminação entre "self" e "non-self". Em algumas patologias

o reconhecimento do "próprio" é perdido e o sistema imune inicia um ataque a ele, levando às chamadas doenças auto-imunes. Alguns casos de FOP se devem a um reconhecimento errado do ovário como "não-próprio" pelo sistema imune.

A resposta imunológica contra os antígenos reconhecidos como "não-próprios" inicia-se com a apresentação destes para os linfócitos T. Estes antígenos só podem ser apresentados aos linfócitos T se estiverem ligados ao complexo de histocompatibilidade principal (MHC), que está presente nas células apresentadoras de antígenos (principalmente os macrófagos). Existem duas classes de expressão do MHC: I e II. Antígenos associados ao MHC II só podem ser apresentados ao linfócito T CD4, enquanto os associados ao MHC I são apresentados aos linfócitos T CD8 (Hoek *et al.*, 1997).

Os linfócitos CD8 (citotóxicos) são responsáveis pela resposta imune celular, ao passo que os linfócitos CD4 (*Helper*) são responsáveis principalmente pela resposta humoral, mas também modulam a resposta celular. Os linfócitos CD4 são classificados em subgrupos dependendo das citocinas que produzem:

- Th1: produz citocinas que estimulam os macrófagos e conseqüentemente a imunidade celular.

- Th2: produz citocinas que estimulam os linfócitos B e conseqüentemente levam a uma resposta imune humoral.

Quando estimulados pelos linfócitos T CD4 Th2, os linfócitos B se diferenciam e iniciam a produção de imunoglobulinas específicas (anticorpos). Os anticorpos possuem uma importante função na neutralização e opsonização dos antígenos pelos macrófagos. Os anticorpos são produzidos em diferentes isotipos (IgA, IgG, IgM, IgE, IgD) (Hoek *et al.*, 1997).

As células efetivas na resposta imune são os macrófagos, células NK (*natural killer*) e os linfócitos CD8. Os macrófagos são capazes de fagocitose com melhora através da opsonização que aumenta sua eficiência na destruição dos antígenos. A principal função das células NK é promover uma atividade citotóxica não-específica contra células infectadas por vírus e células tumorais. Os linfócitos citotóxicos (CD8) agem também contra células tumorais e células infectadas por vírus (Hoek *et al.*, 1997).

b – Imunologia da FOP

Há doenças que apresentam falência de órgãos endócrinos semelhante à FOP que são classificadas como doenças auto-imunes destrutivas. Estas incluem o hipotireoidismo, Diabetes Melitus insulino-dependente (falência das ilhotas de Langerhans), Doença de Addison (falência do córtex adrenal). Alterações no sistema imune podem induzir à FOP secundária a uma depleção folicular ou a uma ruptura da função ovariana normal.

Existem evidências de uma causa imunológica para FOP:

Presença de anticorpos circulantes

Presença dos anticorpos associados às síndromes citadas anteriormente, tais como: anticorpo anti-nuclear, fator

reumatóide, anticorpo anti-microsomal (Anasti, 1998). Anticorpos anti-ovarianos: os trabalhos variam muito quanto ao relato da incidência destes anticorpos em pacientes com FOP. O significado clínico destes permanece indeterminado (Anasti, 1998).

Evidência histológica de ooforite

Hoek *et al.*, em 1997, demonstraram que em 215 biópsias ovarianas realizadas em pacientes com FOP, 11% apresentavam evidências histológicas de ooforite. A análise imunohistoquímica da ooforite revelou que as células inflamatórias eram principalmente Linfócitos T (CD4 e CD8), poucos linfócitos B, macrófagos, células NK (Hoek *et al.*, 1997).

Associação com etiologias infecciosas

Em seu estudo, Rebar e Connolly (1990) relataram que 3,5% das pacientes com FOP haviam tido uma infecção anterior como varicela, malária, shigelose (Rebar and Connolly, 1990). A verdadeira incidência de FOP causada por infecção viral é desconhecida.

Segundo Kalantaridou *et al.*, ooforite por caxumba tem sido relatada como uma rara causa de FOP (Kalantaridou *et al.*, 1998). Pacientes com ooforite por caxumba devem ser orientadas que, na maioria dos casos, após a recuperação da caxumba, espera-se a retomada da função ovariana normal.

