

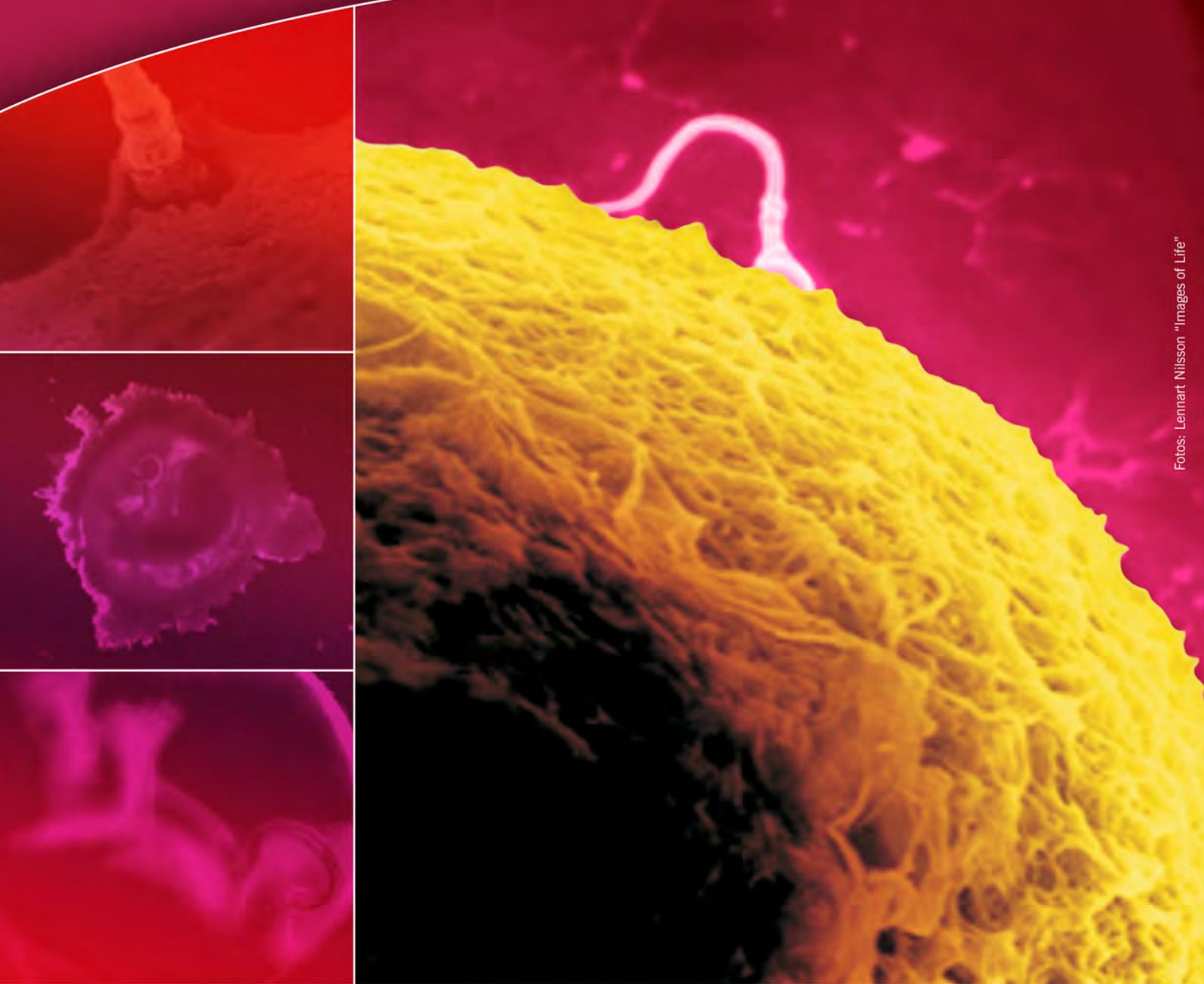
Volume 14  
Number 3  
Jul-Aug-Sep 2010  
ISSN 1517-5693

# JBRA

## Assisted Reproduction



JORNAL BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA



*Veja a  
obra de arte  
que fizemos  
juntos.*



*Fertilidade.*

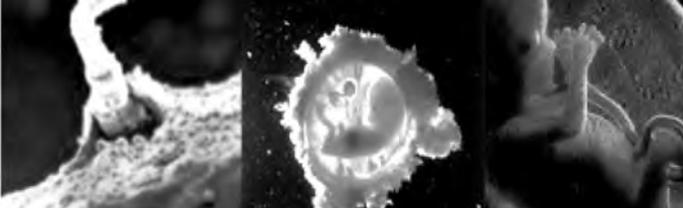
*Você. Nós. Somos os pais da fertilidade*

**0800.113320**

Serviço de Atendimento ao Cliente

**Merck Serono**

Living science, transforming lives



# JBRA

## Assisted Reproduction

---

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

ISSN: 1517-5693 - V. 14 | nº3 | July-August-September / 2010

---

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

Compendex

EMBASE

Excepta Médica

Geobase

PERIODICA (México)

Plataforma SCImago Journal & Country Rank

PORTAL DE PERIÓDICOS DA CAPES

Scopus (Holanda)

---

---

**JBRA - Assisted Reproduction**

**Jornalista Responsável:**  
Heber Maia – MTb 31.660

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



**Produção Editorial e Gráfica:**  
AlamTec Tecnologia em Informação LTDA  
Rua Cabo José Clemeneano de Carvalho, 3  
Jardim Avelino CEP 03226-000  
São Paulo-SP  
Tel/Fax: (11) 2341-8045  
e-mail: [alamtec@br.inter.net](mailto:alamtec@br.inter.net)  
[www.alamtec.com.br](http://www.alamtec.com.br)

## CORPO EDITORIAL – EDITORIAL BOARD

### Editor – Editor

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

### Editor Adjunto – Assistant Editor

Paulo Franco Taitson (IRH / PUC MG Brasil)

### Consultor Editorial - Editorial Consultant

José Gonçalves Franco Jr (CRH SP Brasil)

### Editores Associados – Associate Editors

Edson Borges Jr (Fertility / Inst Sapientiae SP Brasil)

João Batista A Oliveira (CRH SP Brasil)

Selmo Geber (Origen / UFMG Brasil)

Weydson Barros Leal (UFPE Brasil)

### CONSULTORES CIENTÍFICOS – Scientific Reviewers

Adelino Amaral Silva (Gênesis DF Brasil)

Aguinaldo Lopes da Silva Filho (UFMG Brasil)

Alessandro Schuffner (Conceber PR Brasil)

Álvaro Petracco (Fertilitat/ PUC RS Brasil)

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

Anne R Greenlee (OHSB EUA)

Antonio Requena (IVI Madrid Espanha)

Aroldo Camargos (UFMG Brasil)

Bela Zausner (Gênese BA Brasil)

Bruno Scheffer (IBRRA MG Brasil)

Carlos André Henriques (G&O Barra RJ Brasil)

Cesar Cafatti (Clin Los Dominicos Chile)

Claudia Borrero (Conceptum Colombia)

Claudia G Petersen (CRH SP Brasil)

Cláudio Chillik (CEGYR Argentina)

Condesmar Marcondes Filho (Nucl Santista RH SP Brasil)

David Vantman (CER Chile)

Dirceu H Mendes Pereira (Profert SP Brasil)

Eduardo Pandolfi Passos (SEGIR / UFRGS RS Brasil)

Ernesto Gallardo Lozano (IMER México)

Fabio Firmbach Pasqualotto (Conception / UCS RS Brasil)

Fernando Zegers-Hochschild (Clin Las Condes Chile)

Francisco Risquez (Clin La Trinidad Venezuela)

Francisco J.B. Sampaio (UERJ Brasil)

Humberto Ikuo Shibasaki (UFMT Brasil)

Jorge Blaquier (Fertilab Argentina)

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

Joaquim Roberto C Lopes (Cenafert BA Brasil)

Jonathas Borges Soares (Projeto Alfa SP Brasil)

Juan Manuel Montoya (Conceptum Colombia)

Ivan Valencia Madera (CEMEFES Ecuador)

Karen Sermon (VUB Bélgica)

Leila Montenegro S Farah (Fertility SP Brasil)

Leticia Urdapilleta (Cegyr Argentina)

Lídio Jair Ribas Centa (Androlab/ UFPR Brasil)

Luiz Fernando Dale (C Medicina RJ Brasil)

Madalena Caldas (GERAR PE Brasil)

Marcos Sampaio (Origen MG Brasil)

Mariângela Badalotti (Fertilitat RS Brasil)

Marilena Correa (IMS-UERJ Brasil)

Mario Cavagna (H Perola B/ CRH SP Brasil)

Marisa Decat de Moura (IBRRA/Mater Dei BH Brasil)

Newton Eduardo Busso (Unifert SP Brasil)

Paulo Serafini (Huntington/ USP SP Brasil)

Ricardo Melo Marinho (FCMMG MG Brasil)

Roberta Wonchockier (Projeto Alfa SP Brasil)

Roberto Coco (Fecunditas Argentina)

Rose Marie M Melamed (Fertility SP Brasil)

Sidney Glina (Hosp Albert Einstein SP Brasil)

Silvana Chedid Chedid-Grieco (SP Brasil)

Sergio Reis Soares (IVI Lisboa Portugal)

Renato Fanchin (França)

---

**DIRETORIA DA SBRA - 2009/2010**


---

**PRESIDENTE**


---

 Adelino Amaral Silva
 

---

 www.sbra.com.br
 

---

**DEPARTAMENTO DE PUBLICAÇÕES**


---

**EDITORA**


---

 Maria do Carmo Borges de Souza
 

---

**EDITOR ADJUNTO**


---

 Paulo Franco Taitson
 

---

 e-mail: jornalsbra@cmb.com.br
 

---

**PRESIDENTE**


---

 Adelino Amaral Silva
 

---

**1º VICE PRESIDENTE**


---

 Bela Zausner
 

---

**2º VICE PRESIDENTE**


---

 Condesmar Marcondes de Oliveira
 

---

**1º SECRETÁRIO**


---

 Newton Eduardo Busso
 

---

**2º SECRETÁRIO**


---

 Lidio Jair Ribas Centa
 

---

**1º TESOUREIRO**


---

 Hitomi Miura Nakagava
 

---

**2º TESOUREIRO**


---

 Marcelo de Pontes Rocha
 

---

**Diretoria da REDLARA - 2009/2010**


---

**DIRETOR EXECUTIVO**


---

 Dr. Ernesto Gallardo Lozano
 

---

 México
 

---

 E-mail: direjecutiva@redlara.com
 

---

 www.redlara.com
 

---

**VICE DIRETORA EXECUTIVA**


---

 Dra. Maria do Carmo Borges de Souza
 

---

 Brasil
 

---

 E-mail: mariadocarmo@cmb.com.br
 

---

**DIRETORES REGIONAIS**


---

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

---

 Dr. Carlos Félix Arce
 

---

 México
 

---

 carfelar@infosel.net.mx
 

---

**REGIÃO:** Bolívia, Chile & Peru
 

---

 Dr. Fabrizio Vizcarra Alosilla
 

---

 Peru
 

---

 favizcarraredlara@gmail.com
 

---

**REGIÃO:** Colômbia, Equador & Venezuela
 

---

 Dra. María Teresa Urbina
 

---

 Venezuela
 

---

 E-mail: mturbina@hotmail.com
 

---

**REGIÃO:** Argentina, Paraguai & Uruguai
 

---

 Dr. Gabriel Fiszbajn
 

---

 Argentina
 

---

 E-mail: fiszbajn@cegyr.com
 

---

**REGIÃO:** Brasil
 

---

 Dr. Selmo Geber
 

---

 Brasil.
 

---

 E-mail: selmogeber@origen.com.br
 

---

**SECRETÁRIA EXECUTIVA**


---

 Marina Diaz
 

---

 México
 

---

 E-mail: info@redlara.com
 

---

## INFORMAÇÕES GERAIS

1. O JBRA Assisted Reproduction (JBRA Assist. Reprod) é publicação oficial da Sociedade Brasileira de Reprodução Assistida (SBRA – [www.sbra.com.br](http://www.sbra.com.br)) e da Rede Latino-americana de Reprodução Assistida ([www.redlara.com](http://www.redlara.com)) 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 JBRA Assisted Reproduction devem ser inéditos, isto é, não devem ter sido publicados nem submetidos para análise por outras revistas, no todo ou parcialmente. Em casos de figuras já publicadas, autorização deve ser obtida e a fonte deve ser citada. Uma vez publicados, os artigos passam a ser de propriedade da SBRA.

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

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

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

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

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

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

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

## TIPOS DE ARTIGOS PUBLICADOS

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

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

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

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

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

## PREPARAÇÃO DOS ORIGINAIS

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

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

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

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

## PÁGINA DE ROSTO

A página de rosto deve conter:

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

## RESUMO E ABSTRACT

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

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

## AGRADECIMENTOS

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

## REFERÊNCIAS

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

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

### 1. Artigo de periódico

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

### 2. Livro

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

### 3. Capítulo de livro

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

### 4. Artigo de revista eletrônica

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

### 5. Artigo publicado na Internet:

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

### 6. Site

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

### 7. Software

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

## TABELAS E FIGURAS

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

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

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

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

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

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

## ENVIO/SUBMISSÃO DE ARTIGOS

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

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

## GENERAL INFORMATION

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## TYPES OF PUBLISHED ARTICLES

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

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

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

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

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

## PREPARATION OF ORIGINAL PAPERS

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

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

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

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

## TITLE PAGE

The title page should carry the following information:

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

## RESUMO AND ABSTRACT

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

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

## ACKNOWLEDGEMENTS

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

## REFERENCES

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

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

### 1. Journal Article

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

### 2. Book

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

### 3. Book Chapter

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

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

### 4. Electronic Journal Article

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

### 5. Article published in the Internet:

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

### 6. Site

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

### 7. Software

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

## TABLES AND FIGURES

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

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

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

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

Graphs should be two-dimensional only.

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

## MAILING/SUBMISSION OF ARTICLES

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

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

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

## INFORMACIONES GENERALES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## TIPOS DE ARTÍCULOS PUBLICADOS

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

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

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

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

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

## PREPARO DE LOS ORIGINALES

Utilice preferentemente Microsoft Word®. Los trabajos deben ser teclados en Times New Roman tamaño 12, espacio sencillo, alineados a la izquierda, iniciando cada sección en página nueva, en el siguiente orden: hoja frontal, resumen y palabras-clave, *abstract* y *keywords*, texto, agradecimientos, listado de referencias, tablas, notas al pie de imágenes e imágenes. Todas las páginas deben de ser numeradas. Siglas deben ser definidas por extenso en la primera ocurrencia en el texto; después de la primera ocurrencia, solamente la sigla deberá ser utilizada. En el resumen, el uso

de siglas debe ser evitado.

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

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

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

## HOJA FRONTAL

La hoja frontal debe contener:

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

## RESUMEN Y ABSTRACT

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

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

## AGRADECIMIENTOS

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

## REFERENCIAS

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

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

### 1. Artículo de periódico

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

### 2. Libro

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

### 3. Capítulo de libro

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

### 4. Artículo de revista electrónica

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

### 5. Artículo publicado en Internet:

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

### 6. Sitio web

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

### 7. Software

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

## Tablas y figuras

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

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

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

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

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

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

## ENVÍO DE ARTÍCULOS

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

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

---

## Editorial

### A Nobel Prize to a remarkable human being

Maria do Carmo Borges de Souza & Paulo Franco Taitson  
..... 13

---

## Artigo Original

### Estudo comparativo de três métodos de vitrificação de embriões de camundongo baseado no seu desenvolvimento in-vitro.

Lucileine Keico Santos Nishikawa, Álvaro Pigatto Ceschin, Condesmar Oliveira Marcondes, Raul Nakano.  
..... 15

### Função paterna e o lugar do pai nos tratamentos de reprodução assistida

Marisa Decat de Moura, Maria do Carmo Borges de Souza, Bruno Brum Scheffer  
..... 19

### Análise de Integridade do Exame Histopatológico para Endometriose em Biópsias Dirigidas por Laparoscopia.

Rodrigo Hurtado, Selmo Geber  
..... 24

### Fatores preditivos do sucesso da inseminação intrauterina: a morfologia espermática de acordo com o novo manual de laboratório da Organização Mundial de Saúde

Fabio Biaggioni Lopes, Amanda Souza Setti, Daniela Paes de Almeida Ferreira Braga, Rita de Cássia Savio Figueira, Assumpto Iaconelli Jr, Edson Borges Jr.  
..... 28

### El régimen legal de la reproducción asistida en España

Pilar Nicolás Jiménez  
..... 32

---

## Artigo de Opinião

### Doação de gametas e embriões pode ser praticada na rede privada?

Joaquim Roberto Costa Lopes, Adriana Ávila de Bessa, Cristina Rocha Barros, Jean Pierre Barguil Brasileiro, Vinicius Medina Lopes  
..... 36

---

## Artigo de Revisão

### Avaliação da Reserva Ovariana em Técnicas de Reprodução Assistida

Lucas Yugo Shiguehara Yamakami, Rafaela Alkimin, Carlos Roberto Izzo, Paulo Serafini, Edmund Chada Baracat  
..... 39

### Seleção de espermatozoides para ICSI

J.G. Franco Junior, R.L.R Baruffi, M. Cavagna, C.G. Petersen, A.L.Mauri, J.B.A Oliveira  
..... 43

---

## Eventos

..... 49

---

## ERRATA

**Glossário revisado da Terminologia das Técnicas de Reprodução Assistida (TRA), 2009†, Comitê Internacional para Monitorização da Tecnologia Reprodutiva Assistida (ICMART) e Organização Mundial da Saúde (OMS). Versão em Português. ERRATA**

**Embryo:** the product of the division of the zygote to the end of the embryonic stage, 8 weeks after fertilization. (This definition does not include either parthenotes—generated through parthenogenesis—nor products of somatic cell nuclear transfer.)

**Embrião-** produto da divisão do zigoto ao fim do estágio embrionário, 8 semanas após a fertilização. (Esta definição não inclui tanto produtos derivados de partenogênese quanto produtos da transferência de células somáticas nucleares).

## A Nobel Prize to a remarkable human being

Professor Robert G. Edwards has built an outstanding career and now we are very proud of celebrating his 2010 Nobel Prize in Physiology of Medicine.

He achieved degree in Biology with major specialization in Zoology, and minor specialization in Botany. Subsequently he studied at the Institute of Animal Genetics and Embryology, at the faculty of Science at the University of Edinburgh. He received his Ph.D. in 1955 and joined the University of Cambridge in 1963.

In 1968 he was able to achieve fertilization of a human egg in the laboratory and started to collaborate with Patrick Steptoe. Edwards developed human culture media to allow the fertilization and early embryo culture, while Steptoe utilized laparoscopy to recover oocytes from patients with tubal infertility. Their attempts met significant hostility and opposition. The birth of Louise Brown in 1978 made medical history, leading to a new way to help infertile couples who formerly had no possibility of having a baby.

Steptoe died in 1988 and Edwards went on with these researches, keeping his attention on the development of ART. He has declared that he regrets not a single day spent on these biochemical pathways. Besides acting as Editor of Human Reproduction and, afterwards, RBMonline, he delights everyone who attends his up-to-date conferences, which contribute extensively to both bioethics and policy making aspects.

Thank you, Professor. To all of us working in the Reproductive areas, this Nobel Prize just confirms the recognition that we have been giving you on each of our working days..

So, please, receive the warmest greetings from Latin America. Congratulations!

**Maria do Carmo Borges de Souza**

**Paulo Franco Taitson**

Editores

Veja a  
obra de arte  
que fizemos  
juntos.



*Você. Nós. Somos os pais da fertilidade*

# Fertilidade.

0800.113320  
Serviço de Atendimento ao Cliente

**Merck Serono**  
Living science, transforming lives

# Estudo comparativo de três métodos de vitrificação de embriões de camundongo baseado no seu desenvolvimento *in-vitro*.

Comparative study of three methods of cryopreservation of mouse embryos based on their *in-vitro* development.

Lucileine Keico Santos Nishikawa<sup>1</sup>, Álvaro Pigatto Ceschin<sup>1</sup>, Condesmar Oliveira Marcondes<sup>2</sup>, Raul Nakano<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Felicittà Instituto de Fertilidade - Curitiba-Pr

<sup>2</sup>Núcleo de Reprodução Humana - Santos-SP

<sup>3</sup>Ferticlin - São Paulo-SP

Local do trabalho: Felicittà Instituto de Fertilidade – Curitiba-PR

## RESUMO

**Objetivo:** A criopreservação de embriões pode ser realizada através de congelamento lento ou rápido, dentre eles a vitrificação. O presente trabalho tem como objetivo comparar a evolução de embriões submetidos a três técnicas distintas de vitrificação.