Alteração da imunidade mediada por células (imunidade celular)

Aumento na atividade das células T (células que expressam o MHC II) é achado comum na FOP. Este achado tem sido descrito em outras desordens endócrinas imunológicas, o que sugere uma patologia similar em pacientes com FOP (Anasti, 1998).

Alguns estudos indicam diminuição no número de células NK em pacientes com FOP. Esta diminuição pode influenciar os linfócitos B e T, resultando em aumento na produção de autoanticorpos, o qual levaria ao dano tecidual (Anasti, 1998).

Retorno da função ovariana após terapias imunossupressivas Morris e Sauer descreveram retorno da função ovariana após resolução da doença auto-imune concomitante e/ou com tratamento imunossupressor (corticóide) (Morris and Sauer, 1993).

Experimentos que induzem a FOP através de timectomia

Em 1969, Nishizuka e Sakakura foram os primeiros a descreverem a ocorrência de disgenesia ovariana em ratos submetidos a timectomia (Nishizuka and Sakakura, 1969). Outras alterações imunológicas foram observadas, incluindo alterações na tireóide e hipófise. A fisiopatologia para explicar tal fato é a perda da regulação e/ou supressão pelos linfócitos T CD4.

Associação com outras doenças auto-imunes

Síndrome de Addison: 10% das pacientes com esta síndrome desenvolvem FOP 8 a 14 anos antes da disfunção supra-renal. A doença de Addison raramente se desenvolve isoladamente; na maioria das vezes,

está associada a outras alterações endócrinas, sendo esta entidade conhecida como Síndrome da Falência Poliglandular Autoimune (SFPA), a qual acomete cerca de 3% das pacientes com FOP (Betterle *et al.*, 1993).

Existem duas formas desta Síndrome:

- SFPA tipo I: afeta principalmente crianças e é caracterizada pela associação de candidíase mucocutânea, hipoparatiroidismo e doença de Addison. FOP como forma de amenorréia primária ocorre em cerca de 60% destas pacientes;

- SFPA tipo II: associação da falência da supra-renal com o hipotireoidismo. Acomete indivíduos na 3ª e 4ª década, principalmente mulheres. Nesta síndrome somente 25% das mulheres apresentam amenorréia e 10% têm FOP clássica (Anasti, 1998).

c - FOP em associação à Doença de Addison e/ou auto-imunidade adrenal

A suposição de que a auto-imunidade poderia ser responsável pela falência ovariana veio da observação de que a FOP poderia preceder o início da Doença de Addison em 8-14 anos (Hoek *et al.*, 1997). A Doença de Addison é um distúrbio incomum causado pela deficiência de hormônios adrenocorticais, com maior prevalência ao redor dos 40 anos e no sexo feminino. A Doença de Addison auto-imune raramente se desenvolve como um distúrbio isolado. Geralmente várias outras glândulas e órgãos são afetados, levando a uma síndrome auto-imune poliglandular. Nos anos 70 foram descobertos os auto-anticorpos contra o córtex adrenal. Duas variedades destes anticorpos foram descritas: um com reatividade contra as três camadas do córtex adrenal; outro também reagindo contra antígenos citoplasmáticos de outras células produtoras de esteróides presentes nos ovários, testículos e placenta. Esta última sub-variedade, denominada anticorpos anti-células esteroidais, são do tipo IgG (Hoek *et al.*, 1997).

No acompanhamento de pacientes com Doença de Addison e anticorpos anti-células esteroidais positivos, cerca de 40% dos pacientes do sexo feminino desenvolvem a FOP em um período de 10-15 anos, enquanto que no sexo masculino estes anticorpos não levam à falência gonadal (Hoek *et al.*, 1997).

Além dos auto-anticorpos, outra evidência para considerar como portadoras de doença auto-imune as pacientes com FOP e com estes anticorpos positivos seria a histologia das lesões ovarianas. Todas as pacientes com anticorpos anti-células esteroidais positivos apresentam ooforite linfocítica (Hoek *et al.*, 1997).

Portanto, podemos dizer, com relativa certeza, que a FOP, na presença da Doença de Addison e/ou auto-imunidade adrenal (2-10% dos casos), é um distúrbio endócrino auto-imune. Esta afirmação se baseia: 1) na presença de auto-anticorpos contra células produtoras de esteróides; 2) na caracterização de auto-antígenos comuns entre células produtoras de esteróides adrenais e ovarianas; 3) no quadro histológico ovariano (infiltrado linfoplasmocelular particularmente em torno das células produtoras de esteróides) (Hoek *et al.*, 1997).

d – Sinais de auto-imunidade ovariana em pacientes sem Doença de Addison e/ou auto-imunidade adrenal

A maioria das pacientes com FOP não apresenta associação com a Doença de Addison (falência da supra-renal). Neste grupo, a coexistência de outras síndromes auto-imunes ocorre em 0 a 53% dos casos (Kim *et al.*, 1997). As síndromes auto-imunes mais freqüentemente associadas são: hipotireoidismo (14 a 27% – a mais comum associação); Diabetes melitus (2,5%); miastenia gravis (2%); Doença de Crohn; Vitiligo; Anemia Perniciosa; Lupus Eritematoso Sistêmico; Artrite Reumatóide; Púrpura Trombocitopênica Idiopática (Kim *et al.*, 1997).

Aproximadamente em 60% destes casos de FOP não existem folículos ovarianos, observando-se ovários fibróticos. Em 40% dos casos, detecta-se número variado de folículos. Dentre os casos foliculares, 10% apresentam numerosos folículos e pertencerão à categoria da Síndrome de Resistência Ovariana (SRO) ou Síndrome de Savage (Hoek *et al.*, 1997).

Perspectivas Futuras

Ainda há muito o quê se pesquisar e descobrir com relação à FOP. Para definirmos tratamentos efetivos, a fisiopatologia deve ser bem estabelecida. Sem dúvida, uma das maiores repercussões negativas da patologia encontra-se no campo da fertilidade.

A evolução da ciência na área da infertilidade permitiu que, atualmente, mesmo pacientes com FOP afolicular sejam capazes de conceber através da fertilização *in vitro* (FIV) com ovodoação. Isto traz uma repercussão positiva importante sobre os aspectos psicológicos da FOP. Tais pacientes devem ser rastreadas para insuficiência adrenal e hipotireoidismo, associações relativamente comuns, e tratadas, quando necessário, antes de qualquer técnica de reprodução assistida (Lawrence *et al.*, 2005).

Os efeitos deletérios causados pela ausência estrogênica precoce nestas pacientes devem ser evitados através de reposição hormonal (TRH) até a idade usual da menopausa (Lawrence *et al.*, 2005). A TRH não previne a concepção, havendo inclusive relato de gravidez durante ou após estrogênioterapia, talvez por uma ativação dos receptores de FSH nos folículos pelo uso de estrogênio (Melo *et al.*, 1999).

Nas pacientes que serão submetidas a estimulação ovariana, o pré-tratamento com estrogênio pode melhorar os resultados. Num estudo duplo-cego, randomizado, placebo-controlado, as mulheres que receberam 0.05 mg de Etinilestradiol, 3 vezes por semana, 2 semanas antes e durante a hiperestimulação, apresentaram maiores taxas de ovulação e gravidez do que o grupo que recebeu placebo. Além disso, o grupo do E2 apresentou níveis de FSH pré-estimulação significativamente mais baixos, e, notadamente, a induções foram mais bem sucedidas nas pctes com FSH pós- E2 \leq 15 mUI/ml (Tartagni *et al.*, 2007).

Estão em andamento pesquisas sobre criopreservação de oócitos ou até mesmo de tecido ovariano. O suce-

so destes projetos traria possibilidade de propormos às pacientes com fatores de risco detectáveis para a FOP uma forma de armazenar oócitos ou tecido ovariano para uma gestação futura com seu próprio material genético.

A apoptose no ovário é responsável pela perda de 90% do *pool* oocitário inicial no curso de 13 anos, 80% da qual ocorre antes do nascimento (Anasti, 1998). Entender o mecanismo de controle da morte celular programada seria de grande valia na compreensão da fisiopatologia da FOP.