**Material e Métodos:** Fêmeas de camundongo F1 (C57bl/6xBlab) foram submetidas a protocolo de indução da ovulação e colocadas com machos. Oitenta embriões foram obtidos por lavado de tuba uterina no estágio de oito células à mórula sendo divididos aleatoriamente em quatro grupos distintos, vinte embriões grupo Controle (A), vinte grupo Cryotip® (B), vinte grupo Cryotop® (C) e vinte grupo Vitri-Ingá® (D). O grupo A foi cultivado em incubadora à 5%CO<sub>2</sub> e temperatura de 37°C por 48 horas. Os demais embriões foram vitrificados segundo as três técnicas e desvitrificados 24 horas após, sendo mantidos nas mesmas condições do grupo controle.

**Resultados:** No grupo A, 18 embriões (90%) evoluíram a blastocisto, no grupo B 15 embriões (75%), grupo C 14 embriões (70%) e grupo D 12 embriões (60%). O nível de significância foi calculado com base no teste não paramétrico, AxB (p=0,405), AxC (p=0,236), AxD (p=0,068), BxC (p=1,000), BxD (p=0,5) e CxD (p=0,740); e através do teste qui-quadrado, AxBxCxD (p=0,184).

**Conclusão:** Não houve diferença significativa entre o grupo controle e os demais grupos, nem entre grupos entre si, quanto ao desenvolvimento embrionário a blastocisto.

**Palavras-chave:** camundongo, embrião, vitrificação, criopreservação.

## ABSTRACT

**Objective:** Cryopreservation of embryos may be conducted by freezing slowly or quickly, among them the vitrification. This study aims to compare the development of embryos subjected to three different techniques of vitrification.

**Material and methods:** Female mice F1 (C57bl/6xBlab) were subjected to a protocol of ovulation induction and placed with males. Eighty embryos were obtained by lavage of the uterine tube in the stage of eight cells to morula were divided randomly into four groups, twenty embryos Control group (A), twenty Cryotip® group (B), twenty Cryotop® group (C) and twenty Vitri-Ingá® group (D).

The Group A was grown in an incubator with 5% CO<sub>2</sub> and 37 ° C for 48 hours. The remaining embryos were vitrified according to the three techniques and thawed after 24 hours, being kept under the same conditions of the control group.

**Results:** In group A, 18 embryos (90%) developed to blastocyst in group B, 15 embryos (75%), group C 14 embryos (70%) and group D 12 embryos (60%). The significance level was calculated based on the nonparametric test, AxB (p = 0.405), AXC (p = 0.236), AXD (p = 0.068), BXC (p = 1.000), BxD (p = 0.5) and CXD (p = 0.740) and the chi-square AxBxCxD (p = 0.184).

**Conclusion:** There was no significant difference between control group and the other groups, nor between groups among themselves as to the embryonal blastocyst.

**Key Words:** mouse, embryo, vitrification, cryopreservation.

## INTRODUÇÃO

A criopreservação é uma técnica baseada na conservação de células ou tecidos a temperaturas inferiores a 150°C negativos permitindo a preservação de células por tempos prolongados. A criopreservação de embriões humanos vem sendo realizada desde a década de 80, as primeiras gestações obtidas por intermédio da técnica de congelamento-descongelamento de embriões e de oócitos ocorreram em 1983 (Trousion & Mor, 1983) e em 1986 (Chen, 1986; Al-Hasani et al., 1986) respectivamente.

Tanto oócitos como embriões podem sofrer danos morfológicos e funcionais significativos durante a criopreservação. Esses danos irão depender do tamanho e forma das células, da permeabilidade da membrana bem como da qualidade e sensibilidade do oócito ou embrião (Vatja & Kuwayama, 2006).

A criopreservação pode ser realizada através de congelamento lento ou rápido, dentre eles a vitrificação. O congelamento lento possui algumas desvantagens como a necessidade de equipamento programável de alto custo para resfriamento, do tempo prolongado para execução da técnica bem como dos riscos elevados da formação de cristais de gelo, tão danosos à célula (Almodin, 2008) A vitrificação é um método de criopreservação baseada no resfriamento de células em velocidade ultra-rápida, promovendo a solidificação por aumento da viscosidade

(Fahy et al., 1984). Essa técnica surgiu como uma alternativa para evitar problemas relacionados com o congelamento lento. O processo utiliza altas concentrações de crioprotetores sem que ocorra a formação de cristais de gelo a baixas temperaturas (Rieger, 1998; Kuleshova et al., 1999). Muitos trabalhos realizados tiveram resultados importantes e promissores quanto à sobrevivência e qualidade dos pré-embriões e gametas após o congelamento rápido e descongelamento (Katayama et al., 2003; Kuwayama et al., 2005a; Kuwayama et al., 2005b; Kuwayama, 2007).

Essa técnica vem sendo objeto de estudo em embriões e oócitos mamíferos e não demonstrou resultados inferiores se comparado ao congelamento lento (Kuwayama, 2007). Embriões de camundongos podem ser criopreservados eficientemente em vários estágios do desenvolvimento (Leibo et al., 1974; Rall & Fahy, 1985), sendo frequentemente utilizado em pesquisas

Vatja e col. (1998) relataram a técnica de vitrificação com "Open Pulled Straw (OPS) - Palheta Esticada Aberta", com bons resultados em embriões bovinos, em seguida Kuleshova e col. (1999), relataram uma gravidez usando o mesmo método.

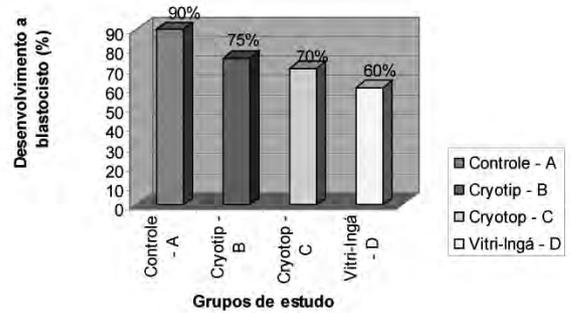
Desde o seu desenvolvimento e aplicação, novas tecnologias e protocolos foram desenvolvidos com o intuito de aperfeiçoar a técnica e melhorar os resultados. As principais variáveis entre as metodologias que devem ser citadas incluem o tempo de exposição da amostra ao crioprotetor, o volume utilizado de cada solução bem como o aparato ou suporte físico utilizado em cada metodologia. Zang et al. (2009) relatou uma taxa de 91,2% de evolução à blastocisto de embriões oitocélulas vitrificados/aquecidos pelo método Cryotop®. Após estudo comparativo entre os métodos Cryotip® e Cryotop® utilizando blastocistos humanos, Kuwayama (2005b) relatou não haver diferença significativa nos resultados obtidos. O Cryotip® tem apresentado taxas levemente inferiores de sobrevivência e desenvolvimento se comparado ao Cryotop®.

Recentemente foram realizados dois estudos de vitrificação com oócitos bovinos e humanos utilizando o método Vitri-Ingá®, resultando em 86% e 83% de taxa de sobrevivência, respectivamente, após análise morfológica (Almodin et al., 2008; Fachini et al., 2008). O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo comparativo da evolução de embriões de camundongo submetidos a três técnicas distintas de vitrificação.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Fêmeas de camundongo F1(C57bl/6 x Balb ), mantidas a temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  e ciclo de luz 12/12h (claro/escuro) e com quatro semanas de idade, foram superovuladas com administração intraperitoneal de 10 IU eCG (Gonadotrofina Coriônica equina- Novormon®) e após 48h com 10 IU hCG (Gonadotrofina Coriônica humana- Vetecor®). Após a injeção de hCG, as fêmeas foram colocadas com machos durante a noite e na manhã do dia seguinte após observada a presença do tampão vaginal, indicativo de cópula, foram sacrificadas com  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ . Os embriões foram lavados da tuba uterina e selecionados utilizando-se como critério de avaliação sua integridade morfológica, regularidade dos blastômeros e grau de fragmentação. Oitenta embriões no estágio de oito células à mórula foram selecionados e divididos aleatoriamente e igualmente em quatro grupos distintos, grupo Controle (A), grupo Cryotip® (B), grupo Cryotop® (C) e grupo Vitri-Ingá® (D). Os 20 embriões do grupo controle foram colocados em gotas de 50µl de IVF (Vitrolife AB, Suécia), sob óleo mineral e mantidos em incubadora com atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  e umidade

**Gráfico 1.** Taxa de desenvolvimento de embriões de camundongo após técnicas distintas de vitrificação



máxima por 48 horas para posterior análise de desenvolvimento embrionário a blastocisto. Os demais grupos foram vitrificados e desvitrificados após 24 horas, segundo as três técnicas distintas.

## Vitrificação

### Grupo B : Cryotip® – Irvine Scientific.

Os embriões foram colocados em gota de 20µl de Solução de Equilíbrio -*Equilibration Solution* (ES) de 5 a 15 minutos. Essa solução é composta por Hepes de meio-199 e com sulfato de gentamicina (35Hµg/mL), 7,5% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) e etilenoglicol cada e 20% (v/v) de *Dextran Serum Supplement* (suplemento substituto de soro). Após o equilíbrio os embriões foram transferidos, com o menor volume possível de ES, sucessivamente à 4 gotas de 20µl de Solução de Vitrificação - *Vitrification Solution* (VS), constituída por Hepes de meio-199 e com sulfato de gentamicina (35Hµg/mL), 15% (v/v) de DMSO e etilenoglicol cada, 20% (v/v) de *Dextran Serum Supplement* (suplemento substituto de soro) e 0,5M de sacarose, denominadas VS1, VS2, VS3 e VS4.

Nesta etapa o tempo de exposição é crítico sendo de máximo 90 segundos em temperatura ambiente, até o preenchimento da palheta com aproximadamente 1µl da solução, selagem e imersão em nitrogênio líquido ( $\text{LN}_2$ ). O preenchimento rápido e controlado da palheta é essencial, os embriões presentes na SV foram aspirados respeitando as marcas delimitadoras presentes na palheta, conforme protocolo. Para evitar danos à extremidade mais fina, cobriu-se com a proteção metálica.

### Grupo C: Cryotop® – CryoTech Lab

O Cryotop® é uma haste de polipropileno composta por um filme bem fino aderido a um cabo plástico mais grosso. Os embriões foram colocados em placa contendo 2mL de ES, composto de 7,5% de etilenoglicol e dimetilsulfóxido, diluídos em meio tamponado com 20% de soro sintético e permaneceram de 8 a 15 minutos. Após o equilíbrio foram transferidos, com o mínimo volume de ES, para placa contendo 2mL de VS, composta de 15% de etilenoglicol e dimetilsulfóxido e 0,5M de sacarose diluídos em meio tamponado com 20% de soro sintético. Os embriões são transferidos através de movimentos repetidos em diferentes posições da placa. Em seguida são aspirados e colocado no Cryotop®, com o mínimo de meio possível, imerso imediatamente em  $\text{LN}_2$  e protegido por um protetor de plástico. Até a imersão em  $\text{LN}_2$  o tempo não ultrapassava 90 segundos, em temperatura ambiente, sempre respeitando o volume mínimo de VS ao adicionar o embrião na haste.

#### Grupo D: Vitri-Ingá® - Ingámed

O processo de vitrificação foi realizado com auxílio do Vitri-Equip (Ingámed, Perobal-Brasil), composto de uma caixa de foam contendo dois compartimentos de aço que são usados como suporte para as hastes (aparato). A haste Vitri-Ingá é um aparato de polipropileno de aproximadamente 0,7mm de espessura que está aderido a um cabo plástico mais grosso e na outra extremidade apresenta um pequeno orifício, onde a amostra pode ser colocada.

Os embriões foram transferidos para 0,5mL de Solução de Equilíbrio (VI-1) que contém 7,5% de etilenoglicol e dimetilsulfóxido, diluídos em meio tamponado com 20% de soro sintético, por 5 a 15 minutos. Após equilíbrio, foram sucessivamente transferidos para 3 gotas de 20µl de Solução de Vitrificação (VI-2), composta de 15% de etilenoglicol e dimetilsulfóxido e sacarose a 0,5M diluídos em meio tamponado com 20% de soro sintético, permanecendo no máximo 15 segundos em cada gota. Em seguida os embriões eram colocados no orifício presente nas hastes, com um mínimo de meio possível, imersos rapidamente em LN<sub>2</sub> e protegidos com a cobertura de plástico. Os protetores plásticos foram primeiramente resfriados no equipamento Vitri-Equip (Ingámed) para em seguida serem verticalmente posicionados no equipamento contendo nitrogênio líquido para receberem as hastes. A etapa da vitrificação é crítica para o bom resultado do processo, respeitando o tempo máximo de 60 segundos, em temperatura ambiente, e o volume mínimo de meio ao depositar na haste.

#### Desvitrificação/Aquecimento

Após a realização das três técnicas de vitrificação os embriões foram em seguidas desvitrificados, seguindo o protocolo específico de cada técnica.

#### Grupo B : Cryotip® – Irvine Scientific.

As palhetas a serem descongeladas foram selecionadas no botijão de LN<sub>2</sub> e transferidas para um reservatório cheio de LN<sub>2</sub>. As mesmas são retiradas do LN<sub>2</sub> e colocadas em banho-maria a 37°C por três segundos. O excesso da água é retirado com auxílio de tecido estéril e a parte selada é cortada, onde o conteúdo é dispensado em placa. Essa pequena gota formada é unida à outra gota de aproximadamente 1µl de Solução de Descongelamento – *Thawing Solution* (TS), que serviu de lavagem para a palheta, composta de 1M de sacarose diluído em meio tamponado com 20% de soro sintético, permanecendo por 1 minuto. Em seguida os embriões são transferidos a uma nova gota de 20µl de TS e mantido por mais 1 minuto. Passado esse tempo, são transportados para duas gotas de 20µl de Solução de Diluição – *Dilution Solution* (DS1 e DS2), composta de 0,5M de sacarose dissolvida em meio tamponado com 20% de soro sintético, por 2 minutos em cada. Em seguida os embriões foram transferidos para 3 gotas de Solução de Lavagem – *Washing Solution* (WS) : WS1, WS2 e WS3, e mantidos por 3 minutos em cada gota, sendo composto de meio tamponado com 20% de soro sintético. Finalizado esse processo os embriões foram então transferidos para gotas de 50µl de IVF30 (Vitrolife AB, Suécia), sob óleo mineral e mantidos em incubadora à 5%CO<sub>2</sub> e temperatura de 37°C por 48 horas.

#### Grupo C: Cryotop® – CryoTech Lab

As palhetas a serem descongeladas foram selecionadas no botijão de LN<sub>2</sub> e transferidas para um reservatório cheio de LN<sub>2</sub>. A proteção de plástico é desconectada e o Cryotop® submerso imediatamente em 2mL de TS, à 37°C, composta de 1M de sacarose diluído em meio tamponado com 20% de soro sintético, permanecendo

por 1 minuto. Em seguida, transportado para 2mL de DS, por 3 minutos, composta de composta de 0,5M de sacarose dissolvida em meio tamponado com 20% de soro sintético. Finalmente é transferido para 2mL de WS - WS1 e WS2 por 5 minutos cada, sendo WS2 à 37°C. Essa solução é composta apenas de meio tamponado acrescido de 20% de soro sintético. Após esse processo os embriões foram transferidos para gotas de 50µl de IVF30 (Vitrolife AB, Suécia), sob óleo mineral e mantidos em incubadora à 5%CO<sub>2</sub> e temperatura de 37°C por 48 horas.

#### Grupo D: Vitri-Ingá® - Ingámed

As palhetas a serem descongeladas foram selecionadas no botijão de LN<sub>2</sub> e transferidas para um reservatório cheio de LN<sub>2</sub>. A proteção de plástico é desconectada e a haste submersa imediatamente em 0,5mL de Solução de Desvitrificação (DV-I), composta de 1M de sacarose diluído em meio tamponado com 20% de soro sintético, permanecendo por 1 minuto, à 37°C. Após esse breve período transferir imediatamente para 0,5mL de Solução Diluente (DV-II) por 3 minutos, composta de 0,5M de sacarose dissolvida em meio tamponado com 20% de soro sintético e lavar os embriões por duas vezes em 0,5mL de Solução de Lavagem (DV-III) por 5 minutos cada. Essa solução final é composta apenas de meio tamponado acrescido de 20% de soro sintético. Após esse processo os embriões são transferidos para gotas de 50µl de IVF30 (Vitrolife AB, Suécia), sob óleo mineral e mantidos em incubadora à 5%CO<sub>2</sub> e temperatura de 37°C por 48 horas.

#### Estatística

Os dados foram analisados através dos testes não-paramétricos "Comparação entre duas Proporções" (através do *software "Primer of Biostatistics"*), e através do teste "Qui-Quadrado" (pelo Epi-Info), onde o nível de significância (probabilidade de significância) adotado foi menor que 5% (p<0,05)

## RESULTADOS

Foram utilizados neste trabalho oitenta embriões de camundongo no estágio de oito células à mórula, sendo vinte embriões grupo Controle (A), vinte grupo Cryotip® (B), vinte grupo Cryotop® (C) e vinte grupo Vitri-Ingá® (D). Após 48 horas de cultivo *in vitro*, os embriões desvitrificados e do grupo controle foram analisados e comparados quanto o seu desenvolvimento a blastocisto. No grupo A, 18 embriões (90%) evoluíram a blastocisto, no grupo B 15 embriões (75%), grupo C 14 embriões (70%) e grupo D 12 embriões (60%) (Gráfico 1).

Com base nestes valores e após análise descritiva dos dados foi possível comparar o resultado das técnicas e verificar que não houve diferença significativa entre os grupos de estudo: grupo Ax B (p=0,405), grupo Ax C (p = 0,236), grupo Ax D (p = 0,068), grupo Bx C (p=1,000), grupo Bx D (p=0,500) e grupo Cx D (p=0,740). Analisando os grupos em geral: Ax Bx Cx D, foi possível obter o valor de p=0,184, confirmando não haver diferença significativa.

## DISCUSSÃO

O primeiro relato e publicação a respeito de congelamento de embriões de camundongos foi realizado por Whittingham et al. (1972). A utilização desses embriões tem sido freqüente em estudo e análise de qualidade de material, meio de cultivo e toxicidade dos mesmos (Perin et al., 2008), bem como na manutenção de recursos genéticos de animais domésticos e selvagens. As taxas de sobrevivência de oócitos e embriões previamente vitrificados, bem como o desenvolvimento embrionário à blastocisto, variam de 83 a 91,2%.

Neste estudo as taxas variam de 60 a 75%, não havendo diferença significativa entre os diferentes métodos de vitrificação.

Cada técnica de vitrificação em estudo possui um protocolo específico, porém o bom resultado da técnica, independente da metodologia aplicada, depende da velocidade em que ocorre o congelamento e aquecimento da amostra, bem como o volume pequeno de solução em que a amostra deverá ser armazenada.

Os grupos estudados possuem aparatos distintos. O grupo B enquadra-se no grupo denominado de sistema fechado, o que permite uma proteção da amostra biológica em relação ao LN<sub>2</sub>, já os grupos C e D fazem uso de um sistema aberto, sendo importante salientar não ter havido relato de nenhum caso de transmissão de doenças atribuída ao nitrogênio líquido em animais domésticos ou na biologia reprodutiva humana (Vatja & Kuwayama, 2006). Uma forma de evitar possíveis contaminações nos dois outros casos, denominados de sistema aberto, seria a de utilizar uma alíquota de nitrogênio líquido filtrado ou esterilizado pelo menos para realizar o resfriamento inicial após passar pela fase de vitrificação, já que em seguida será adicionada uma capa protetora antes do armazenamento em botijão contendo LN<sub>2</sub>.

Na avaliação da sobrevivência dos embriões de camundongos entre os grupos de estudo não foi observada diferença significativa. O grupo Vitri-Ingá® quando comparado com os demais grupos apresentou maior variação de resultado, embora não significante essa variação pode estar ligada a diferenças no aparato utilizado para depósito e armazenamento dos embriões, bem como à diferença no volume de solução utilizada durante o processo de vitrificação e aquecimento, visto que os componentes da formulação são semelhantes.

A vitrificação já passou por muitos avanços, porém ainda é possível observar que existem diferenças nos protocolos e nos aparatos utilizados em cada metodologia. Assim como ocorreu com o congelamento lento, a vitrificação está passando por um processo de avaliação onde os resultados estão cada vez mais promissores. É possível que num futuro próximo esses métodos aumentem sua eficácia, somando o que há de mais interessante de cada técnica, excluindo pontos negativos, podendo então se tornar um método padronizado.

Através da pesquisa realizada e com base nos resultados obtidos pode-se concluir que não houve diferença significativa entre o grupo controle e os demais grupos, nem entre grupos entre si, quanto ao desenvolvimento embrionário a blastocisto, após serem submetidos às três técnicas distintas de vitrificação. Os métodos de vitrificação estudados parecem ser boas opções de escolha já que apresentaram resultados satisfatórios.