Referências Bibliográficas

- Anasti JN. Premature Ovarian Failure: an update. *Fertil Steril* 1998; 70:1-15.
- Betterle C, Rossi A, Dalla Pria S, Artifoni A, Pedini B, Gavasso S, *et al.* Premature ovarian failure: autoimmunity and natural history. *Clin Endocrinol* 1993; 39:35-43.
- Chen YT, Mattison DR, Feigenbaum I, Fukui H, Shulman JD. Reduction in oocyte number following prenatal exposure to a diet high in galactose. *Science* 1981; 214:1145-7.
- Coulam CB, Bustillo M, Schulman JD. Empty follicle syndrome. *Fertil Steril* 1986; 46:1153-5.
- De Moraes-Ruehsen M, Jones GS. Premature ovarian failure. *Fertil Steril* 1967; 18:440-61.
- Hoek A, Schoemaker J, Drexhage HA. Premature Ovarian Failure and Ovarian Autoimmunity. *Endocr Rev* 1997; 18:107-34.
- Kalantaridou SN, Davis SR, Nelson LM. Premature ovarian failure. *Endocrinol Metabolism Clin North Am* 1998; 27:989-1007.
- KaufmanFR, Reichardt Jk, Ng WG, Xu YK, Manis FR, McBride-Chang C, *et al.* Correlation of cognitive, neurologic, and ovarian outcome with the Q188R mutation of the galactose-1-phosphate uridylyltransferase gene. *J Pediatr* 1994; 125:225-7.
- Kim TJ, Anasti JN, Flack MR, Kimzey LM, Defensor RA, Nelson LM. Routine endocrine screening for patients with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 1997; 89:777-9.
- Kinch RAH, Plunkett ER, Smout MS, Carr DH. Primary ovarian failure: a clinicopathological and cytogenetic study. *Am J Obstet Gynecol* 1965; 91:630-41.
- Lawrence NM., Covington SN, Rebar RW. An update: spontaneous premature ovarian failure is not an early menopause. *Fertil Steril* 2005; 83: 1327-32.
- Levy HL, Driscoll SG, Porensky RS, Wender DF. Ovarian failure in galactosemia. *N Engl J Med* 1984; 310(1):50.
- Lobo, RA. Early Ovarian Aging: a hypothesis. What is early ovarian ageing? *Hum Reprod* 2003; 18:1762-4.
- McKinlay SM, Brambilla DJ, Posner JG. The Normal Menopause Transition. *Maturitas* 1992; 2:157-60.
- Mehta AE, Matwijiw I, Lyons EA, Fairman C. Noninvasive diagnosis of resistant ovary syndrome by ultrasonography. *Fertil Steril* 1992; 57:56-61.
- Melo MAB, Lage EM, Souza EB, Barcelos TB, Marinho RM. Falência Ovariana Prematura e gravidez. *Reprodução e Climatério* 1999; 14:204-6.
- Morris RS, Sauer MV. New advances in the treatment of infertility in women with ovarian failure. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1993; 5:368-77.
- Nikolaou D, Templeton A. Early ovarian ageing: a hypothesis. Detection and clinical relevance. *Hum Reprod* 2003; 18:1137-9.

Nishizuka Y, Sakakura T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 1969; 166:753-5.

Prestoz LL, Couto AS, Shin YS, Petry KG. Altered follicle stimulating hormone isoforms in female galactosaemia patients. *Eur J Pediatr* 1997; 156: 116-20.

Wang HQ., Takakura K., Takebayashi K., Noda Y. Mutational analysis of the mullerian-inhibiting substance gene and its receptor gene in Japanese women with polycystic ovary syndrome and premature ovarian failure. *Fertil Steril* 2002, 78: 1329-30.

Rebar RW, Cedars MI. Hypergonadotropic forms of amenorrhea in young women. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1992; 21:173-91.

Rebar RW, Connolly HV. Clinical features of young women with

hypergonadotropic amenorrhea. *Fertil Steril* 1990; 53:804-10.
Sedmak DD, Hart WR, Tubbs RR. Autoimmune oophoritis: a histopathologic study of involved ovaries with immunologic characterization of the mononuclear cell infiltrate. *Int J Gynecol Pathol* 1987; 6:73-81.

Singh RP, Carr DH. The anatomy and histology of XO human embryos and fetuses. *Anat Rec* 1966; 155:369-84.

Stillman RJ, Schinfeld JS, Schiff I, Gelber RD, Greenberger J, Larson M, *et al.* Ovarian failure in long-term survivors of childhood malignancy. *Am J Obstet Gynecol* 1981; 139:62-6.

Tartagni M, Cicinelli E, De Pergola G, De Salvia MA, Lavopa C, Loverro G. Effects of pretreatment with estrogens on ovarian stimulation with gonadotropins in women with premature ovarian failure: a randomized, placebo-controlled trial. *Fertil Steril* 2007, 87: 858- 61

2009 Congresso Brasileiro De Reprodução Assistida

Agosto de 2009 Curitiba, PR

AGENDA DE EVENTOS PARA 2009

FEVEREIRO

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

MARÇO

11 a 14/03 - 2009 APGO/CREOG

ABRIL

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

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

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



Conheça a Red-Lara www.redlara.com

MAIO

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

JUNHO

5 a 6/06 - Joint Meeting ALMER (Ex-FLASEF) - ASRM - REDLARA Advances in Reproductive Medicine

Mercure Grand Hotel International - Foz do Iguaçu - PR

Plenarium Organização de Eventos

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

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

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



Red Latinoamericana de
Reproducción Asistida



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

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

AGOSTO

Agosto - Congresso Brasileiro de Reprodução Assistida (SBRA)

SETEMBRO

24 - 26/09 - American Urogynecologic Society

OUTUBRO

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

NOVEMBRO

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



SBRA

**SOCIEDADE BRASILEIRA DE
REPRODUÇÃO ASSISTIDA**

Venha para a SBRA! Para ser sócio da SBRA:

**1- Link na pagina www.sbra.com.br, novos sócios,
seguida de emissão de boleto bancário**

**2- depósito direto na conta da sociedade:
R\$ 190,00:0 depósito identificado em conta corrente –
Banco do Brasil Ag 3478-9 conta 24886-X
– SOCIEDADE BRASILEIRA DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA.
Neste caso, notificar a Secretaria virtual pelo site,
preenchendo o re-cadastramento.**

**Benefícios aos Associados:
Recebimento do Jornal SBRA
Desconto na Inscrição para
as reuniões anuais da SBRA**

UTROGESTAN®

progesterona natural
micronizada

Quando a
fertilidade se
transforma em
maternidade.



Fertilidade

- Indução da Ovulação⁽¹⁾
- Insuficiência Lútea^(1,2,3)
- Inseminação Intra-uterina^(3,4)
- FIV e ICSI^(1,5,6,7)

Gestação

- Ameaça de Aborto^(1,2)
- Abortamento Habitual^(2,3,8)

Referências: (1) Tavaniotou A, Smiltz J, Bourgain C, Devroey P. Comparison between different routes of progesterone administration as luteal phase support in infertility treatments. *Human Reproduction Update* 2000; Vol. 6 Nº 2 pp. 139-148. (2) Di Renzo GC. Progesterone and pregnancy. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2005;17(6):598-600. (3) Daya S, Ward S, Burrows E. Progesterone profiles in luteal phase defect cycles and outcome of progesterone treatment in patients with recurrent spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 1988;158: 225-30. (4) Fitzpatrick LA, Good A. Micronized progesterone: clinical indications and comparison with current treatments. *Fertil Steril.* 1999; 72:389-397. (5) Roman E, et al. Analysis of the bleeding pattern in assisted reproduction cycles with luteal phase supplementation using vaginal micronized progesterone. *Human Reprod.* 2000; 15:1435-1439. (6) Friedler S, et al. Luteal support with micronized progesterone following in vitro fertilization using a down-regulation protocol with gonadotrophin-releasing hormone agonist: a comparative study between vaginal and oral administration. *Human Reprod.* 1999;14:1944-1948. (7) Smiltz J, et al. A prospective randomized comparison of intramuscular or intravaginal natural progesterone as a luteal phase and early pregnancy supplement. *Human Reprod* 1992; 7:168-175. (8) Daya S. Efficacy of progesterone support for pregnancy in women with recurrent miscarriage. A meta-analysis of controlled trials. *Br J Obstet Gynecol* 1989; 96: 275-80.