### Referências Bibliográficas

- Al-Hasani S, Diedrich K, Van der Ven H, Krebs D. Initial results of the cryopreservation of human oocytes. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 1986 Sep;46(9):643-4
- Almodin CG, Minguetti-Câmara VC, Oliveira LM, Seko MB, Picada IE, Moron AF. Vitrificação em modelos bovinos: modo de treinamento. *J Bras Reprod Assist.* 2008;12(3):20-3.
- Anderson AR, Wilkinson SS, Price S, Crain JL. Reduction of high order multiples in frozen embryo transfers. *Reprod BioMed Online.* 2005 Mar;10(3): 402-5.
- Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet.* 1986 Apr 19;1(8486): 884-6.
- Fachini F C, Almodin CG, Minguetti-Câmara V.C, Moron AF, Nakano R, Shimabukuru L. Vitri-Ingá: Um novo Protocolo de Vitrificação. *J Bras Reprod Assist.* 2008; 12(4):16-19.
- Fahy GM, Macfarlane DR, Angell CA, Meryman HT. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology.* 1984;21:407-26.
- Katayama KP, Stehlik J, Kuwayama M, Kato O, Stehlik E. High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. *Fertil Steril.* 2003;80:223-4
- Kuleshova LL, MacFarlane DR, Trounson AO, Shaw JM. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology.* 1999;38:119-30.
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP - Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online.* 2005;11:300-8.
- Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online.* 2005;11:608-14.
- Kuwayama M - Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. *Theriogenology.* 2007; 67: 73-80.
- Leibo SP, Mazur P, Jackowski SC. Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Exp Cell Res.* 1974 Nov;89(1):79-88.
- Perin PM, Maluf M, Januário DA, Saldiva PH. Comparison of the efficacy of two commercially available media for culturing one-cell embryos in the in vitro fertilization mouse model. *Fertil Steril* 2008 Oct; 90(4 Suppl):1503-10.
- Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature.* 1985;313: 573-5.
- Rieger D. - Effects of the in vitro chemical environment during early embryogenesis on subsequent development. *Arch Toxicol Suppl.* 1998;20:121-9.
- Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature.* 1983;305:707-9.
- Vatja G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology.* 2006; 65:236-44.
- Vatja G, Holm P, Kuwayama M, Booth P J, Jacobsen H, Greve T, et al. Open pulled straws (OPS)vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev.*1998;51: 53- 8.
- Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science.* 1972 Oct 27;178(59):411-4.
- Zang J, Cui J, Ling X, Li X, Peng Y, Guo X, et al . Vitrification of mouse embryos at 2-cell, 4-cell and 8-cell stages by cryotop method. *J Assit Reprod Genet.* 2009;26(11-12):621-8.

# Função paterna e o lugar do pai nos tratamentos de reprodução assistida

## *The paternal role in the assisted reproduction treatments*

Marisa Decat de Moura<sup>1,2</sup>, Maria do Carmo Borges de Souza<sup>3</sup>, Bruno Brum Scheffer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>IBRRA-Instituto Brasileiro de Reprodução Assistida

<sup>2</sup>Clinica de Psicanálise do Hospital Mater Dei

<sup>3</sup>G&O Barra RJ Reprodução Humana

### RESUMO

**Objetivo:** A Reprodução Assistida (RA) introduz novas formas de procriação, provocando mudanças e consequências na medicina e nos laços sociais. Este estudo centrou-se na busca das transformações e nos efeitos da RA sobre a função paterna, ao tirar do homem a “exclusividade” no processo reprodutivo, colocando em cena o médico, integrante do tratamento.

**Material e métodos:** Contextualizaram-se os conceitos psicanalíticos no cenário do tratamento, utilizando-se a análise de 12 entrevistas semidirigidas, gravadas com homens no início do tratamento de RA de alta complexidade.

**Resultados:** a realidade de quem cria a criança não é o elemento fundamental para a construção da sua subjetividade; a possibilidade de sacrifício da singularidade do pai em tratamento; a sustentação dos laços sociais no tratamento por meio de “uma crença” do paciente no médico e/ou instituição; a relação transferencial de confiança do paciente será estabelecida se o discurso do médico ultrapassar a competência técnico-científica, considerando o paciente em sua singularidade.

**Palavras-chave:** Medicina. Psicanálise. Técnicas Reprodutivas. Ciência.

### ABSTRACT

**Objective:** The Assisted Reproduction Techniques (ART) represent increasing demands for the project of having a child, causing changes and consequences not only in the field of medicine, but also in social ties. This study focused the changes and the effects of these techniques on the paternal role. Man has no “exclusivity” in the ART processes that put on stage the medical specialist, a key component to the whole treatment.

**Material and methods:** Contextualizing the concepts in the psychoanalytic treatment setting, 12 recorded interviews produced this analysis. All men were in the beginning of the IVF cycle.

**Results:** anatomical reality of the one who creates the child is not the key element for the construction of its subjectivity; the possibility of sacrificing the uniqueness of being a father during treatment; the support of social ties during treatment comes through “trust” in the patient’s doctor and/or institution; the importance of the doctor’s speeches, considering the uniqueness of the subject under treatment.

**Keywords:** Medicine; Psychoanalysis; Reproductive Techniques; Science.

### INTRODUÇÃO

O percurso da RA tem trazido mudanças e efeitos nos laços sociais, nas organizações familiares, nas gerações – pais e filhos, e nas relações com os profissionais. A

Clinica de Reprodução Assistida constitui prática paradigmática da contemporaneidade na medida em que se sustenta em procedimentos científicos e tecnológicos de alta complexidade, que revelam novas formas de família e de filiação (Souza *et al.*, 2008) No decorrer dessa prática, no atendimento psicanalítico a pacientes, um homem fez uma pergunta que abriu espaço para que se pudesse indagar sobre o seu lugar e o do pai nos tratamentos (Moura, 2005): “Sabe o preço que eu pago pelo tratamento?” A entonação remetia a outro campo que não o do pagamento objetivo. Em suas palavras esclarece: “O preço é muito alto”. Depois de um silêncio, continuou: “Estou falando de outro preço”.

Na procura do lugar do homem e do pai nos tratamentos de RA e desse “outro preço”, surgiram indagações e inquietações que constituíram o motor desta investigação. O homem pode estar aí incluído como um parceiro, e não em suas vivências singulares. Como vivencia esse processo no qual ocorrem mudanças relacionadas ao seu papel, em um momento em que ele é convocado a um lugar específico, o de pai?

A partir da leitura dos fenômenos contemporâneos conseqüentes às novas formas de procriação, tornou-se necessário refletir sobre o ponto causal da função, nomeada pela psicanálise de *função paterna*. Formulada por Freud e sustentada por pós-freudianos com referência ao patriarcado, essa função, embora irredutível da condição humana, hoje levanta questões sobre o que permanece de seus fundamentos a partir das novas práticas médicas e das transformações sociais no campo da reprodução. O que há de fundamental para que esta função opere, isto é, para que a subjetivação ocorra, a clínica contemporânea e da RA demonstra (Moura, 2008) que independe do modo de filiação.

Fala-se do “declínio” dessa função e pretende-se, neste trabalho, situar como ela se apresenta hoje nos tratamentos de RA, uma vez que se trata de uma função estrutural e estruturante. Como pensar agora a *função estruturante* do ser humano, que até então era centrada imaginariamente na figura do homem?

Objetiva-se também, a partir da clínica da RA e das mudanças na configuração das organizações familiares, escutando os homens no tratamento, indagar sobre o lugar que o profissional médico, ator fundamental nesse processo de fertilização, ocupa para o homem no tratamento e a sua relação com a função paterna.

### MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada em clínica dedicada exclusivamente ao tratamento da infertilidade e aprovada por Comitê de Ética em Pesquisa. Foram realizadas 12 entrevistas, semidirigidas, com homens em tratamento de RA, independentemente do diagnóstico de infertilidade.

Haviam sido convidados aleatoriamente 16 homens,

dos quais um se recusou a participar da pesquisa e três não puderam comparecer no momento agendado. Uma gravação não pôde ser transcrita, devido a falha técnica. As entrevistas tiveram tempo médio de 60 minutos.

De início, tínhamos um pesquisador, um entrevistado frente ao bebê possível e do qual ele não é um pai tradicional<sup>1</sup>, e um tema de estudo: a função paterna e o lugar do pai no tratamento de RA. Entrevistador e entrevistado estavam implicados neste estudo. Para abordar a subjetividade do entrevistado, o entrevistador procurou acompanhar os movimentos do pensamento do entrevistado, interferindo o menos possível. O tema foi apresentado de modo coloquial. Quando o entrevistado começava a discorrer – diferente de responder – sobre o tema, o entrevistador tinha oportunidade de solicitar dados. O roteiro tinha por finalidade indicar os pontos-chave que estavam em jogo para o investigador, e foi necessário, portanto, ser simples, com questões diretas e abertas, para propiciar que os entrevistados colocassem o que tinham a dizer, o que pensavam. O roteiro não variou de um interlocutor para outro, salvo as questões suplementares, que foram feitas visando precisar um pensamento. Evitou-se o estilo interrogatório, por isso pensou-se a partir de cenários no interior dos quais eram associadas palavras com palavras, formando frases. Quando houve hesitações por parte do entrevistado, coube retomar com um pequeno estímulo para verificar ou aprofundar um pensamento que se anunciava. Quando esgotado um tema, passava-se ao seguinte, catalogado pelo pesquisador como fundamental para o estudo.

Na escuta do universo semântico dos textos, o objetivo foi decantar *os significantes*<sup>2</sup> que se repetiam e remarcar as associações entre eles. As entrevistas foram reunidas em um único texto, e cada palavra identificada encabeçou uma série de citações atinentes à palavra-chave. Nas respostas, foram encontrados os caminhos a ser explorados, a partir do que foi trazido pelas palavras. O trabalho configurou uma entrada no universo semântico dos entrevistados a partir de uma palavra-chave, expressão ou questão surgida nas entrevistas. As frases recolhidas fizeram parte do cenário possível desta pesquisa sobre as formas de pensamento.

## RESULTADOS

De acordo com a metodologia proposta, os resultados foram organizados e agrupados em tema, sendo decantadas frases e palavras-chave.

Primeiro Grupo de Temas- Reprodução Assistida / Tratamento e Procedimentos / Separação Reprodução – Sexualidade . “Pô” e agora o que... que eu faço?... “De qualquer forma é normal”, “formas normais”, “pra mim é tudo normal”, “forma bem natural”, “método natural”, “foi natural, normal”, “vai pelo natural”, “tudo normal”, “super normal”, “total naturalidade”, “naturalmente não vai conseguir, não”, “tentamos o normal...”.

Segundo Grupo de Temas - Homem e Mulher / Pai, Filho e Sua História / O Lugar do Pai “Apoio”, “suporte”, “carinho”, “presença”, “não deixar cair em depressão”, “provedor”, “por enquanto penso nela”, “oferecer uma base”, “contribuição emocional”, “passar segurança”, “não posso expressar sentimento”, “passar otimismo”, “estar do lado”, “mostrar força...”.

Terceiro Grupo de Temas- Instituto / Papel do Médico / Infertilidade / Pesquisa e Psicanálise

“Confiança”, “indicação”, “informação”, “ajuda”, “apoio”, “apoio além do tratamento”, “apoio no nível da cabeça da gente”, “mão de Deus que faz piruetas”, “instrumento divino”, “empurrãozinho”, “competência”, “respeito até na derrota”, “não posso cair no automático”, “dependo dele”, “médico é diferente de veterinário”, “só auxiliar”, “a gente cai numa engrenagem”.

## DISCUSSÃO

No estudo dos grupos de temas, interrogou-se a repetição, não como na relação específica psicanalítica do um-a-um, mas registrando a prevalência de alguns termos que significativamente atraíam outros. E no primeiro grupo, insistentemente, surgiram os termos *natureza* e *normal*. Repetidos e citados, não foram considerados em sua uniformidade mediante a utilização de uma estatística, de uma contagem pura e simples. Foram considerados em seus deslocamentos e deslizamentos ao longo de uma cadeia na qual o sentido estava sempre em fuga. Por conseguinte, não são termos unívocos, e se não ocorre a univocidade, isto é, uma palavra para cada coisa, os dois termos constituem polos de atração em torno dos quais giram partes de frases – estando os polos em questão representados pelas noções de *natural* e *normal*.

As técnicas e procedimentos de RA focalizam o biológico, o corpo e suas respostas orgânicas, e as afirmações e/ou indagações sobre a normalidade desses procedimentos só podem ser pensadas no *além do biológico*. Pode-se concordar que os termos *anormal*, *patológico* e *doença* são historicamente carregados de negatividade, e saúde é carregado de positividade (Canguilhem, 1978; Marietti, 2000), e o que se destaca como desafio é a reflexão de que, se nesse momento histórico a RA, entre outras “novidades” da ciência, inquieta e exige lidar com o ideal de perfeição, ao mesmo tempo revela exatamente o que a vida traz de multiplicidade e de limite.

Enquanto ideologia espontânea, as motivações dos entrevistados recorrem ao fundo comum da sabedoria popular, a qual, por sua vez, deixa transparecer debates antigos e recentes em torno do tema. A ciência biológica, em seus avanços, colocou o homem diante de situações *desnaturalizadas* como a RA. E diante da *desnaturalização*, a exigência é grande, considerando-se que homens em tratamento, assim como os profissionais, estão diante do novo, estão todos submetidos à nova situação, além do biológico, *além da natureza* (expressão construída para dar conta do que a Antropologia descobria ao confrontar *natureza* e cultura. (Ingold, 2000; Viveiros de Castro, 2002; Goldman, 2006).

Esses significantes – *normal* e *natural* – poderosos em sua capacidade de historicamente cristalizar significados e estabelecer identidades aparentemente inabaláveis, nas palavras dos homens em tratamento de RA, ao serem desdobrados e colocados em interrogação, permitem que sejam escutados em sua singularidade e universalidade, ambas necessárias ao estudo desta pesquisa que inclui o campo da subjetividade (Pinto, 1999).

A *normatização*, as normas e procedimentos da RA já estão inseridos no campo da ciência (Maia, 2000) e da cultura, mas a inclusão das normas na vida do sujeito só é possível a partir da inclusão das normas na história de cada um dos implicados nos tratamentos. Assim incluem-se médicos e pacientes, o que vem acontecendo paulatinamente, por meio de atendimentos clínicos, observações, contestações, recusas, aprovações, pesquisas, isto é, da palavra de profissionais e pacientes.

O Lugar do Homem / da Mulher / do Filho e sua História / O Lugar do Pai

As palavras dos homens dizem de uma posição para a ação que lhes cabe, na RA. E ao buscar nas entrevistas o saber sobre *lugar*: do homem, da mulher, do filho, do pai, está-se referindo ao *lugar no mundo psíquico*, ao lugar no *campo da subjetividade*, e não no mundo biológico ou sociológico.

Em um momento histórico em que a tônica é a igualdade entre homens e mulheres, e *os papéis sociais* estão em

1 Consideramos pai tradicional aquele segundo o modelo historicamente construído, que tem como base a primazia da heterossexualidade e a dominação masculina.

2 Lacan toma emprestado de Saussure o conceito de significante para se integrar na orientação estruturalista. Ao trazer o significante para o campo da experiência analítica, inclui uma nova concepção de sujeito, que se baseia em uma teoria sobre a estrutura da subjetividade humana: falta-a-ser. O significante é puro *non sense* e não tem relação com o significado, o que equivale a dizer que o significante não significa nada ou pode significar qualquer coisa. O significante então passa a ser definido como o que representa um sujeito, enquanto diferença, para outros significantes.

processo de mudança, pode-se escutar que, ao mesmo tempo em que buscam a igualdade, os homens buscam também a não reciprocidade na medida em que repetem, nomeando um lugar específico, mas colocando-se dentro de uma mesma norma, a de suporte para o outro<sup>3</sup>.

A igualdade e a tentativa da não reciprocidade<sup>4</sup>, ditos do universo semântico registrado, falam das mudanças no papel do homem em sua função atribuída na cultura paternalista. Mudanças que, advindas também pelos avanços nas técnicas de RA, colocam em questão esse lugar que precisa ser interrogado em sua representação hoje.

Pode-se dizer que essa representação, como apareceu no universo semântico dos homens/suporte de um outro, exclui a subjetividade destes, e que eles se colocam alheios aos seus desejos, e se situam como agentes do desejo da mulher, estando a mulher no tratamento associada ao representante da ciência.

Tendo como fio condutor da nossa pesquisa o lugar do homem, sua posição de sujeito – condição para assumir uma paternidade – e as vicissitudes da figura do pai na contemporaneidade, parece que o homem ainda encontra seu papel no modelo da família patriarcal, mas não como antes. Ele está procurando encontrar o seu lugar neste mundo que está mudando.

O que se chama de função paterna, a sociedade ocidental utilizou durante séculos sua legitimação no pai da família patriarcal, daí sua nomeação e sua referência central ao pai (Brandão, 2003). Como vai então operar e transmitir essa função – na medida em que ela não está mais apoiada na função patriarcal como observado –, exige uma reavaliação dessa referência. A clínica psicanalítica, a mudança e a dispersão do poder paterno, assim como este estudo sobre RA, mostram que há outro modo de conceber a fundação da subjetividade.

Cabe, portanto, a interrogação sobre a função paterna e sua referência à figura do pai, pois, à medida que o conceito de pai ficou liberado da carga de poder evidenciada como inoperante, o espaço ficou livre para o questionamento de uma função<sup>5</sup> estruturante, sem se referir à figura do pai.

Ao pensar em termos de estrutura psíquica onde há lugares a serem preenchidos, limites a serem assinalados, a abordagem será diferente para o par parental que pode não ser necessariamente conjugal. Os franceses passaram a dizer parentalidade e não paternidade. Qualquer que seja o “arranjo” hoje realizado para o nascimento de um filho, precisa-se de dois, espermatozoide e óvulo, independentemente de como o “arranjo de dois” foi feito. Os lugares de pai e mãe são operantes e efetivos na medida em que eles se referem a uma relação lógica, a uma terceira instância, isto é, um espaço de representação onde se monta o conceito de pai, montagem como se fosse num teatro, numa apresentação de personagens.

Como exemplo, pode-se citar: quando nasce uma criança em RA, o pai comparece e a registra em seu nome: eis o nome do pai. Até então, o pai é incerto. *Pater semper incertus est*, dizem os comentadores da lei. O fato de o

pai ser *incertus* requer a sua nomeação<sup>6</sup>. O pai, neste caso, é uma função que a mãe precisa reconhecer como tal, nada mais; esvazia-se assim o mito e seu aparato que idealizava a figura do pai.

RA e ordem procriativa em questão<sup>7</sup>

A reprodução pensada em termos de ordem procriativa foi fundada na diferença dos sexos, logo enunciada em termos de genealogia. O século XX trouxe com a RA a separação entre sexo e reprodução. Com as práticas sociais entre pessoas do mesmo sexo, também no século XX, surgiram casais homoafetivos com as mesmas pretensões jurídicas – casamento, filhos, herança – de outros casais. A demanda clínica e essas questões convocaram também os psicanalistas a interrogar seus conceitos e sua práxis (Perelson, 2006).

E chegou-se ao elemento terceiro, aquele responsável pela função de subjetivação, o qual, na RA, não é dado, terá que ser construído. Quando convidado a falar, o homem não se coloca como sujeito de sua experiência. Ao ocupar o lugar de homem/suporte de uma companheira, pergunta-se se ele não estaria cumprindo o papel de homem-ideal, respondendo ao que ele pensa que esperam dele, e se não haveria aí, em seus discursos, uma mestria dos valores sociais.

Nesse universo semântico apresentado, tem-se uma posição racional do homem tal como ele já vinha exercendo, posição negando e reconhecendo que existe o sentimento: “não posso expressar sentimento”. Pode-se pensar se o espaço para que o homem possa “expressar” o que ele pensa e sente vai existir em “outro lugar”, talvez encaminhado para o consultório de outro especialista – o neurologista, o psiquiatra, o psicanalista?

Portanto, diferentemente de “o homem que não chora”, tem-se “o homem que chora, mas não pode chorar” porque, “precisa segurar as pontas”, “senão a casa cai”. E pode-se indagar sobre o espaço para o paciente existir enquanto sujeito, sempre em uma construção singular: a diferença estaria na possibilidade da expressão de singularidades.

Todas as mudanças e suas consequências sugerem que a espécie humana atravessa, com intensidade variável no tempo e no espaço, aquilo que se pode chamar de “crise das referências simbólicas”. Ao mesmo tempo, o fato de estas “crises” não levarem a uma rotura, a uma desestruturação da civilização, permite pensar, e tem-se aqui um ponto central deste trabalho, que não existe um único caminho que defina, de forma normativa, o acesso à ordem simbólica e às relações entre sujeitos, próprias do humano. Ou seja, não há um modo único de subjetivação (Ceccarelli, 2002).