UTROGESTAN® - progesterona natural micronizada - USO ADULTO - **Composição:** Cada cápsula contém progesterona 100 mg ou 200 mg; excipientes qsp. **Indicações:** UTROGESTAN® é indicado para os distúrbios relacionados à deficiência de progesterona, como alterações do ciclo menstrual e amenorreia secundária; na insuficiência lútea; na pré-menopausa e na reposição hormonal da menopausa (como complemento à terapia estrogênica). UTROGESTAN® via vaginal é indicado também na implantação do embrião e manutenção da gravidez durante o primeiro trimestre e como suporte da fase lútea durante os ciclos de reprodução assistida. **Contra-indicações:** Este medicamento é contra-indicado em doenças graves do fígado. Hipersensibilidade do princípio ativo ou a qualquer outro componente da fórmula. **Precauções:** Alterações leves ou moderadas da função hepática, pacientes com disfunção renal. **Advertências:** Este medicamento não trata todas as causas de aborto espontâneo precoce e, particularmente, ele não tem ação sobre abortos provenientes de defeitos genéticos (o que corresponde a mais da metade das causas de aborto). **Pacientes idosos:** Não há dados que indiquem a necessidade do ajuste de dose para a paciente idosa. **Gravidez - Amamentação:** Nenhuma relação entre a progesterona e malformações fetais foi observada durante diversos estudos epidemiológicos em mais de mil pacientes. **Interações medicamentosas:** o uso crônico de barbitúricos, carbamazepinas, hidantoínas ou rifampicina pode diminuir a eficácia de UTROGESTAN®. Por outro lado, UTROGESTAN® pode potencializar os efeitos farmacológicos da ciclosporina, teofilina ou beta-bloqueadores. **Posologia:** Via Oral: Na insuficiência de progesterona, na insuficiência lútea o regime de tratamento usual é de 200 mg por dia: → 10 dias por ciclo, habitualmente do 17º dia ao 26º dia, inclusive. Em terapia de reposição hormonal para menopausa, a terapia estrogênica isolada não é recomendada (risco de hiperplasia endometrial). Consequentemente, a progesterona é combinada em dose de 200 mg por dia, da seguinte forma: → dose única de 200 mg à noite antes de dormir, de 12 a 14 dias por mês. Na dose de 200 mg é comum observar-se um sangramento de privação após o uso da progesterona. Via vaginal: Cada cápsula gelatinosa deve ser introduzida profundamente na vagina. Suplementação da fase lútea (segunda fase do ciclo menstrual) durante ciclos de FIV: A dosagem recomendada é de 400 a 600 mg por dia, divididos em duas a três doses, do dia da injeção HCG até a 12ª semana de gravidez. Suplementação da fase lútea durante ciclos espontâneos ou induzidos: A dosagem recomendada é de 200 a 400 mg por dia, divididos em duas doses, a partir do 17º dia do ciclo, durante 10 dias. O tratamento será rapidamente reiniciado se a menstruação não ocorrer novamente e, sendo diagnosticada uma gravidez, até a 12ª semana desta. Ameaça de aborto precoce ou prevenção de aborto comum devido à insuficiência lútea: A dosagem recomendada é de 200 a 400 mg por dia divididos em duas doses até a 12ª semana de gravidez. **Forma farmacêutica e apresentações:** UTROGESTAN® 200 mg é apresentado em caixas contendo blister com 14 cápsulas gelatinosas. UTROGESTAN® 100 mg é apresentado em caixas contendo blister com 30 cápsulas gelatinosas. **VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA.** Registro no M.S. 1.0390.0167. Farm. Resp. - Dra. Marcia Weiss I. Campos - CRF-RJ nº 4499. Fabricado por: CAPSUGEL, PLOERMEL, Zone Industrielle Camagnon, B. P. 320 - 56803 Poermel Cedex - Embalado por: Laboratórios Besins International Bélgica. Distribuído por: FARMOQUÍMICA S/A. Rua Viúva Cláudio, 300 - Rio de Janeiro - RJ. Indústria Brasileira - CNPJ: 33.349.473/0003-10 - SAC 0800 25 01 10 - Para ver o texto de bula na íntegra, acesse o site www.fqm.com.br

A PERSISTIREM OS SINTOMAS, O MÉDICO DEVERÁ SER CONSULTADO.





Uma das coisas mais bonitas
da vida é fazê-la acontecer.

A fecundação é uma dádiva.
E embora nem sempre possa ser
de forma natural, é um momento
onde afeto e responsabilidade são
os principais fatores. A Meizler
Biopharma já contribuiu para tornar
esse sonho possível a milhares de
casais por meio de suas linhas de
reprodução humana. E isso inclui
não apenas os medicamentos, mas
todo o suporte necessário a algo
tão importante como a formação
de uma nova vida.

expanding

www.meizler.com.br

SAC: 0800 166 613

Matriz / Headquarter
Al. Juruá, 149 - Alphaville
Barueri, SP - 06455-901 - Brasil
Tel (+55 -11) 4195.6613

Filial / Branch
Av. Vera Cruz, 463 - Jardim Guanabara
Goiânia, GO - 74675-830 - Brasil
Tel (+55 -62) 3207.2800


Meizler
BIOPHARMA S/A