Pode-se então pensar que o lugar do pai e da mãe não tem que ser necessariamente ocupado por um homem e por uma mulher. O que se denomina de “função paterna” e “função materna” não necessita da presença de um homem e de uma mulher. A realidade anatômica de quem cria a criança não é um elemento fundamental para a construção da sua subjetividade. Essa construção está muito mais subordinada à organização psíquica daqueles que cuidam da criança, de como eles se colocam em relação à sua própria sexualidade, à fantasia que têm de ser pai e/ou mãe e, talvez, sobretudo, ao lugar que a criança ocupa no universo psíquico dos pais.

Daí a fundamental atenção necessária ao lugar do homem e sua posição subjetiva nos tratamentos de RA, não porque é homem, mas para que, ao se colocar como sujeito, possa sustentar não “o outro”, mas a diferença radical que é a condição para que o outro se sustente.

E o espaço do tratamento de RA, local onde se busca um

3 Podem-se destacar também frases significativas, indicando uma posição de “suporte” para o outro: “se a gente ‘pifa’ quem vai dar apoio à mulher” “o homem está em segundo plano, biologicamente – entre aspas” “o homem antes todo-poderoso hoje acompanha” “tem que ser tanto suporte financeiro quanto psicológico”.

4 Destacam-se também, dizeres sobre as dificuldades diante do paradoxo igualdade/não reciprocidade: “machucado”, “valendo nada além do espermatozoide”, “sem lugar”.

5 Função – termo da matemática, significando o que estabelece relações entre elementos. Lacan se apropria do conceito de função para dizer do modo como opera a correspondência entre os elementos da estrutura psíquica do sujeito, que se dá privilegiadamente via a diferença. Uma função não é uma relação ainda que estabeleça uma correspondência; restrições são introduzidas. Na psicanálise, é um operador que, mediante um artifício de escritura, opera o que se sustenta vazio na estruturação do sujeito.

6 *Pater semper incertus est*, para Lacan, é a verdade da qual se origina a função tão particular do pai.

7 “Por “ordem procriativa”, entende-se um conjunto de normas jurídicas que organizam as formas de inscrição genealógica e de reprodução biológica das pessoas’, a qual se estrutura com base em três grandes pilares: a liberdade de procriar por via natural; a assimilação da categoria de genitor à categoria de pai; a equivalência entre capacidades reprodutivas e capacidades parentais” (ARÁN, &; CORRÊA, 2004).

saber exterior, universal, e válido para todos, *o da ciência*, pode ser a oportunidade, ou não, de um encontro também com o espaço para as *buscas de respostas singulares*, necessárias para a função operante de subjetivação

Terceiro Grupo de Temas

Instituto / Papel do Médico / Infertilidade / Pesquisa / Psicanálise

A partir das palavras dos homens, indagou-se sobre o lugar do médico, figura central no tratamento, sobre a demanda que os homens endereçam a ele e sobre o que eles dizem precisar nesse espaço<sup>8</sup>.

Da modernidade, cujo laço social vertical era organizado pelo pai/autoridade, passou-se a um mundo horizontal, atual, cujo laço social, globalizado, introduziu, como consequência, uma nova apresentação da clínica, tanto médica como psicanalítica. Do universo regido pela figura do pai, próprio do mundo industrial, na globalização, os "pais se multiplicam" em *nomes do pai*, como Lacan falou em seus últimos seminários.

Diretamente relacionada a essas mudanças e suas consequências, tem-se a clínica da RA, paradigmática do discurso atual pelos avanços técnicos e científicos que a caracterizam. E os profissionais estão exercendo sua prática clínica com os pacientes desta clínica, nesse momento histórico (Souza, 2005).

O saber científico, subsumido pela tecnologia, produz objetos que, nesse discurso, podem ser *aquele mais um* que sustentará a ilusão da oferta de uma felicidade garantida. Lacan (1974), em uma leitura da sociedade moderna, entende que a colaboração da ciência que produz também *gadgets* para o consumo, pode assujeitar os indivíduos a uma engrenagem. Nesse discurso, a ciência exclui o sujeito e alimenta o ciclo da produção capitalista ajudada pelos meios de comunicação que, fazendo também parte da engrenagem, encarregam-se de alimentar o seu movimento.

É importante deixar claro que não se trata de uma posição contra a ciência e seus importantes avanços científicos e tecnológicos, nem contra o discurso capitalista. Trata-se de pensar na importância da "re-colocação" do sujeito em sua própria casa, tendo como referência, desde Freud, a posição ética do sujeito que sabe não ser o senhor em sua própria casa (Andrade, 2005).

Apesar de todas as modificações da modernidade, a medicina é uma prática social, e a cultura continuou reservando para o médico, seu representante, um papel sempre além do alívio das doenças. Atribui-se a ele um poder pessoal e um saber sobre a vida e sobre a qualidade de vida.

Com o ingresso da medicina na era científica, cada vez mais, ele se tornou um especialista. Uma das consequências de todas essas mudanças é *o sacrifício da singularidade*. O sujeito cede sua singularidade, sua diferença, em prol do sempre mais possível, imposto pela oferta da ciência a serviço do discurso capitalista. Assim, *a realidade psíquica não pode ser universalizada*, pois ela se caracteriza pela diferença, sendo do registro do singular. Como se sabe, os objetos oferecidos pelo mercado e pela ciência não são capazes de tamponar por completo a falha fundamental estrutural responsável pela existência do sujeito desejante. E, diante da oferta de um saber, como a de um especialista em RA, produz-se um enlaçamento entre o médico e o paciente. Diante da demanda de um filho e do que se apresenta como obstáculo/infertilidade, a suposição de saber localizada no profissional enlaça o sujeito em uma crença endereçada ao especialista, abrindo ou não perspectiva para uma *relação de confiança*.

*Confiança, indicação, informação, ajuda, apoio, apoio além do tratamento, apoio ao nível da cabeça da gente,*

*dependo dele...* para encontrar o meu lugar, são ditos dos homens da pesquisa com relação ao lugar do médico. Todo sujeito que busca tratamento insere o profissional como mais um objeto do mercado, que pode aliviar seu sofrimento. O profissional, ao receber o paciente e ocupar um lugar de quem tem respostas para o problema do sujeito, já possibilita o estabelecimento de um laço, uma ligação entre paciente e profissional a partir de *uma crença*<sup>9</sup> no poder do saber que o outro tem para lhe oferecer. Um primeiro nome dado a um conceito fundamental da psicanálise, *o de transferência*, Freud o nomeou de *confiança* (1893,1971) e já o considerou uma base para a condição de tratamento. Este conceito complexo e que é específico, feito e motor do tratamento na relação analítica, pode-se pensá-lo também em qualquer vínculo em que se estabelece o lugar para uma suposição de saber. A pergunta que se coloca é o que determina, na relação do profissional e seu paciente, o estabelecimento de *uma confiança* repetidamente dita fundamental pelos homens nas entrevistas.

Como o sujeito excluído não deixa de reivindicar sua existência, dificuldades, mal-entendidos, impasses, queixas, processos, sintomas e adocentidos vão sinalizar aos profissionais a demanda de sua inclusão. Uma resposta interessante a essa demanda constata-se ser a possibilidade da coexistência das diferenças, presente em trabalhos cada vez mais multidisciplinares. O retorno do subjetivo no campo dos valores da cultura pode-se dar pelas várias áreas do conhecimento, inclusive a da psicanálise. *Mão de Deus que faz piruetas, instrumento divino, empurrãozinho, competência, só auxiliar, respeito até na derrota, a gente cai numa engrenagem, não posso cair no automático, o médico é diferente de veterinário...* continuam os homens a falar sobre o lugar do médico.

Ao mesmo tempo em que diviniza o médico e reivindica o profissional competente, o homem pede "alguma coisa" além do científico, aquele diferencial...

Pelo lugar central e determinante no tratamento, esse profissional será alvo do que repetidamente é dito nas entrevistas: é preciso ter confiança, seja por indicação, pela escolha do instituto ou pelo acaso. Ocupar esse lugar não é sem consequências; é inerente a ele uma responsabilidade, pois vai definir, a partir dessa posição, se o outro – o paciente – terá lugar ou não como sujeito. Isto é, ele define o laço social, ele define como o sujeito vai aparecer no laço social.

Já que o mundo mudou, se horizontalizando, perde-se a nostalgia do pai que era então hierarquicamente o encarregado da responsabilidade. Agora, então, ela é de todos, cabendo ao médico conduzir a relação médico-paciente e assim considerar o paciente agente, responsável pelo seu corpo e decisões em sua vida.

O discurso do mestre antigo, no qual se localizava a mestria no pai, no professor, no médico, como foi abordado, mudou, e fez com que os semblantes a ele acoplados também mudassem. De mestres, o pai, o professor e o médico passaram a ser simplesmente pai, professor e médico.

Nesse processo, os tempos atuais mostram a *importância da confiança* e, consequentemente, o lugar do sujeito, porque as mudanças revelam que o Outro, lugar ocupado pelo mestre antigo e que era semblante de garantia e de segurança, não existe. Tem-se então como consequência o sujeito desamparado diante desse Outro que não tem consistência. No laço social, é possível o *estabelecimento da confiança*. Confiança necessária para o sentir-se amparado, incluindo o impossível.

Entende-se que isso acontece quando o médico circula do para-todos do científico para o caso-a-caso do sujeito. Isso porque, no para-todos, o sujeito está excluído, e perde-se a possibilidade da construção do *campo da confiança*, o qual exige a posição de sujeito para responsabilizar-se pela tomada de decisões, inclusive

8 Destacam-se também, neste estudo, frases significativas com relação ao lugar que o médico ocupa para os homens no tratamento: "pra vocês é feijão com arroz" "é só pegar e jogar lá dentro, não?" "vou fazer tudo certinho pra passar na olimpíada" "eu dou suporte pra ela e o médico pra mim" "a psicologia podia ter um suporte aí para o homem" "às vezes até queria ter um problema mesmo pra não ter um filho".

9 Considera-se crença, como ato ou efeito de crer, uma convicção íntima principalmente religiosa, e confiança como segurança íntima de alguma coisa. A diferença está localizada na crença como depositária de algo no outro, e confiança incluindo uma decisão do sujeito.

a de confiar.

Uma vez que o sujeito excluído não tem como assumir a responsabilidade de sua parte na história, fica com a saída pela crença de que o Outro divinizado é o responsável por sua felicidade. Excluído do discurso e com autorização para exclusão das suas responsabilidades, em uma posição de objeto no laço social estabelecido, o paciente pode ficar posicionado em uma relação que não será sem consequências. Nesta posição, o sucesso, assim como as impossibilidades, as falhas, os insucessos nos resultados vão ser "todos" depositadas no profissional, com "todas" as suas consequências. Como disse um dos participantes, *se afinal é só pegar e jogar lá dentro...*

#### Considerações finais

No momento dos efeitos da mudança de paradigma no que se refere ao normal, ao já estabelecido no campo da medicina e da reprodução humana, as normas e procedimentos da RA estão inseridos no campo da ciência e da cultura. Entretanto, a inclusão das normas na vida do sujeito só é possível a partir da palavra, da simbolização, isto é, da inclusão das normas na história de cada um dos implicados nos tratamentos, médicos e pacientes.

Fundamental atenção, necessária ao lugar do homem e sua posição subjetiva nos tratamentos de RA, dá-se não porque é homem/identidade de gênero, mas porque, ao se colocar como sujeito, pode, ao tomar a palavra, sustentar não o outro, mas a diferença radical, que é a condição para que o outro se sustente.

Função paterna não implica a presença de um homem, mas a organização psíquica daqueles que cuidam da criança, de como eles se colocam em relação à sua própria sexualidade, à fantasia que têm de ser pai e/ou mãe e, sobretudo, do lugar que a criança ocupa no universo psíquico dos pais.

O profissional, ao receber o paciente e ocupar o lugar de quem tem respostas para o problema do sujeito, possibilita o estabelecimento de um laço, uma ligação entre paciente e profissional a partir de uma crença nesse saber que o outro tem para lhe oferecer. Diante da infertilidade, que se apresenta como obstáculo à satisfação de ter um filho, a relação médico/paciente enlaça o sujeito em uma crença de suposição de saber, abrindo ou não perspectiva para uma relação de confiança como base para os tratamentos, além das técnicas. Uma relação de confiança se estabelece a partir da circulação nos discursos, pelo profissional, do para-todos do científico ao caso-a-caso do sujeito.

Ocupar o lugar de uma suposição de saber não é sem consequências. É inerente a ele uma responsabilidade, pois é ele que define, a partir dessa posição, se o outro, o paciente, terá lugar ou não como sujeito. Isto é, ele define o laço social, ele define como o sujeito vai aparecer no laço social.

A ciência avança, e a psicanálise precisa mudar, sem perder a direção sustentada por seus princípios. Na clínica multidisciplinar, o psicanalista pode encontrar lugar para a sua função e estar presente na cultura, participando das reinvenções com relação ao ser humano e sua condição de dependência de um outro para sua existência.

#### Endereço para correspondência

mdecattmoura@uol.com.br

#### Referências Bibliográficas

1. Andrade LFG. Consequências do discurso moderno na subjetividade feminina. Jornada do Traço Freudiano, Vere-

das Lacanianas, Recife, 28/5/2005.

2. Arán M, Corrêa MV. Sexualidade e Política na Cultura Contemporânea: o Reconhecimento Social e Jurídico do Casal Homossexual. *PHYSIS: Rev. Saúde Coletiva* 2004; 14; 329-341.
3. Brandão EP. A Psicanálise em face das articulações contemporâneas entre aliança e sexualidade. Segundo Encontro Mundial dos Estados Gerais da Psicanálise. Rio de Janeiro, 2003.
4. Canguilhem G. O normal e o patológico. Rio de Janeiro: Forense-Universitária, 1978.
5. Ceccarelli PR. Configurações edípicas da contemporaneidade: reflexões sobre as novas formas de filiação. *Pulsional – Revista de Psicanálise*. 2002; 161.
6. Freud S. Edição Standard Brasileira das Obras Psicológicas Completas de Sigmund Freud [ESB]. Rio de Janeiro: Imago, 1996.
7. Freud S, Breuer J. Communication préliminaire [1893]. In: Freud, S.; Breuer, J. *Etudes sur l'hystérie* [1895]. Paris: PUF, 1971.
8. Goldman M. Alteridade e Experiência: antropologia e teoria etnográfica. *Etnográfica*, 2006; X(1), 161-173.
9. Ingold T. A circumpolar night's dream. In: Ingold, T. *The perception of the environment: essays in livelihood, dwelling and skill*. London: Routledge, 2000.
10. Lacan J. Função e campo da fala e da linguagem em psicanálise [1953]. In: Lacan, J. *Escritos*. Rio de Janeiro: Jorge Zahar, 1998.
11. \_\_\_\_\_. O seminário, livro 17: o avesso da psicanálise [1969-1970]. Rio de Janeiro: Jorge Zahar, 1992.
12. \_\_\_\_\_. O seminário, livro 18: d'un discours qui ne serait pas du semblant [1971]. (inédito).
13. \_\_\_\_\_. Os complexos familiares: na formação do indivíduo. Rio de Janeiro: Jorge Zahar, 1987.
14. Maia JA. Método clínico e paradigmas da ciência. *Interface - Comunicação, Saúde, Educação*, 2000. 4177-180.
15. Marietti AK. Les concepts de normal et de pathologique depuis Georges Canguilhem. *DOGMA: Revue électronique*. Disponível em: <http://dogma.free.fr/txt/AKM-Normpath.htm>. Acessado: 17/03/2008.
16. Moura MD. (Org.). *Psicanálise e hospital 4: Novas versões do Pai – reprodução assistida e UTI*. Belo Horizonte: Autêntica, 2005.
17. Moura MD. Reprodução humana desde sempre 'assistida'. In: Souza MCB, Moura MD, Grynszpan D., orgs. *Vivências em tempo de reprodução assistida: o dito e o não-dito*. Rio de Janeiro Revinter; 2008.
18. Perelson S. A parentalidade homossexual: uma exposição do debate psicanalítico no cenário francês atual. *Estudos feministas*. 2006; 14709-730.
19. Pinto JM. A instituição acadêmica e a legitimação da vocação científica da psicanálise. *Psicologia – Reflexão e Crítica*. UFRGS, 1999; 12681-695.
20. Souza MCB. A posição do especialista diante das técnicas de reprodução assistida: pai, Deus ou simplesmente o médico? A visão de uma médica, mulher. In: Moura MD. (Org.). *Psicanálise e hospital 4: Novas versões do Pai – reprodução assistida e UTI*. Belo Horizonte: Autêntica, 2005. p.65-70.
21. Souza MCB. Infertilidade e reprodução assistida. 'Esse tal desejo de ter um filho'. In: Souza MCB, Moura MD, Grynszpan D., orgs. *Vivências em tempo de reprodução assistida: o dito e o não-dito*. Rio de Janeiro Revinter; 2008.
22. Viveiros de Castro E. O nativo relativo. *Mana*, 2002; 8113-148. Disponível em: <http://poars1982.wordpress.com/2008/02/28/o-nativo-relativo-viveiros-de-castro>. Acessado: 20/05/2008.

# Análise de Integridade do Exame Histopatológico para Endometriose em Biópsias Dirigidas por Laparoscopia.

Integrity analysis of histological evaluation for endometriosis in laparoscopically guided biopsies.

Rodrigo Hurtado  
Selmo Geber

Pósgraduação em Saúde da Mulher da Faculdade de Medicina – Universidade Federal de Minas Gerais  
Hospital das Clínicas – Universidade Federal de Minas Gerais  
Clínica Origen – Centro de Medicina Reprodutiva

## RESUMO

**OBJETIVO:** Definir se o exame histopatológico microscópico é um método confiável para o diagnóstico de endometriose. **METODOLOGIA:** 68 pacientes com história clínica sugestiva de endometriose foram submetidas a biópsia de lesões peritoneais ou ovarianas compatíveis com endometriose através de videolaparoscopia. Cada peça foi examinada por três diferentes patologistas e, novamente, por cada um deles para avaliação da variabilidade intra e inter-observador do exame microscópico histopatológico. Os resultados obtidos destes exames foram submetidos ao teste de *Kappa* para determinação da integridade do exame histopatológico (exame observador-dependente) para o diagnóstico de endometriose. **RESULTADOS:** Todas as 68 pacientes apresentavam quadros clínicos e lesões macroscópicas fortemente sugestivos de endometriose à laparoscopia segundo a classificação da ASRM, 1997. Apenas 38 biópsias (55,88%) tiveram confirmação histológica da presença de estroma e/ou glândulas endometriais no tecido estudado. Os valores de *Kappa* calculados foram de 0,78 para variabilidade inter-observador e 0,88 para a variabilidade intra-observador demonstrando claramente que o exame histológico apresenta alta integridade. **CONCLUSÃO:** A confirmação histológica de endometriose em apenas 55,88% das biópsias sugere que a visualização laparoscópica de lesões sugestivas não é suficiente para o diagnóstico de endometriose. A integridade e confiabilidade do exame histopatológico provados pelo teste de *Kappa* (todos os valores superiores a 0,70) atestam que este exame diagnóstico deve ser reconsiderado como passo fundamental no diagnóstico de casos suspeitos de endometriose.

Palavras Chave: endometriose – laparoscopia – diagnóstico – histopatologia

## ABSTRACT

**OBJECTIVE:** To determine whether histological microscopic evaluation of endometriosis is a reliable method for the diagnosis of endometriosis. **METHODS:** 68 women with clinical history for endometriosis were submitted to laparoscopic biopsy of visually suggestive peritoneal and/or ovarian tissue. Each biopsy sample was evaluated by three different pathologists and then once again by each of them to determine the intraobserver and interobserver variability of the histological examination. The results were analyzed by the Kappa integrity test to reveal whether microscopic examination, which is an observer-dependent method, is accurate for the diagnosis of endometriosis. **RESULTS:** All 68 patients had strongly suggestive clinical symptoms and laparoscopic findings that met the descriptive criteria of the 1997 revised ASRM classifica-

tion. 38 (55.88%) of the biopsy samples showed histological evidence of endometriosis. The calculated values of *Kappa* of 0.78 for the interobserver variability and 0.88 for the intraobserver variability clearly demonstrate that the histological exam for endometriosis holds high integrity. **CONCLUSION:** The histological confirmation of endometriosis in only 55.88% of the biopsies suggest that laparoscopic visualization of lesions alone is not sufficient for the diagnosis of endometriosis. The integrity and reliability of the histological exam proven by the calculated values of *Kappa* (all above 0.70) state that this diagnostic tool should be reconsidered as an essential step in the diagnosis for suspected endometriosis.

Key Words: endometriosis – laparoscopy – diagnosis – histopathology

## INTRODUÇÃO

Define-se endometriose pela presença de tecido endometrial ectópico (ACOG, 2001). Sua prevalência varia de 10 a 15% na população geral (Cramer *et al*, 1985; Wheeler, 1989; Moen & Schei, 1997; Karón, 2008). Em mulheres com infertilidade ou dor pélvica crônica a prevalência chega a 90% (Haney, 1993; Albee, 2008). Simón & Nezhad em 1995 publicaram um levantamento bibliográfico de revisão demonstrando uma prevalência maior nas pacientes operadas por queixas específicas (23%) do que naquelas operadas por indicações ginecológicas gerais (5%).

Um dos motivos para se explicar as grandes diferenças observadas entre os resultados dos estudos sobre endometriose é o método diagnóstico utilizado em cada estudo. É importante dizer que o padrão-ouro para o diagnóstico, baseado no próprio conceito de endometriose, é a evidência de tecido endometrial ectópico no exame histopatológico, método que requer obtenção de tecido de biópsia através de intervenção cirúrgica, muitas vezes adiada pela paciente ou pelo cirurgião (Gary, 2004). Diversas propostas têm sido apresentadas com objetivo de padronizar um método de diagnóstico não invasivo, com boa relação custo/benefício, baixa morbidade, além de altas sensibilidade e especificidade.

A utilização da laparoscopia como ferramenta diagnóstica se popularizou a partir da década de 1970, quando surgiram os primeiros trabalhos descritivos de técnica para a cirurgia pélvica laparoscópica e seus resultados (Cohen, 1975). Muita importância é dada atualmente à laparoscopia e às classificações visuais como aquela proposta pela American Society for Reproductive Medicine (ASRM, 1997). Atualmente aceita como padrão internacional devido à objetividade descritiva das lesões, esta classificação descreve todos os tipos de lesões peritoneais e ovarianas. Jackson & Telner em 2006 realizaram uma

meta-análise a respeito da abordagem às pacientes com suspeita de endometriose e concluíram que o diagnóstico deve ser feito através de avaliação laparoscópica. Outros autores questionam a sensibilidade da avaliação visual por laparoscopia (Candiani, 1986; Nisolle, 1990; Hornstein, 1993; Vercellini, 2006 e Albee, 2008) revelando que não existe correlação estabelecida entre o quadro visual descrito pela laparoscopia e o quadro clínico da paciente (sintomas e gravidade), nem mesmo entre o tipo de lesão observada e a confirmação histopatológica.

O exame histopatológico tem sido considerado o padrão-ouro para o diagnóstico da endometriose desde 1938 com Counseller através da identificação de presença de tecido endometrial ectópico. Este método tem como diretrizes os achados histológicos microscópicos de: tecido epitelial glandular, estroma endometrial, fibrose com hemorragia e, eventualmente, tecido muscular liso (Cullen, 1896). Nem sempre é possível a identificação de todos estes parâmetros, conforme descreveram Bergqvist & Mmowski em 1984, evidenciando-se, muitas vezes, apenas um ou dois dentre eles.

Até o momento nenhum estudo foi publicado com o objetivo de testar a integridade do exame histopatológico para o diagnóstico de endometriose. Diversos estudos têm sido realizados com o intuito de demonstrar a necessidade de confirmação histopatológica do diagnóstico laparoscópico, baseados na falta de acurácia ou falta de reprodutibilidade de resultados da laparoscopia, mas não na confiabilidade própria do exame histopatológico. A Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia (ESHRE) em 2005, não considerou o exame histopatológico necessário ao diagnóstico de endometriose a não ser nos casos em que a laparoscopia evidencie acometimento exclusivo do septo reto-vaginal, sendo a laparoscopia aceita portanto como padrão-ouro. A Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM) a partir de 2006, segue também esta linha e não considera a histopatologia um exame indispensável. Assim também definiu o Colégio Real Britânico de Ginecologistas e Obstetras (RCOG, 2006).

O objetivo deste estudo foi avaliar um exame observador dependente através da análise de concordância intra e inter observador para confirmar a hipótese de que o exame histopatológico tem real valor diagnóstico para endometriose (alto grau de integridade), e que a videolaparoscopia isoladamente, não é suficiente para diagnóstico.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um estudo prospectivo observacional, transversal a fim de testar a integridade do exame histopatológico para endometriose através da análise do grau de concordância entre diferentes patologistas (análise inter observador) e de duas observações de um mesmo patologista (análise intra observador). Participaram do estudo pacientes atendidas no Serviço de Videoendoscopia Ginecológica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG) com indicação de videolaparoscopia para esclarecimento de suspeita de endometriose. O estudo foi aprovado pelo COEP da UFMG (CAAE – 0272.0.203.000-06).

### *Videolaparoscopia*

As pacientes com indicação à videolaparoscopia foram submetidas a avaliação pré-operatória de acordo com o protocolo vigente do Serviço de Videoendoscopia Ginecológica do HC-UFMG e passaram por uma consulta pré-anestésica com o Serviço de Anestesiologia do HC-UFMG. Todos os procedimentos operatórios foram realizados no Centro Cirúrgico do HC-UFMG sob anestesia geral balanceada realizada pelo mesmo Anestesiologista.

Com a paciente em decúbito dorsal em posição de litotomia, o procedimento era iniciado após antisepsia rigorosa do abdome desde a linha mamilar até a raiz das coxas e aplicação de campos estéreis. Os portais operatórios para laparoscopia eram abertos por incisão com bisturi número 11 sendo o primeiro acesso de 10mm de extensão por via umbilical. Então se instalava o pneumoperitônio por insuflação de dióxido de carbono até uma pressão de 14mmHg

através de punção por agulha de Veress e teste de Palmer. Os demais portais se localizavam nas fossas ilíacas bilateralmente e no hipogástrico e tinham extensão variável segundo a necessidade para cada procedimento (calibre do instrumental cirúrgico). O inventário da cavidade seguia a observação sistemática do ponto de punção umbilical, da goteira parietocólica direita de forma ascendente até o fígado ultrapassando o ligamento falciforme, visualização de ambas as cúpulas diafragmáticas, o ângulo esplênico do cólon, assim como o estômago, a goteira parietocólica esquerda de forma descendente até a pelve. Na pelve eram observados o corpo uterino, a reflexão útero-vesical anteriormente e reto-uterina posteriormente, as fossas ováricas bilateralmente, as trompas e ligamentos redondos de sua inserção uterina até as extremidades, inspeção rigorosa da ampola e fimbrias tubárias e finalmente, do peritônio parietal pélvico. Uma vez identificadas lesões sugestivas (ASRM, 1997), procediam-se as biópsias através da dissecação e ressecção por tesoura laparoscópica tipo Metzenbaum sem uso de eletrocautérios. As peças eram acondicionadas em frascos rotulados com o nome e número de registro da paciente e o sítio de biópsia, contendo formol para conservação.

O estadiamento foi feito de acordo com a classificação revisada da American Society for Reproductive Medicine (ASRM, 1997). Foram excluídas do estudo pacientes com diagnóstico histopatológico prévio de endometriose, irregularidade menstrual ou no climatério, apresentando doenças crônicas e com história progressiva de doença inflamatória pélvica (DIP), doença com acometimento peritoneal ou cirurgia abdominal prévia.

### *Exame histopatológico*

As peças obtidas cirurgicamente foram acondicionadas em frascos contendo formol para conservação. Os tecidos biopsiados foram então processadas com fixação em parafina e coloração pela técnica de Hematoxilina-eosina (HE). O critério diagnóstico histopatológico usado foi o sugerido por Clement (1990) que necessita da identificação de dois entre três dos achados a seguir: presença de estroma endometrial, presença de glândulas endometriais ou presença de depósitos de Hemossiderina e tecido cicatricial (fibrose) inflamatório e/ou hemorrágico.

Todas as lâminas foram identificadas por números e, em seguida, examinadas por três patologistas quanto à presença ou ausência de achados microscópicos suficientes para o diagnóstico definitivo. Os patologistas recebiam, para cada lâmina, um impresso contendo os dados clínicos relativos à paciente, o sítio de biópsia, a descrição dos achados cirúrgicos à videolaparoscopia e um local para assinalar SIM ou NÃO quanto ao diagnóstico histopatológico. Os resultados obtidos das três observações foram submetidos à análise comparativa.

### *Análise estatística*

O cálculo para estimar o tamanho da amostra necessária para se obter um resultado com poder de 0,95 e uma probabilidade de falha em se rejeitar a hipótese nula de 5% determinou serem necessárias avaliações de 58 lâminas por, no mínimo, 3 examinadores diferentes neste caso, que compreende diagnóstico histopatológico de uma doença com prevalência média de 15% na população (Sim & Wright, 2005).

Para análise dos resultados foi utilizado o teste de *Kappa* que determina a integridade de um teste diagnóstico observador dependente através da quantificação numérica do grau de concordância entre dois ou mais observadores. Foram considerados os valores de *Kappa* iguais a 0 (zero) como concordância nula e, próximos a 1 (um) como concordância perfeita das observações. Valores de 0,2 a 0,39 foram considerados como concordância pobre; 0,4 a 0,59 foram considerados regulares, de 0,6 a 0,79 de concordância forte.

**Tabela 1.** Achados Clínicos Determinantes da Indicação para Laparoscopia

Sinais e / ou Sintomas	n	%
Dismenorréia limitante	81	20,5
Dispareunia	51	13,0
Infertilidade sem causa aparente	28	7,1
Infertilidade (fator tubo-peritoneal)	87	22,0
Nódulos de fundo de saco de Douglas	22	5,6
Endometrioma ovariano (ultrassonografia)	126	31,8

**Tabela 2.** Análise da Variabilidade Intra-observador do Exame Anatomopatológico de Lâminas de Endometriose

Avaliadores	Lâminas	Lâminas Concordantes	Percentual (%) (IC de 95%)	Kappa (IC de 95%)	Teste Z (valor de p)
1	68	63	92,6 (83,7; 97,6)	0,85 (0,61; 1,00)	7,001 (<0,001)
2	68	63	92,6 (83,7; 97,6)	0,85 (0,61; 1,00)	7,001 (<0,001)
3	68	64	94,1 (85,6; 98,6)	0,88 (0,64; 1,00)	7,268 (<0,001)

**Tabela 3.** Análise da Variabilidade Inter-observador do Exame Anatomopatológico de Lâminas de Endometriose

Avaliadores	Lâminas	Lâminas Concordantes	Percentual (%) (IC de 95%)	Kappa (IC de 95%)	Teste Z (valor de p)
3	68	52	76,5 (64,6; 85,9)	0,78 (0,72; 0,85)	25,025 (<0,001)

## RESULTADOS

Do total de 463 mulheres submetidas à videolaparoscopia, durante o período de julho de 2006 a julho de 2007, 395 apresentaram lesões sugestivas de endometriose, o que representa uma incidência de 85,31% entre as mulheres com quadro clínico sugestivo. As indicações para a cirurgia estão descritas na Tabela 1.

Foram excluídas do grupo inicial, 279 pacientes por apresentarem doenças crônicas como Hipertensão Arterial Sistêmica (93 - 33,3%), Diabetes Mellitus (67 - 24%), alterações da função tireoidiana como Hipertireoidismo (8 - 2,8%) ou Hipotireoidismo (25 - 9,4%), diagnóstico histopatológico prévio de endometriose (16 - 5,5%), alterações do ciclo menstrual ou sintomas de Climatério (70 - 25%). Das 116 pacientes restantes, 48 recusaram-se a participar do estudo. Assim, foram analisadas as lâminas de corte histológico de 68 pacientes por microscopia óptica.

A idade das pacientes variou de 16 a 48 anos com média de 34,57 ± 8,85. Com relação à paridade, 6 pacientes (8,8%) eram múltiplas, 11 (16,2%) tinham apenas um filho e as 51 restantes (75%) eram nulíparas.

Dentre as 68 lâminas avaliadas, 25 (36,8%) eram provenientes de fragmentos ovarianos, 20 (29,4%) de biópsias peritoneais, 9 (13,2%) de nódulos de parede abdominal, 8 (11,8%) de trompas uterinas e 6 (8,8%) do septo reto-vaginal. Todas as 25 lâminas resultantes de biópsia ovariana, foram coletadas de pacientes que apresentavam lesões císticas ovarianas volumosas (diâmetro superior a 5cm) de conteúdo denso e escurecido com aspecto de "chocolate". Das lesões peritoneais, o achado laparoscópico mais freqüente foi o de lesões tipo mancha "café com leite" totalizando 11 lâminas (55%). As lesões negras ou azuis seguiram com 6 (30%) e as lesões brancas, vesículas e janelas peritoneais foram menos freqüentes com 1 caso cada (5%). Não houve casos de lesões vermelhas ou róseas. O sítio de biópsia peritoneal mais freqüente foi o das fossas ováricas com 12 casos (60%), seguido do fundo de saco posterior entre as inserções uterinas dos lig. útero-sacros com 5 casos (25%) e, por último, da reflexão véscouterina com 3 casos (15%).

Em 38 das 68 lâminas examinadas, os avaliadores concordaram quanto à presença de endometriose e, nas 30 lâminas restantes, houve divergência quanto à presença em 11 lâminas e concordância quanto à ausência de achados histopatológicos em 19 lâminas. Isso quer dizer que em 55,9% dos casos não houve dúvida nos achados histopatológicos positivos para endometriose. Das 11 lâminas em que houve discordância de diagnósti-

co, duas foram discordantes entre todas as avaliações, ou seja, todos os examinadores discordaram de si mesmos individualmente gerando três pares de resultados discordantes. Ocorreu discordância entre examinadores diferentes em 9 lâminas.

Todos os patologistas apresentaram uma percentagem de concordância individual acima de 92%. Cada examinador avaliou 68 lâminas em duas ocasiões diferentes, sem saber que se tratavam das mesmas lâminas. O primeiro examinador emitiu um segundo laudo concordante com o laudo inicial em 63 das 68 lâminas examinadas (92,6% de concordância) com valor de Kappa de 0,85 o que representa uma concordância forte, ou praticamente perfeita ( $p < 0,001$ ). O segundo examinador apresentou a mesma percentagem de concordância que o primeiro (92,6%), porém em lâminas diferentes ( $p < 0,001$ ). O terceiro examinador apresentou um grau de concordância de 94,1% (64/68) com valor de Kappa de 0,88 ( $p < 0,001$ ) (Tabela 2).

Do total de 68 lâminas avaliadas por cada um dos três examinadores, em 52 não houve discordância (76,5%) (Tabela 3). Assim, o valor de Kappa calculado (0,78) demonstra elevada concordância entre os examinadores e deve ser interpretado como um alto grau de integridade para o teste ( $p < 0,001$ ).

## DISCUSSÃO

Atualmente, existe uma tendência para que as condutas tomadas em pacientes com suspeita de endometriose sejam baseadas nos achados clínicos ou no impacto sobre a qualidade de vida de cada paciente (Gary, 2004; Marchino, 2005; ESHRE 2005, ASRM, 2006). Conseqüentemente, o diagnóstico de endometriose vem perdendo progressivamente seu valor e sua objetividade.

Quando se deseja estudar a endometriose do ponto de vista científico, acreditamos ser fundamental que se apresentem métodos reprodutíveis e padronizados, a fim de tornar os resultados obtidos comparáveis. O método diagnóstico utilizado em cada pesquisa deve ser sempre o padrão-ouro. Assim, realizamos esse estudo que, ao nosso entender, é o primeiro realizado especificamente com o objetivo de avaliar a integridade do exame histopatológico. Esta constatação deverá definir se este exame deve ou não continuar a ser utilizado como a referência "padrão-ouro" no diagnóstico de endometriose.

Através da análise de concordância intra e inter observador, realizadas pelo teste de Kappa, foi possível demonstrar que dos casos com suspeita clínica de endometriose e que, à laparoscopia, apresentam achados visualmen-

te compatíveis com endometriose, somente 56% (33/68) obtêm confirmação histológica. Esse dado nos leva a questionar a confiabilidade da videolaparoscopia como método diagnóstico único, em acordo com o que já haviam descrito Martin *et al* em 1989 e Nisolle *et al* em 1990, que apresentaram 15% e 13% de biópsias positivas em peritônio visualmente normal, respectivamente. Walter *et al* em 2001 obtiveram um VPP para a videolaparoscopia isolada de 45% e especificidade de 77%, em concordância com os nossos achados. Por fim, no estudo realizado por Mettler *et al* em 2003 a confirmação histológica ocorreu em apenas 53,8% dos casos (142/264) corroborando a impressão de Walter *et al* em 2001 de que a videolaparoscopia isolada é falha como método diagnóstico. Infelizmente nosso numero de casos com cistos não é suficiente para saber se existe diferença na sensibilidade da laparoscopia de lesões pequenas e grandes, pois quando do calculo amostral não os separamos por tamanho.

Por outro lado, existem autores com resultados discordantes aos nossos como Cornillie *et al* (1990), que descreveram alto grau de confirmação histológica (81,7%) para a laparoscopia. Em nosso entender, essa discordância pode se dever ao fato de mais da metade das pacientes operadas neste grupo ter apresentado endometriose profunda do septo reto-vaginal (55%) e outras várias (34%) apresentarem nódulos do ligamento úterossacro, isto é, o grupo de estudo era composto por pacientes com quadros de endometriose grave, o que poderia significar um viés no estudo. Marchino *et al* (2005) e Leng *et al* (2006) sugerem que para se fazer a melhor opção terapêutica é necessário um diagnóstico, um sistema de classificação e um estadiamento de base histopatológica, além de ênfase particular no tipo de desenvolvimento da endometriose (superficial ou profunda).

Nosso estudo foi realizado com base na premissa de que um método diagnóstico deve apresentar alto grau de integridade para sustentar sua aplicabilidade clínica. Os métodos diagnósticos observador dependentes estão sujeitos a erro devido ao seu caráter subjetivo e pessoal de interpretação que varia com o tempo de experiência do profissional, sua área de interesse de estudo e mesmo com o tipo de serviço onde o estudo é realizado.

A constatação de um alto grau de integridade do método de diagnóstico histopatológico para a endometriose, através da análise de concordância inter ( $Kappa=0,78$ ) e intra observador ( $Kappa = 0,85-0,88$ ) se traduz em confiabilidade e reprodutibilidade de resultados, conforme haviam sugerido Gary (2004) e Sharpe-Timms (2005).

Uma vez que a laparoscopia como método isolado não atende ao nível de confiabilidade necessário para um diagnóstico definitivo, paralelamente ao achado de que o exame histopatológico apresenta alto grau de integridade, conforme apresentado neste estudo de forma inédita, conclui-se que o padrão ouro definido para a endometriose deve ser o exame histopatológico. Em resumo, nosso estudo demonstrou que para os casos suspeitos de endometriose, durante a videolaparoscopia, é necessário realizar a confirmação histológica, a fim de se estabelecer uma padronização de conduta.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Anísio Nunes, Dr. Rodrigo Assis de Paula, Prof. Dr. Omar de Paula Ricardo Filho) e Dr. Mauricio Buzelin Nunes, pela colaboração na realização deste estudo.

## Endereço para correspondência

Rodrigo Hurtado  
Avenida Brasil, 1693 apt. 601  
Funcionários CEP 30.140-002  
Belo Horizonte – Minas Gerais  
(31) 2102-6363  
rodrigohurtado@origem.com.br

## Referências Bibliográficas

- Albee RB Jr, Sinervo K, Fisher DT. Laparoscopic excision of lesions suggestive of endometriosis or otherwise atypical in appearance: relationship between visual findings and final histologic diagnosis. *J Minim Invasive Gynecol.* 2008;15(1): 32-7.
- American Society for Reproductive Medicine (ASRM) (1997) Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis. *Fertil Steril.* 1996; 67: 817-21.
- Bergqvist A, Ljungberg O, Myhre E. Human endometrium and endometriotic tissue obtained simultaneously: a comparative histological study. *Int J Gynecol Pathol.* 1984; 3(2): 135-45.
- Candiani GB. The classification of endometriosis: historic evolution, critical review and present state of the art. *Acta Eur Fertil.* 1986; 17: 85-92.
- Clement PB. Pathology of endometriosis. *Pathol Annu.* 1990; 245-95.
- Cramer DW, Wilson E, Stillman RJ, Berger MJ, Belisle S, Schiff I, Albrecht B, Gibson M, Stadel BV, Schoenbaum SC. The relation of endometriosis to menstrual characteristics, smoking and exercise. *JAMA.* 1985; 255: 1904-08.
- Cohen MR. Surgical laparoscopy in infertility. *J Reprod Med.* 1975; 15(2): 51-3.
- Cornillie FJ, Oosterlynck D, Lauweryns JM, Koninckx P. Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance. *Fertil Steril.* 1990; 53: 411-6.
- Counseller VS. *Am J Obstet Gynecol.* 1938; 36: 877.
- Cullen TS. The distribution of adenomyomas containing uterine mucosa. *Arch Surg.* 1920; 1: 215-83.
- Gary R. The endometriosis syndromes: a clinical classification in the presence of aetiological confusion and therapeutic anarchy. *Hum Reprod.* 2004; 19(4): 760-768.
- Haney AF. Endometriosis-associated infertility. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 1993; 7(4): 791-812.
- Hornstein MD, Gleason RE, Orav J, Haas ST, Friedman AJ, Rein MS, Hill JA, Barbieri RL. The reproducibility of revised American Fertility Society classification of endometriosis. *Fertil Steril.* 1993; 59: 1015-21.
- Jackson B, Telner DE. Managing the misplaced: approach to endometriosis. *Can Fam Physician.* 2006; 52(11): 1420-4.
- Karoń J, Owczarek A, Gwiazdowska B, Patek J. Analysis of endometriosis cases from 10-years of surgical material. *Wiad Lek.* 1993; 46(5-6): 199-200.
- Leng JH, Lang JH, Zhao XY, Li HJ, Guo LN, Cui QC. Visual and histologic analysis of laparoscopic diagnosis of endometriosis. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2006; 41(2): 111-3.
- Marchino GL, Gennarelli G, Enria R, Bongioanni F, Lipari G, Massobrio M. Diagnosis of pelvic endometriosis with use of macroscopic versus histologic findings. *Fertil Steril.* 2005; 84(1): 12-5.
- Martin DC, Hubert GD, Vander Zwaag R, el-Zeky FA. Laparoscopic appearances of peritoneal endometriosis. *Fertil Steril.* 1989; 51(1): 63-7.
- Mettler L, Schollmeyer T, Lehmann-Willenbrock E, Schüppler U, Schmutzler A, Shukla D, Zavala A, Lewin A. Accuracy of laparoscopic diagnosis of endometriosis. *JSLs.* 2003; 7(1): 15-8.
- Moen MH, Schei B. Epidemiology of endometriosis in a Norwegian county. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1997; 76(6): 559-62.
- Nisolle M, Paindaveine B, Bourdon A, Berlière M, Casanas-Roux F, Donnez J. Histologic study of peritoneal endometriosis in infertile women. *Fertil Steril.* 1990; 53(6): 984-8.
- Sharpe-Timms KL. Defining endometrial cells: the need for improved identification at ectopic sites and characterization in eutopic sites for developing novel methods of management for endometriosis. *Fertil Steril.* 2005; 84(1): 35-7.
- Sim J, Wright CC. The kappa statistic in reliability studies: use, interpretation, and sample size requirements. *Phys Ther.* 2005; 85: 257-68.
- Vercellini P, Fedele L, Aimi G, DE Giorgio O, Consonni D, Crosignani PG. Reproductive performance, pain recurrence and disease relapse after conservative surgical treatment for endometriosis: the predictive value of the current classification system. *Hum Reprod.* 2006; 21(10): 2679-85.
- Walter AJ, Hentz JG, Magtibay PM, Cornella JL, Magrina JF. Endometriosis: correlation between histologic and visual findings at laparoscopy. *Am J Obstet Gynecol.* 2001; 184(7): 1407-11.

# Fatores preditivos do sucesso da inseminação intrauterina: a morfologia espermática de acordo com o novo manual de laboratório da Organização Mundial de Saúde

Predictive factors of intrauterine insemination success: sperm morphology according to the new World Health Organization laboratory manual

Fabio Biaggioni Lopes, M.D.<sup>a</sup>, Amanda Souza Setti, B.Sc.<sup>b\*</sup>, Daniela Paes de Almeida Ferreira Braga, DVM, M.Sc.<sup>a</sup>, Rita de Cássia Savio Figueira, M.Sc.<sup>a</sup>, Assumpto Iaconelli Jr., M.D.<sup>a,b</sup>, Edson Borges Jr., M.D., Ph.D.<sup>a,b,c</sup>

## AFILIAÇÃO

<sup>a</sup>Fertility – Centro de Fertilização Assistida

Av. Brigadeiro Luis Antônio, 4545.

São Paulo – SP, Brasil. CEP: 01401-002

<sup>b</sup>Instituto Sapientiae – Centro de Ensino e Pesquisa em Reprodução Assistida

Rua Vieira Maciel, 62.

São Paulo – SP, Brasil. CEP: 04503-040

<sup>c</sup>Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Botucatu UNESP Botucatu – SP – Brasil

Distrito de Rubião Junior – CEP: 18618-970 Botucatu – SP

\*Os dois autores contribuíram igualmente para esse trabalho.

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar a probabilidade de sucesso da IUI em função dos fatores preditivos descritos previamente, incluindo a morfologia espermática de acordo com os novos valores definidos pela OMS. **Métodos:** Este estudo retrospectivo envolveu 300 casais que foram submetidos à IUI. A idade materna, o número de folículos pré-ovulatórios no dia da administração do hCG, número de espermatozoides móveis inseminados e morfologia espermática normal foram correlacionados com a gravidez clínica. Os resultados foram expressos como *odds ratio* (OR) com 95% de intervalos de confiança (IC). **Resultados:** Mulheres com mais de 35 anos mostraram uma menor taxa de gravidez (6.5% vs 18.2%,  $p = 0.017$ ). Modelos de regressão logística confirmaram a menor chance de gravidez para as mulheres mais velhas (OR: 0.39, IC: 0.16-0.96,  $p = 0.040$ ). A presença de dois ou mais folículos pré-ovulatórios no dia da administração de hCG resultou em maior taxa de gravidez quando comparada aos casos em que apenas um folículo pré-ovulatório estava presente (18.6% vs 8.2%,  $p = 0.011$ ). Um aumento de mais de duas vezes na probabilidade de gravidez foi observado quando dois ou mais folículos pré-ovulatórios foram detectados (OR: 2.58, IC: 1.22-5.46,  $p = 0.013$ ). O número de espermatozoides móveis inseminados influenciou positivamente a ocorrência de gravidez (OR: 1.47, IC: 0.88-3.14,  $p = 0.027$ ). Taxas de gestação semelhantes foram observadas quando as amostras possuíam morfologia normal ou anormal (10.6% vs 10.2%,  $p = 0.936$ ). **Conclusão:** A morfologia espermática de acordo com o novo valor de referência, não tem valor preditivo nos resultados da IUI.

**Palavras-chave:** inseminação intra-uterina; morfologia espermática; taxa de gestação.

## ABSTRACT

**Objective:** The aim of our study was to assess the likelihood of IUI success as a function of the previously described predictive factors, including sperm morphology according to the new reference values defined by WHO. **Material and Methods:** This retrospective study enrolled 300 couples which underwent IUI. Regression

analyses were used to correlate maternal age, number of preovulatory follicles on the day of hCG administration, number of inseminated motile sperm, and normal sperm morphology with clinical pregnancy. Results are expressed as odds ratio (OR) with 95% of confidence intervals (CI). **Results:** Women older than 35 years showed a lower pregnancy rate (6.5% vs 18.2%,  $p=0.017$ ). Logistic regression models confirmed the lower chance of pregnancy occurrence for older women (OR: 0.39; CI: 0.16–0.96;  $p=0.040$ ). The presence of two or more preovulatory follicles on the day of hCG administration resulted in higher pregnancy rate when compared to cases in which only one preovulatory follicle was present (18.6% vs 8.2%,  $p=0.011$ ). The regression model showed a more than two fold increase on probability of pregnancy when two or more preovulatory follicles were detected (OR: 2.58; CI: 1.22–5.46,  $p=0.013$ ). The number of inseminated motile sperm positively influenced pregnancy occurrence (OR: 1.47; CI: 0.88–3.14,  $p=0.027$ ). Similar pregnancy rates were observed when semen samples were classified as having normal or abnormal morphology (10.6% vs 10.2%,  $p=0.936$ ). **Conclusion:** Our results demonstrate that sperm morphological normalcy, according to the new reference value, has no predictive value on IUI outcomes.

**Key words:** intrauterine insemination; pregnancy rate; sperm morphology.

## INTRODUCTION

Currently, medical advice for infertility is requested for 16% of prospective parents (Merviel et al. 2008), therefore, identifying which couples are likely to benefit from artificial insemination or *in vitro* fertilization (IVF) techniques is of pivotal importance.

Intrauterine insemination (IUI), which has been used for over 200 years, relies on the increase of gamete density in the site of fertilization (Ombelet et al. 2003). This method is widely used for treating infertility in couples because it is a simple, minimally invasive, relatively inexpensive, and acceptable intervention in reproductive medicine (Karabinus and Gelety 1997; Badawy et al. 2009). There are a variety of indications for IUI such as

cervical infertility, relative male factor infertility, anovulation, endometriosis with a healthy fallopian tube, and, lastly, unexplained infertility (Merviel *et al.*, 2008).

Since the introduction of the technique, IUI has progressed through advances in reproductive medicine techniques such as semen preparation, monitoring for preovulatory timing and induction of ovulation with human chorionic gonadotrophin (hCG) (Merviel *et al.*, 2008). Intrauterine insemination can be performed with or without controlled ovarian stimulation (COS). The intention of ovarian stimulation is to induce growth of the two or three most gonadotrophin-sensitive follicles (Freiesleben *et al.* 2008). The rationale for addition of COS with IUI is to increase the pregnancy rate by multifollicular growth (Cohlen *et al.* 1998), nonetheless, studies reporting on the number of preovulatory follicles in relation to pregnancy rates in ovarian stimulation with IUI show contradictory results (Tomlinson *et al.* 1996; Nuojua-Huttunen *et al.* 1999; Stone *et al.* 1999; Dickey *et al.* 2002; Iberico *et al.* 2004; Steures *et al.* 2004; van Rumsste *et al.* 2006).

Although IUI is a commonly used treatment, a reliable prediction of a successful ongoing pregnancy cannot be given for a specific couple. Several studies have demonstrated that the outcome of IUI is dependent on maternal age, duration of subfertility, the sperm count in the initial analysis or in the catheter, the number of mature follicles, the E2 concentration on the day of hCG administration, and the type of catheter used (Steures *et al.*, 2004; Merviel *et al.*, 2008). Moreover, pregnancy rates after IUI differ from one study to another according to patient inclusion criteria, wide range of infertility factors, different ovarian stimulation protocols, number of cycles performed, variable sperm parameters, and technique of preparation (Badawy *et al.*, 2009).

Despite IUI often has been used as a treatment for male factor infertility, seminal characteristics indicative of IUI success have not been defined clearly (Karabinus and Gelety 1997). Recently, the 5<sup>th</sup> World Health Organization (WHO) (WHO 2010) data described lower reference limits for the number of morphologically normal spermatozoa. The aim of our study was to assess the likelihood of IUI success as a function of the previously described predictive factors, including sperm morphology according to the new reference values defined by the recently published WHO guideline.

## MATERIALS & METHODS

### Experimental design

We performed a retrospective study among 300 consecutive couples (women younger than 40 years of age) that had been treated with IUI. The data were collected between June 2002 and April 2009. Institutional Review Board approval was obtained for this study. All couples completed their first IUI cycle, using father's fresh sperm as a result of relative male factor infertility, ovarian factor or unexplained infertility. Enrolled couples had to have been trying unsuccessfully to conceive for at least 12 months.

Pregnancy rates and percentage of patients which presented one and more than one preovulatory follicle on the day of hCG administration ( $\geq 16\text{mm}$ ) were compared between cycles from female patients with age  $\leq 35$  years and  $> 35$  years. In addition, pregnancy rates were compared between cycles with number of preovulatory follicles on the day of hCG administration = 1 and  $\geq 2$ . The influences of maternal age and number of preovulatory follicles on the day of hCG administration ( $\geq 16\text{mm}$ ) on clinical pregnancy were evaluated.

Normal sperm morphology was adjusted to the recent WHO guideline (WHO 2010). All semen samples were considered to be normal with  $\geq 4\%$  of morphologically normal spermatozoa. Pregnancy rates were compared between the patients characterized as having normal and abnormal sperm morphology values according to the previous and the recent WHO reference values. The influence of normal sperm morphology on clinical pregnancy was evaluated.

The number of inseminated motile sperm was compared between the patients who did and did not achieve a pregnancy and the influence of the number of inseminated motile sperm on clinical outcome was evaluated.

In a further analysis the cycles were divided in four groups according to IUI indication (Group UI, unexplained infertility,  $n=124$ ; Group MF, male factor,  $n=100$ ; and Group OF, ovarian factor,  $n = 76$ ). The maternal and paternal age, number of preovulatory follicles on the day of hCG administration ( $\geq 16\text{mm}$ ), total dose of follicle stimulating hormone administrated (FSH), endometrial length, female body mass index (BMI), sperm morphology, total number of inseminated sperm, number of inseminated motile sperm and clinical pregnancy rates were compared among the groups.

### IUI protocol

All IUI cycles were preceded by ovarian stimulation with human recombinant follicle stimulating hormone (rFSH, Gonal-F<sup>®</sup>, Serono, Geneva, Switzerland). Cycles were monitored by transvaginal ultrasound for the mean follicular volume and thickness of the endometrium. Human chorionic gonadotrophin (hCG, Ovidrel<sup>®</sup>, Serono, Geneva, Switzerland) was administered to induce ovulation when a follicle had a diameter of at least 16mm. Patients were inseminated 36–40 hours thereafter. The IUI was performed with 0.5mL of a suspension of processed spermatozoa introduced into the uterine cavity with an artificial insemination catheter. The luteal phase was routinely supported with micronized progesterone. Serum hCG was determined 2 weeks after hCG injection and clinical pregnancy was defined as the presence of fetal cardiac activity at transvaginal ultrasound at a gestational age of at least five weeks.

### Semen analysis and preparation

All semen samples were collected in the laboratory after 3 to 5 days of ejaculatory abstinence. After liquefaction for 30 minutes at room temperature, the semen samples were evaluated according to the threshold values established by the WHO in 1999 (WHO 1999) (concentration  $\geq 20 \times 10^6/\text{mL}$ , total count  $\geq 40 \times 10^6$  and progressive motility  $> 50\%$ ). Typical morphology was evaluated according to Kruger criteria (Kruger *et al.* 1987).

Density gradient centrifugation technique was used for sperm preparation. All procedures were conducted under sterile conditions. Using a sterile pipette 1.0mL of the "lower layer" (90% Isolate, Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) was transferred into a conical centrifuge tube. Using a new sterile pipette 1.0mL of the "upper layer" (50% Isolate, Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) was gently dispensed on top of the lower layer. A liquefied 2.0mL semen sample was then placed on top of the upper layer and the tube was centrifuged for 20 minutes at 330  $\times g$  and this process was repeated using additional tubes until the whole ejaculated sample was processed. The upper and lower layers were carefully aspirated without disturbing the pellet. Using a transfer pipette, 1.0mL of HEPES-buffered human tubal fluid medium (mHTF, Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) was added and the re-suspended pellet was centrifuged for 7 minutes at 330  $\times g$ . The washing procedure was repeated. The supernatant was then removed and the pellet suspended in a volume of 0.5 mL of mHTF. Sperm count and motility were estimated in the recovered fractions.

### Data analysis

Proportions (%) were used for categorical variables and compared by the Chi-squared or Fisher exact test, only when expected frequency was five or less. Results were considered to be significant at the 5% critical level ( $p < 0.05$ ). Mean values were used for continuous variables and compared by Mann-Whitney non-parametric test. Regression analyses models were used to correlate maternal age, number of preovulatory follicles on the day of hCG administration, number of inseminated motile sperm and normal sperm morphology with clinical

**Table 1.** Relationship between IUI indication, characteristics of the cycles and outcomes

Variables	IUI indications		
	Unexplained infertility (n=124)	Male factor (n=100)	Ovarian factor (n=76)
Maternal age	31.9+0.4 <sup>b</sup>	33.4+0.5 <sup>ab</sup>	33.8+1.0 <sup>ab</sup>
Paternal age	36.3+0.6 <sup>ab</sup>	37.6+0.7 <sup>a</sup>	35.4+1.2 <sup>ab</sup>
Follicles (≥16mm)	2.8+0.2 <sup>a</sup>	2.6+0.3 <sup>a</sup>	2.5+0.3 <sup>a</sup>
FSH (IU)	818.4+35.2 <sup>a</sup>	828.8+40.2 <sup>a</sup>	924.0+64.0 <sup>a</sup>
Endometrial length	11.7+0.2 <sup>ab</sup>	12.1+0.3 <sup>a</sup>	10.8+0.4 <sup>b</sup>
Body Mass Index (BMI)	22.6+0.4 <sup>a</sup>	22.6+0.5 <sup>a</sup>	21.5+0.9 <sup>a</sup>
Sperm morphology	5.2+0.4 <sup>b</sup>	2.6+0.3 <sup>c</sup>	8.7+0.8 <sup>a</sup>
Total number of inseminated sperm	39.8+3.8 <sup>ab</sup>	28.5+3.3 <sup>b</sup>	34.0+4.6 <sup>ab</sup>
Number of inseminated motile sperm	31.4+2.8 <sup>ab</sup>	20.3+2.5 <sup>b</sup>	27.5+3.8 <sup>ab</sup>
Clinical pregnancy rate (%)	14.0 <sup>a</sup>	3.6 <sup>a</sup>	7.7 <sup>a</sup>

Values are Mean ± Standard deviation, unless otherwise noted. Means with the same letter are not significantly different.

cal pregnancy. Results are expressed as odds ratio (OR) with 95% of confidence intervals (CI) and considered to be significant at the 5% critical level ( $p < 0.05$ ). Data analysis was carried out using SAS System for Windows.

## RESULTS

The overall pregnancy rate was 12.3%. Women older than 35 years showed a lower pregnancy rate as compared to women younger than 35 years (6.5% vs 18.2%,  $p = 0.017$ ). Binary logistic regression models confirmed the significant lower chance of pregnancy occurrence for older women (OD: 0.39; CI: 0.16 – 0.96;  $p = 0.040$ ). The total multiple pregnancy rate was 21.9%.

The presence of two or more preovulatory follicles on the day of hCG administration resulted in higher pregnancy rate when compared to cases in which only one preovulatory follicle was present (18.6% vs 8.2%,  $p = 0.011$ ). The regression model showed a more than two fold increase on probability of pregnancy when two or more preovulatory follicles were detected (OD: 2.58; CI: 1.22 – 5.46,  $p = 0.013$ ). There were no significant differences in the percentage of patients who produced only one follicle ≥16mm (41.3% vs 51.6%,  $p = 0.0899$ ) or more than one follicle ≥16mm (37.5% vs 29.5%,  $p = 0.1637$ ) between women up to 35 years old and women older than 35 years. There were no significant differences between the mean total number of inseminated sperm ( $26.4 \pm 21.7$  vs  $34.86 \pm 33.12$ ,  $p = 0.1237$ ) and the mean number of inseminated motile sperm ( $22.3 \pm 18.6$  vs  $27.0 \pm 24.5$ ,  $p = 0.3156$ ) between the patients who did and did not achieve a pregnancy. Nonetheless, in order to detect whether there is a minimum number of inseminated motile sperm in which the pregnancy would be impaired, the samples were evaluated and the result shows that the number of inseminated motile sperm  $\geq 1 \times 10^6$  M/mL positively influenced pregnancy occurrence (OD: 1.47; CI: 0.88 – 3.14,  $p = 0.027$ ).

Pregnancy rates did not differ neither when the male partners were characterized as having normal or abnormal sperm morphology according to the previous WHO reference values (9.8% vs 11.6%,  $p = 0.6584$ ), nor when the male partners were characterized as having normal or abnormal sperm morphology according to the recent WHO reference values (9.4% vs 11.3%,  $p = 0.7469$ ). Finally, normal sperm morphology had no influence on pregnancy rate (OD: 1.05; CI: 0.56 – 3.02,  $p = 0.936$ ).

Regarding the relationship between IUI indication and cycles' characteristics and outcomes, endometrial length was significantly higher in Group MF as compared to Group OF. Sperm morphology was significantly higher in Group OF as compared to all the other groups and signifi-

cantly lower in MF group as compared to all the other groups. Nevertheless, no differences were observed in pregnancy rates. These results are shown in Table 1.

## DISCUSSION

Treatment of subfertile couples with IUI appears to be a valuable first line treatment before introducing more invasive and more expensive techniques of assisted fertilization in couples with various subfertility causes. Although IUI is the oldest technique in the spectrum of assisted reproduction, the pregnancy rates have not progressed as compared to IVF remarkable pregnancy rate improvement.

This study sought to determine the significance of different variables in the prediction of pregnancy rates in IUI patients. Our data suggests that female age, number of preovulatory follicles and number of inseminated motile spermatozoa are the best predictors of pregnancy rates in IUI cycles. No influence of the sperm morphology according to the previous or the recent WHO reference values on pregnancy rate was observed.

Female age has previously been reported as predictor of pregnancy rate in IUI cycles (Steures et al., 2004). Accordingly, Badawy et al (2009) also observed that women older than 35 years of age have lower chances of success in IUI cycles as compared to younger patients. In another study, the woman's age was the strongest predictor of success in all indications (Merviel et al., 2008).

Our data suggests that the number of preovulatory follicles on the day of hCG administration predicts pregnancy rates in IUI cycles. Park et al (2007) addressed this correlation and reported that multiple follicular response increases pregnancy rate in IUI cycles. In a meta-analysis, multifollicular growth was associated with increased pregnancy rates in IUI with controlled ovarian hyperstimulation (van Rumste et al., 2006).

In our study, the number of inseminated motile spermatozoa was determinant to the likelihood of pregnancy. This finding is in accordance with Tomlinson et al. (1996). We observed a significant different pregnancy rates when the number of inseminated motile spermatozoa was below and superior to 1 million. Accordingly, Belaisch-Allart et al. (1999) reported similar results. Nonetheless, one study observed that the pregnancy rates per cycle were not statistically significant when the number of inseminated motile spermatozoa was below and superior to 1 million (Merviel et al., 2008). Contrarily, Campana et al. (Campana et al. 1996) did not obtain any pregnancies when the number of inseminated motile spermatozoa was below 1million.

Universally, the most common accepted classification

system used for sperm morphology is the WHO criteria (Badawy et al., 2009). The threshold of spermatozoa with normal morphology below which IVF is recommended varies widely in the literature (Francavilla et al. 1990; Burr et al. 1996; Hauser et al. 2001). However, the implication of sperm morphology for choice and outcome of IUI is controversial. Our study failed to correlate the minimal number of spermatozoa with normal morphology ( $\geq 4\%$ ), according to the WHO (WHO 2010), with IUI outcome.

Burr et al. (1996) observed a decrease in pregnancy rate when teratospermia reached 90%. It has been suggested that a teratospermia rate over 80% implicates in the impairment of IUI success (Belaisch-Allart et al., 1999). Another study reported that the pregnancy rates were not significantly influenced by teratospermia as long as more than 5 million motile spermatozoa were available for insemination (Wainer et al. 2004). Contrarily, Merviel et al (2008) observed a significant decrease in pregnancy rate with a degree of teratospermia  $> 70\%$ . Moreover, many previous studies also demonstrated that sperm morphology, before or after preparation, did not predict IUI pregnancy rates (Matorras et al. 1995; Karabinus and Gelety 1997; Dickey et al., 2002).

As an attempt to identify which infertility causes should benefit the most from IUI techniques, the cycles were divided into three groups according to IUI indication. Despite the observed differences regarding endometrial length and sperm morphology, pregnancy rates did not differ among the groups.

## CONCLUSION

Our results suggest that couples with the best probability of pregnancy are those in which the woman is under 35 years old and the inseminated motile sperm count was at least 1 million. In addition, the ideal stimulation cycle allows the recruitment of at least two follicles measuring more than 16mm on the day of hCG administration. Our results demonstrate that even after the establishment of new reference values for semen parameters, sperm morphological normalcy still does not have any predictive value on IUI outcomes.

## Autor Correspondente

Edson Borges Jr., M.D., PhD

E-mail: edson@fertility.com.br

Address: Av. Brigadeiro Luis Antonio, 4545. CEP: 01401-002 São Paulo – SP, Brasil

Phone: (55 11) 3018-8181

## Referências Bibliográficas

- Badawy A, Elnashar A and Elotongy M. Effect of sperm morphology and number on success of intrauterine insemination. *Fertil Steril.* 2009;91:777-81.
- Belaisch-Allart J, Mayenga JM and Plachot M. [Intra-uterine insemination]. *Contracept Fertil Sex.* 1999;27:614-9.
- Burr RW, Siegborg R, Flaherty SP, et al. The influence of sperm morphology and the number of motile sperm inseminated on the outcome of intrauterine insemination combined with mild ovarian stimulation. *Fertil Steril.* 1996;65:127-32.
- Campana A, Sakkas D, Stalberg A, et al. Intrauterine insemination: evaluation of the results according to the woman's age, sperm quality, total sperm count per insemination and life table analysis. *Hum Reprod.* 1996;11:732-6.
- Cohlen BJ, te Velde ER, van Kooij RJ, et al. Controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination for treating male subfertility: a controlled study. *Hum Reprod.* 1998;13:1553-8.
- Dickey RP, Taylor SN, Lu PY, et al. Effect of diagnosis, age, sperm quality, and number of preovulatory follicles on the outcome of multiple cycles of clomiphene citrate-intrauterine insemination. *Fertil Steril.* 2002;78:1088-95.
- Francavilla F, Romano R, Santucci R, et al. Effect of sperm morphology and motile sperm count on outcome of intrauterine insemination in oligozoospermia and/or asthenozoospermia. *Fertil Steril.* 1990;53:892-7.
- Freiesleben NL, Lossl K, Bogstad J, et al. Predictors of ovarian response in intrauterine insemination patients and development of a dosage nomogram. *Reprod Biomed Online.* 2008;17:632-41.
- Hauser R, Yogev L, Botchan A, et al. Intrauterine insemination in male factor subfertility: significance of sperm motility and morphology assessed by strict criteria. *Andrologia.* 2001;33:13-7.
- Iberico G, Vioque J, Ariza N, et al. Analysis of factors influencing pregnancy rates in homologous intrauterine insemination. *Fertil Steril.* 2004;81:1308-13.
- Karabinus DS and Gelety TJ. The impact of sperm morphology evaluated by strict criteria on intrauterine insemination success. *Fertil Steril.* 1997;67:536-41.
- Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, et al. New method of evaluating sperm morphology with predictive value for human in vitro fertilization. *Urology.* 1987;30:248-51.
- Matorras R, Corcostegui B, Perez C, et al. Sperm morphology analysis (strict criteria) in male infertility is not a prognostic factor in intrauterine insemination with husband's sperm. *Fertil Steril.* 1995;63:608-11.
- Merviel P, Heraud MH, Grenier N, et al. Predictive factors for pregnancy after intrauterine insemination (IUI): an analysis of 1038 cycles and a review of the literature. *Fertil Steril.* 2008;93:79-88.
- Nuojua-Huttunen S, Gissler M, Martikainen H, et al. Obstetric and perinatal outcome of pregnancies after intrauterine insemination. *Hum Reprod.* 1999;14:2110-5.
- Ombelet W, Deblaere K, Bosmans E, et al. Semen quality and intrauterine insemination. *Reprod Biomed Online.* 2003;7:485-92.
- Park SJ, Alvarez JR, Weiss G, et al. Ovulatory status and follicular response predict success of clomiphene citrate-intrauterine insemination. *Fertil Steril.* 2007;87:1102-7.
- Steures P, van der Steeg JW, Mol BW, et al. Prediction of an ongoing pregnancy after intrauterine insemination. *Fertil Steril.* 2004;82:45-51.
- Stone BA, Vargyas JM, Ringler GE, et al. Determinants of the outcome of intrauterine insemination: analysis of outcomes of 9963 consecutive cycles. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;180:1522-34.
- Tomlinson MJ, Amisshah-Arthur JB, Thompson KA, et al. Prognostic indicators for intrauterine insemination (IUI): statistical model for IUI success. *Hum Reprod.* 1996;11:1892-6.
- van Rumste MM, den Hartog JE, Dumoulin JC, et al. Is controlled ovarian stimulation in intrauterine insemination an acceptable therapy in couples with unexplained non-conception in the perspective of multiple pregnancies? *Hum Reprod.* 2006;21:701-4.
- Wainer R, Albert M, Dorion A, et al. Influence of the number of motile spermatozoa inseminated and of their morphology on the success of intrauterine insemination. *Hum Reprod.* 2004;19:2060-5.
- WHO (1999). World Health Organization Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction, Cambridge University Press, Cambridge.
- WHO (2010). World health organization laboratory manual for the examination and processing of human semen, Cambridge University Press, Cambridge.

# El régimen legal de la reproducción asistida en España<sup>1\*</sup>

## O regime legal da reprodução assistida na Espanha

### *ART legal procedures in Spain*

Pilar Nicolás Jiménez

Investigadora Postdoctoral de la Universidad de País Vasco. Cátedra Interuniversitaria de Derecho y Genoma Humano, Interuniversity Chair in Law and the Human Genome, Universidad de Deusto, Universidad del País Vasco.

#### RESUMEN

España fue uno de los primeros países que reguló la utilización de las Técnicas de Reproducción Asistida, en la década de los ochenta. Desde entonces el recurso a estas técnicas ha aumentado por parte de usuarios nacionales y también en un porcentaje muy importante de extranjeros, lo cual se debe precisamente a las posibilidades que ofrece nuestro marco normativo. La legislación ha evolucionado hacia un régimen algo más abierto pero con más controles en su aplicación.

**Palabras-clave:** técnicas de reproducción asistida, genoma humano, ley

#### RESUMO

A Espanha foi dos primeiros países a regular a utilização das Técnicas de Reprodução Assistida, na década de oitenta. Desde então a busca destas técnicas aumentou, tanto por parte de usuários nacionais, assim como porcentagem importante de estrangeiros, precisamente pelas possibilidades de seu marco normativo. A legislação evoluiu para um regime um pouco mais aberto, porém com mais controles na aplicação.

**Palavras-chave:** técnicas de reprodução assistida, genoma humano, lei

#### ABSTRACT

Spain has been one of the first countries that regulated the use of assisted reproductive techniques, in the in the eighties. Since then, the use of these techniques has increased by national but also, in a very high percentage, by foreign users. This is precisely due to the potential of our regulatory framework. The legislation has evolved towards a more open system, but with more control in its application.

**Key words:** assisted reproductive techniques, human genome, law.

#### INTRODUCCIÓN<sup>2</sup>

Desde que a finales de los años setenta se comenzó a extender la utilización de las técnicas de reproducción humana asistida (TRA), su aplicación ha experimentado un aumento espectacular en España. En el año 2008, según la Sociedad Española de Fertilidad, se llevaron a cabo 61.540 ciclos por distintos procedimientos: inseminación artificial, fecundación in vitro, inyección intracitoplásmica de espermatozoides y transferencia intratubárica de gametos. En un porcentaje muy elevado de estos tratamientos se recurrió a gametos masculinos o femeninos donados (SEF, 2010).

El aumento de la demanda de TRA ha situado a España como tercer país de Europa con más nacimientos por

TRA, con el 50 por ciento de toda la donación de óvulos y el 35 por ciento de todos los diagnósticos genéticos preimplantacionales. Entre las causas que más han incidido en estas estadísticas destaca la recepción de usuarios extranjeros (el treinta por ciento de los tratamientos) debido al marco legal vigente, más flexible que el de otros países cercanos. Por otra parte, el aumento de la infertilidad en ciudadanos españoles ha supuesto una saturación de los servicios sanitarios públicos (Defensor del Pueblo Andaluz, 2009).

Como consecuencia, el sector privado ha encontrado un importante nicho de oportunidades y se ha constituido con diferencia en el principal suministrador de los servicios de reproducción asistida. De hecho, el 20 por ciento de los tratamientos se llevan a cabo en centros públicos frente al 80 por ciento que se prestan en establecimientos en privados.

En fin, las implicaciones de la utilización de las TRA son de muy diferente cariz, y a las más evidentes, personales y familiares, se unen otras, económicas y relativas a políticas sanitarias. El marco normativo que se articula en cada país incide de manera trascendental en todas ellas.

#### Hitos normativos

Como se ha dicho, las TRA comenzaron a implantarse en los años setenta, y su extensión fue vertiginosa en España. En 1988, ante el aumento de esta prestación y la constatación de sus importantes implicaciones éticas y jurídicas, se publicó la Ley 35/1988, de 22 de diciembre, sobre Técnicas de Reproducción Asistida. El legislador español se situó entre los primeros de Europa en aprobar una ley sobre esta materia (Boletín Oficial del Estado, 1988).

La Ley contempló todos los aspectos relevantes de la utilización de estas técnicas, tales como los requisitos de las usuarias, el sistema de donación de gametos y embriones, las implicaciones en las relaciones de filiación, la crioconservación del material reproductor, el diagnóstico y la terapia embrionaria, la investigación con embriones, los requisitos de los centros y profesionales, las infracciones y sanciones, y se creó la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida.

\* Este trabajo se ha realizado gracias al apoyo del Departamento de Educación, Universidades e Investigación del Gobierno Vasco (Ayudas a grupos de investigación del sistema universitario vasco, Referencia: IT-360-07).

1. Los datos estadísticos se han recogido de los informes publicados por la Sociedad Española de Fertilidad en abril del año 2010: "Registro de Inseminaciones (IAC-IAD) de la SEF. Año 2008. Informe estadístico final" y "Registro FIV-ICSI de la Sociedad Española de Fertilidad. Año 2008. Informe estadístico final". <http://www.registrosef.com/#>

La promulgación de la Ley fue precedida de un intenso y controvertido debate parlamentario y se aprobó en el Congreso de los Diputados por 150 votos a favor frente a 96 en contra (de un total de 394 diputados).

En 1989 la Ley fue recurrida ante el Tribunal Constitucional Español por Diputados del Grupo Parlamentario Popular. En síntesis, los motivos en que fundamentaron el recurso fueron los tres siguientes: primero, el ataque directo a la esencia de la institución familiar derivado de las consecuencias para la filiación y de la posibilidad de que una mujer sola fuera usuaria de las TRA; segundo, la vulneración de la protección a la vida humana por el tratamiento previsto para los embriones; tercero, el carecer de carácter de ley orgánica cuando, a juicio de los recurrentes, afectaba al desarrollo de derechos fundamentales y contenía preceptos de carácter penal. Diez años más tarde, el Tribunal Constitucional Español dictó sentencia en la que desestimó las alegaciones en su parte más sustancial, al entender que la protección constitucional a la familia no se refería a un modelo concreto; que los embriones estaban suficientemente protegidos en función de las exigencias constitucionales; y que no desarrollaba el contenido esencial de derechos fundamentales (Sentencia del Tribunal Constitucional Español 116/1999, de 17 de junio).

Entre tanto y hasta el año 2003, se publicaron diferentes normas en desarrollo de la Ley<sup>2</sup>, que sufrió una importante modificación. En aquel año se trató de dar una solución a la situación de incertidumbre provocada por el hecho de que existieran miles de embriones sobrantes de las TRA sin que se hubiese articulado una solución adecuada (ley 45/2003, de 21 de noviembre, por la que se modifica la Ley 35/1988, de 22 de noviembre, sobre Técnicas de Reproducción Asistida).

La Ley, tras la modificación, se mantuvo en vigor tres años más y finalmente fue derogada por la Ley 14/2006, de 6 de mayo sobre Técnicas de Reproducción Humana Asistida, actualmente vigente (Lacadena, 2006).

Esta nueva Ley, no obstante, ya ha sido también modificada en el año 2007. Por una parte, en relación con la posibilidad de que la mujer casada con otra mujer que se someta a TRA pueda asumir la maternidad de los hijos que nazcan por este procedimiento. Por otra parte, la Ley 14/2007, de Investigación Biomédica, incide en el marco regulador de la investigación con gametos y embriones. Además, se debe señalar que el marco normativo que se ha expuesto brevemente ha continuado y continúa completándose en España, desde el mismo año 2006 (con la publicación de normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos; y con la modificación de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida) y hasta este 2010, en el que se ha publicado el Real Decreto 42/2010, de 15 de enero, por el que se regula la Comisión Nacional de Reproducción Humana asistida.

### El objeto de la regulación

Tal como dispone su artículo primero, la Ley tiene por objeto:

- a) Regular la aplicación de las técnicas de reproducción humana asistida acreditadas científicamente y clínicamente indicadas.
- b) Regular la aplicación de las técnicas de reproducción humana asistida en la prevención y tratamiento de enfermedades de origen genético, siempre que existan las garantías

diagnósticas y terapéuticas suficientes y sean debidamente autorizadas en los términos previstos en esta Ley.

c) La regulación de los supuestos y requisitos de utilización de gametos y preembriones humanos crioconservados.

Como señala su exposición de motivos, la Ley 14/2006, se adopta para actualizar el régimen de utilización de las TRA, como servicio común de la atención sanitaria especializada en España.

En efecto, esta cartera de servicios incluye la reproducción humana asistida como procedimiento diagnóstico o terapéutico "cuando haya un diagnóstico de esterilidad o una indicación clínica establecida, de acuerdo con los programas de cada servicio de salud: inseminación artificial; fecundación in vitro e inyección intracitoplasmática de espermatozoides, con gametos propios o de donante y con transferencia de embriones; transferencia intratubárica de gametos" (Real Decreto 1030/2006, de 15 de septiembre, por el que se establece la cartera de servicios comunes del Sistema Nacional de Salud y el procedimiento para su actualización, Apartado 3.8 del punto 5 del anexo III).

La nueva Ley modifica el sistema de lista cerrada de procedimientos médicos aplicables, que siguió la derogada 35/1988, para preferir la opción de incluir en un anexo una enumeración abierta, con la posibilidad de que la autoridad sanitaria pueda autorizar otras previo informe favorable de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida; y de que el Gobierno actualice dicha lista cuando se constate la evidencia científica y clínica de otras técnicas.

Estos procedimientos se aplicarán, en primer lugar, como medio para paliar los efectos de la esterilidad, pero también, según reconoce la Ley, como método de prevención y tratamiento de enfermedades de origen genético.

Se regula, además, la utilización de gametos y preembriones crioconservados y, por lo que se refiere a la donación, este régimen se extiende también a otros contextos distintos al de la reproducción humana, ya que se aplica a la vez a la donación y utilización de este material con fines de investigación biomédica aunque según sea el fin de la investigación, puedan concurrir otros requisitos adicionales (Título V de la Ley 14/2007, de Investigación Biomédica).

Los usuarios y los centros

**La mujer que desee someterse a TRA debe ser mayor de edad y gozar de plena capacidad de obrar. (artículo 6). Debe prestar su consentimiento escrito de manera libre, consciente y expresa.** El consentimiento debe estar precedido de información relativa a las implicaciones de la utilización de las TRA, resultados, riesgos y consideraciones jurídicas y también económicas. La práctica de estas técnicas sin consentimiento de la mujer está tipificada como delito en el Código Penal (artículo 161.1). Este consentimiento es revocable siempre que se produzca antes de la transferencia embrionaria (artículo 3.5 y 11.6).

En caso de que la mujer estuviera casada, el artículo 6 prevé la necesidad de consentimiento del marido, en las mismas condiciones. Así, parece que debe entenderse también la posibilidad de su revocación en cualquier momento antes de que los embriones hayan sido transferidos a la mujer (está previsto expresamente en el artículo 9 a efectos de filiación postmortem y de una forma más general en el 11.6). Esta opción, mayoritaria en los ordenamientos europeos, ha dado lugar a algunos conflictos, incluso judiciales, puesto que puede suponer que la mujer, ante la negativa del varón que aportó los gametos, pierda la oportunidad de tener hijos biológicos. En una conocida sentencia del Tribunal Europeo de Derechos Humanos, esta instancia afirmó que el margen de regulación de los Estados debía ser amplio en este sentido, a falta de consenso internacional (Alkorta Idiakez, 2006). Por lo que se refiere a los matrimonios de dos mujeres, la ley de 2005 de equiparación del matrimonio homosexual estableció que las disposiciones legales y reglamentarias del resto del ordenamiento jurídico que contuvieran alguna referencia al matrimonio habrían de entenderse en lo sucesivo aplicables con independencia del sexo de sus integrantes. Se ha afirmado así que "si el matrimonio está integrado por dos mujeres se requiere, además del consentimiento informado de la mujer directamente usuaria de las técnicas, el consentimiento informado de la otra mujer no usuaria, en este último caso en iguales términos que se venía haciendo hasta ahora con el marido. En definitiva, cuando se trata

2 Sobre protocolos obligatorios de estudio de los donantes y usuarios, creación y organización del Registro Nacional de Donantes de Gametos y Preembriones con fines de reproducción humana; creación de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida; requisitos para la realización de experiencias controladas, con fines reproductivos, de fecundación de ovocitos o tejido ovárico previamente congelados; requisitos y procedimientos para solicitar el desarrollo de proyectos de investigación con células troncales obtenidas de preembriones sobrantes; y normas de funcionamiento del Registro Nacional de Donantes de Gametos y Preembriones

de parejas de dos mujeres es obligado el consentimiento del otro cónyuge femenino, aunque no sea usuario de las técnicas, y su prestación origina que la filiación del futuro hijo pueda ser matrimonial” (Berrocal Lanzarot, 2007; Sánchez-Caro & Abellán, 2009). Por otra parte, el artículo 3 establece las condiciones personales para la aplicación de las técnicas, que se refieren al estado de salud de la mujer y a los riesgos que suponga para ella el sometimiento al tratamiento: “Las técnicas de reproducción asistida se realizarán solamente cuando haya posibilidades razonables de éxito, no supongan riesgo grave para la salud, física o psíquica, de la mujer o la posible descendencia”. Con este criterio, sólo está autorizada la transferencia de un máximo de tres preembriones en cada ciclo reproductivo. No obstante, se prevé la aplicación de las técnicas a una edad “clínicamente inadecuada” (lo que podría incluso parecer contrario a la *lex artis*) caso en que la mujer será informada específicamente de los posibles riesgos de esta circunstancia concreta le pueda acarrear a ella o a la descendencia.

El Tribunal Superior de Justicia del País Vasco dictaminó hace pocos años que la edad de la mujer no era por sí sola un criterio según el cual se pudiera denegar el acceso a las TRA, a pesar de las “guías informativas” que pudieran existir en los servicios correspondientes. En su decisión de 15 de abril de 2008 reconoció el derecho de la paciente, de 41 años en el momento de los hechos, a la realización de un tratamiento de esterilidad mediante la técnica de fecundación *in vitro* en un centro sanitario público, al considerar que no se le podía denegar “por razón de la edad”<sup>3</sup>.

Se establece además que “la mujer podrá ser usuaria o receptora de las técnicas reguladas en esta Ley con independencia de su estado civil y orientación sexual”. La alusión a la orientación sexual, podría plantear dudas sobre su coherencia con la política sanitaria según la cual las TRA se concibieron como prestación para paliar la esterilidad o para evitar la transmisión de enfermedades, tal como viene recogido tanto en el artículo 1 como en el Real Decreto **por el que se establece la cartera de servicios del Sistema Nacional de Salud**, citado. O bien podría llevar a interpretaciones sobre su alcance, en el sentido de permitir el tratamiento, pero no necesariamente exigir su inclusión obligatoria como servicio sanitario público, igual que ocurre con otras prestaciones (La cirugía transexual, por ejemplo, es una práctica lícita, pero no cubierta por los servicios sanitarios públicos como prestación básica, sino que en cada Comunidad Autónoma se toma la decisión sobre su inclusión o no en dicha cartera).

En cuanto a los donantes, como indica el artículo 5, establecen su vínculo jurídico con el centro, que será el encargado de elegirlos en cada caso procurando su similitud fenotípica e inmunológica con la mujer receptora (si bien se debe interpretar que las características fenotípicas sí se podrán adaptar a los deseos de la mujer que podría preferir, por ejemplo, una similitud a la de quien va a asumir la filiación paterna).

El contrato de donación es gratuito (aunque se podrá recibir una compensación económica por las molestias y gastos laborales y de desplazamiento) y confidencial. Sólo excepcionalmente, y cuando sea necesario para salvaguardar la salud del hijo, podrá revelarse la identidad de los donantes, lo que se hará con carácter restrictivo, y sólo a las personas que de forma indispensable deban conocerla para lograr el fin perseguido.

Los donantes deben someterse a exámenes de salud para comprobar que no padecen enfermedades genéticas, hereditarias o infecciosas transmisibles a la descendencia, y no se podrá generar más de seis hijos por donante. A estos efectos será obligatoria la consulta al Registro Nacional de Donantes, cuando se constituya, donde constarán estos datos.

La donación podrá revocarse cuando el donante precise para sí los gametos donados.

Por último las TRA sólo podrán desarrollarse en centros específicamente autorizados (artículo 17) y por equipos especialmente cualificados e interdisciplinares, de cuyas actuaciones será responsable el director del centro o servicio (artículo 18). Los centros se someterán a las auditorías sanitarias en los periodos que establezcan las Comunidades Autónomas (artículo 19)

#### Filiación

Las relaciones de filiación de los hijos nacidos por reproducción asistida están basadas en el principio de voluntarie-

dad de quienes deciden asumirlas, y representan algunas modificaciones en las reglas generales, según las cuales, las presunciones y “la verdad biológica” son los criterios principales para el establecimiento de estos vínculos.

En cuanto a la filiación matrimonial, según este régimen singular, sólo con consentimiento del marido podrá la mujer casada someterse a un proceso de reproducción asistida, y la filiación del hijo así nacido no será impugnabile aun cuando el marido no hubiera aportado su material reproductor. Si, no obstante esta limitación, naciera un hijo fruto de reproducción asistida sin consentimiento del marido, se deberán aplicar las reglas generales aun cuando el marido hubiera aportado su material reproductor (piénsese, por ejemplo, que estuviera conservado tras un consentimiento inicial que se revocara posteriormente): presunciones de filiación matrimonial, e impugnabilidad de la filiación. El principio de voluntariedad prevalece pues frente al de la verdad biológica.

No ocurre lo mismo si el cónyuge de la mujer es otra mujer. Igual que en las reglas generales, las relativas a la filiación matrimonial en la Ley 14/2006 se refieren al matrimonio entre personas de distinto sexo. En efecto, en el caso de matrimonio formado por dos mujeres no se exige el consentimiento del cónyuge ni, en principio, se producen efectos sobre la filiación para la mujer que no se vaya a someter a TRA, salvo que manifieste este deseo ante el encargado del Registro Civil del domicilio conyugal. Si la mujer no estuviera casada, puede acudir al tratamiento con una pareja masculina que asuma efectos en relación con la filiación a través del consentimiento al tratamiento. Este consentimiento se considera escrito indubitado a los efectos previstos en el artículo 49 de la Ley del Registro Civil. Queda a salvo la reclamación judicial de paternidad.

Finalmente, en ningún caso, la inscripción en el Registro Civil reflejará datos de los que se pueda inferir el carácter de la generación.

En cuanto a la fecundación postmortem y a sus efectos, se establecen las siguientes reglas: si el material reproductor del marido o del varón que prestó su consentimiento se encuentra en el útero de la mujer (es decir si los gametos se han transferido por inseminación artificial o se ha transferido el embrión fecundado) en el momento del fallecimiento, se determinará legalmente la filiación postmortem.

Si no fuera así (el semen o los embriones están criopreservados y todavía no se han transferido), podrían utilizarse tras el fallecimiento pero, en principio, sin efectos para la filiación (Berrocal Lanzarot, 2009). No obstante, en caso de que el marido o el varón no casado hubiera prestado su consentimiento al proceso de reproducción asistida, y si “su material” reproductor se utiliza en los 12 meses siguientes a su fallecimiento, la generación producirá los efectos legales que se derivan de la filiación. Este consentimiento se presume cuando el cónyuge, o varón no casado, superviviente, hubiera estado sometido a un proceso de reproducción asistida ya iniciado para la transferencia de preembriones constituidos con anterioridad al fallecimiento del marido.

No se incluye la posibilidad de establecer vínculos de filiación postmortem cuando no se hubieran constituido los preembriones al tiempo del fallecimiento, si es que se fuera a utilizar semen de donante, incluso en el caso de que el marido o varón hubiera consentido expresamente al proceso.

Por otra parte, la filiación materna queda determinada por el parto, y no se reconoce validez al contrato de gestación por sustitución, con o sin precio (artículo 10), si bien se ha aceptado la posibilidad de inscribir en el Registro Civil Español a los nacidos en el extranjero a partir de este contrato (DE BARRÓN ARCHICHES, 2009).

#### El diagnóstico perimplantacional

Como se dijo, las TRA se regulan en España como herramienta para prevenir y tratar enfermedades de origen genético. En este sentido, ha advertido Daniel Soutullo (2010) que la nueva Ley representa un importante cambio respecto a la regulación anterior del diagnóstico preimplantatorio

3 <http://www.poderjudicial.es/search/doAction?action=contentpdf&databasematch=AN&reference=24721&links=in%20vitro&optimize=20080925>

puesto que en principio queda más limitado. En efecto, la Ley de 1988 se refería al diagnóstico de enfermedades "hereditarias", mientras que la vigente añade que sean "graves, de aparición precoz y no susceptibles de tratamiento curativo posnatal"; sin embargo, al abrir nuevas posibilidades, el régimen es más amplio aunque queda sometido a mayor control en su aplicación.

Así, se prevén expresamente tres posibilidades:

Primera, la detección de enfermedades con objeto de transferir únicamente los embriones no afectados. Se refiere la Ley a enfermedades de carácter hereditario, grave, de aparición precoz y no susceptibles de tratamiento curativo postnatal con arreglo a los conocimientos científicos actuales.

Segunda, la detección "de otras alteraciones que puedan comprometer la viabilidad del embrión". En estos casos, el profesional que detectara la alteración cometería una infracción muy grave si transfiriese el embrión a la mujer: el artículo 26.2.c 8º. prevé como infracción muy grave "la transferencia a la mujer receptora de gametos o preembriones sin las garantías biológicas de viabilidad exigibles". No se detalla qué garantías biológicas representan la viabilidad del embrión, ni se establece el alcance del término viabilidad; es decir, no se aclara si la viabilidad se refiere a la capacidad de desarrollo hasta el nacimiento, o a un desarrollo saludable sin enfermedades. En el caso de una interpretación restrictiva del término, referida a la primera de las acepciones, sería lícita la transferencia de embriones con alguna enfermedad detectada según la primera indicación prevista (enfermedad hereditaria grave, etc.), mientras que en el segundo sentido, esta transferencia se entendería también abarcada por la sanción del artículo 26.2.c 8º. Sin embargo, se debe tener en cuenta que se ha eliminado la previsión de la antigua Ley, según la cual el fin de la detección de enfermedades hereditarias era "tratarlas, si ello es posible, o de *desaconsejar su transferencia para procrear*" (artículo 12). Parece, por consiguiente, que la nueva Ley, al eliminar este criterio, opta por dar un mayor margen de discrecionalidad a la hora de valorar la oportunidad de transferir embriones, incluso con ciertas patologías, y cuando no esté comprometida su viabilidad.

En cualquier caso, como se ha afirmado, el diagnóstico preimplantatorio tal como se regula en España, es una herramienta a disposición de los usuarios para ejercer el llamado derecho a la libertad reproductiva en su faceta de paternidad responsable, para evitar problemas graves o para mejorar la salud de los hijos; existen limitaciones a la capacidad de decisión sobre la reproducción, justificadas por la intervención de un tercero en el proceso, que lo extrae del ámbito estrictamente privado o íntimo. Así, no cabría la selección positiva de características patológicas. En este sentido, otras finalidades, como pudieran ser la selección de caracteres no patológicos estarían limitadas toda vez que dicha libertad pudiera colisionar con otros intereses, como la protección de las generaciones futuras. Este argumento podría ser traerse a colación también en el caso de tener que tomar una decisión sobre la transferencia de un embrión con alguna patología (Abellán, 2006). La tercera indicación es una previsión amplia que abarca cualquier otra finalidad no recogida en las dos primeras, incluso abierta a beneficios para terceros. Cabría englobar aquí la detección de alteraciones que no afectarían al desarrollo embrionario, que no fueran hereditarias ni graves ni de aparición precoz, o que fueran susceptibles de tratamiento, o que representarían susceptibilidades y no enfermedades (Cirión, 2010). Por otra parte, se prevé también la posibilidad de selección de embriones con criterios de histocompatibilidad con el fin de que tras el nacimiento sean fuente de células para trasplante.

En caso de que se pretenda un diagnóstico preimplantatorio bajo esta indicación abierta, es precisa una autorización expresa de la autoridad competente previo informe favorable de la Comisión Nacional de Reproducción Humana asistida. En marzo del año 2009 se habían aprobado en España 94 casos de diagnóstico genético

preimplantacional con informe favorable de la Comisión Nacional de Reproducción Asistida relacionados con enfermedades raras, como Síndrome de Alport, distrofia escápulo-humeral, síndrome de gamaglobulinemia ligado al cromosoma X, beta-talasemia, neoplasia endocrina múltiple, déficit de piruvato quinasa, o adrenoleucodistrofia. También se han aprobado casos para la detección de la mutación BRCA1, relacionada la predisposición al cáncer de mama hereditario, o del gen Gen MEN-2ª, relacionado con el cáncer de tiroides<sup>4</sup>.

No podría autorizarse, por estar expresamente prohibida, la selección de sexo por motivos no terapéuticos (el artículo 26.2.c, describe esta conducta como infracción muy grave). Fuera de este supuesto no existen otras limitaciones para la autorización de esta técnica por parte de las autoridades competentes, a salvo de entender por interpretación de algunos preceptos la prohibición de selección de caracteres no patológicos<sup>5</sup>.

### Los embriones sobrantes

Uno de los asuntos que más polémica suscita en relación con la utilización de TRA es el destino que se les depara a los preembriones que se generan en este proceso pero que finalmente no son transferidos a la mujer.

Precisamente, como se advirtió, la reforma que en el año 2003 afectó a la Ley entonces vigente se refería fundamentalmente a este asunto. Se diseñó entonces un doble régimen que distinguía dos situaciones según los embriones se hubieran generado antes o después de su entrada en vigor. Para los primeros, las posibilidades incluían, entre otras, la investigación o la descongelación; mientras que para los segundos se limitaban a la reproducción humana. La nueva ley de 2006 termina con esta diferencia y establece las siguientes reglas para los preembriones, semen, ovocitos o tejido ovárico crioconservados: en principio, los preembriones no transferidos, ovocitos o tejido ovárico, podrán crioconservarse mientras la usuaria reúna los requisitos clínicos para someterse a un proceso de reproducción asistida. A partir de ese momento la Ley prevé el cese de su conservación. Hasta entonces es posible optar por tres destinos, parece que por orden preferente pero, en todo caso, según la voluntad de la mujer que los generó y, en su caso también de su marido o pareja progeneradora:

Primero, los preembriones, semen, óvulos o tejido ovárico, pueden ser "utilizados por la propia mujer o por su cónyuge". Esta referencia a la utilización "por su cónyuge" podría entenderse en el sentido de que cuando una mujer esté casada con otra mujer, una de ellas puede generar los óvulos para que sean fecundados, y su cónyuge gesté al futuro hijo, sin seguir las reglas de la donación (anonimato, elección del centro, etc.). A efectos de filiación, la mujer que queda embarazada y da a luz será la madre, mientras que la que proporciona los óvulos podrá también serlo si así lo manifiesta según lo dispuesto en el artículo 7.

Segundo, pueden ser donados a otra mujer o pareja, con fines reproductivos.

Tercero, pueden ser donados con fines de investigación. Finalmente, si no se ha optado por ninguna de estas tres posibilidades, y sólo cuando finalice el plazo máximo de conservación fijado (cuando la usuaria ya no reúna los requisitos clínicos para someterse a un proceso de repro-

4 <http://www.msps.es/gabinetePrensa/notaPrensa/desarrolloNotaPrensa.jsp?id=1463>

5 Por una parte, se debe tener en cuenta que las técnicas terapéuticas sólo se autorizarán cuando no se modifiquen los caracteres hereditarios no patológicos ni se busquen la selección de individuos o de la raza (artículo 13) y que por analogía, esta condición se debe trasladar a la selección de embriones. Cabría también una interpretación del artículo 160.3 del Código Penal según la cual esta conducta estuviera abarcada en el tipo del artículo 160.3: "Con la misma pena se castigará la creación de seres humanos idénticos por clonación u otros procedimientos dirigidos a la selección de la raza".

ducción asistida), se puede decidir el cese de su conservación, es decir su destrucción.

A efectos de garantizar el respeto a la voluntad de la mujer y, en su caso, del marido o pareja progenitora, la Ley establece que "cada dos años, como mínimo, se solicitará la renovación o modificación del consentimiento firmado previamente". Cuando, tras intentar obtener respuesta a la renovación en dos ocasiones consecutivas, esto no se lograra, los preembriones quedarán a disposición de los centros, que decidirán el fin al que se destinan (artículo 11.6).

### Infracciones y sanciones

La Ley establece un régimen de responsabilidad en el marco de la aplicación de las TRA, que será efectivo cuando se produzca un daño derivado de una acción u omisión (Pinto Andrade, 2009).

La responsabilidad se sustancia de forma diferente según el tratamiento se haya llevado a cabo en la sanidad pública o privada. En el primer caso, corresponderá a la Administración responder ante el paciente por los daños que se produzcan. En ambos casos es preciso acreditar un daño que haya sido causado por una determinada acción u omisión, pero si se trata de responsabilidad administrativa, la exigencia de culpa (negligencia por parte del profesional) es menos evidente. Pero lo cierto, como se dijo, es que estos tratamientos se desarrollan en su mayoría en centros privados y en estos casos son los profesionales y el centro de forma solidaria, quienes responden por los daños.

La Ley establece en general que los equipos biomédicos y la dirección de los centros responderán cuando se lesionen intereses de los donantes o usuarios, o se transmitan enfermedades evitables, debido a: la violación del secreto de la identidad de los donantes; o la mala práctica con las técnicas de reproducción asistida o los materiales biológicos correspondientes; o la omisión de información o de los estudios establecidos (artículo 18.2). Esta responsabilidad civil generará la obligación de resarcimiento que establezcan en su caso los tribunales como indemnización.

Por otra parte, existe una lista de infracciones<sup>6</sup> que llevan aparejada una responsabilidad administrativa y sanciones de multa o clausura de los centros<sup>7</sup>, según instrucción y resolución de los órganos administrativos competentes de las comunidades autónomas. Son conductas que fundamentalmente se refieren a los profesionales y centros, pero que en algún caso, también afectan a los donantes (por ejemplo es una infracción el suministro de datos falsos en la identidad o la referencia a otras donaciones previas).

6 Según el artículo 26 es infracción leve el incumplimiento de cualquier obligación o la transgresión de cualquier prohibición establecida en esta Ley, siempre que no se encuentre expresamente tipificada como infracción grave o muy grave. Algunas infracciones graves: omisión de la información o los estudios previos; falta de realización de la historia clínica; la ruptura de las condiciones de confidencialidad de los datos de los donantes; retribución económica de la donación; la publicidad que incentive la donación mediante la oferta de beneficios económicos; generación de un número de hijos por donante superior al legalmente establecido; generación de un número de preembriones en cada ciclo reproductivo que supere el necesario; la transferencia de más de tres preembriones en cada ciclo reproductivo; la estimulación ovárica que pueda resultar lesivas para la mujer. Algunas infracciones muy graves: la práctica de reproducción asistida en centros o con una técnica no autorizada; la transferencia en un mismo acto de preembriones originados con ovocitos de distintas mujeres; la transferencia de gametos o preembriones sin las garantías biológicas de viabilidad exigibles; la selección del sexo o la manipulación genética con fines no terapéuticos o terapéuticos no autorizados.

Finalmente, además, ciertas conductas en el desarrollo de TRA pueden ser constitutivas de delitos tipificados en el Código Penal, entre los que destacan: fecundación de óvulos humanos con cualquier fin distinto a la procreación humana (artículo 160.2); creación de seres humanos idénticos por clonación u otros procedimientos dirigidos a la selección de la raza (artículo 160.3); reproducción asistida sin consentimiento de la mujer (artículo 161); ruptura del deber de secreto (artículo 199); o lesiones (artículos 147 y siguientes).

### Endereço para correspondência:

Avenida Universidades, 24, 48007, Bilbao, España  
Tlf. (34) 944 139 287  
Fax. (34) 944 455 713  
www.catedraderechoygenoma.es

### Referencias Bibliográficas

1. Abellán F. Diagnóstico genético embrionario y libertad reproductiva en la procreación asistida. *Revista de Derecho y Genoma Humano*, (25): 2006.
2. Abellán F, Sánchez-Caro J. *Bioética y ley en reproducción humana asistida. Manual de casos clínicos*. Comares: Granada, 2009.
3. Alkorta Idiakez I. El caso Evans y el derecho a no ser forzado a procrear. *Revista de Derecho y Genoma Humano*, 2006; (24) 129-53.
4. Berrocal Lanzarot AI. Análisis de la nueva Ley 14/2006, de 26 de mayo sobre técnicas de reproducción humana asistida. Una primera aproximación a su contenido. *Revista de la Escuela de Medicina Legal*. 2007; 54.
5. Boletín Oficial del Estado núm. 282, de 24 de noviembre de 1988.
6. <http://www.boe.es/boe/dias/1988/11/24/pdfs/A33373-33378.pdf>
7. Cirión AE. La polémica sobre el uso del diagnóstico preimplantacional. En *Comentarios de Actualidad, Área Ética y Legal*, web Instituto Roche, 2010.
8. [http://www.institutoroche.es/Legal\\_comentarios\\_de\\_actualidad/V6.html](http://www.institutoroche.es/Legal_comentarios_de_actualidad/V6.html)
9. De Barrón Archiches P. La posibilidad de inscribir en el Registro civil español a los nacidos en el extranjero, de una madre de alquiler. *Revista de Derecho y Genoma Humano / Law and the Human Genome Review*, 2009; (31): 29-41.
10. Defensor del Pueblo Andaluz formulada en la queja 09/1337 dirigida a Consejería de Salud, Servicio Andaluz de Salud, Dirección General de Asistencia Sanitaria relativa a lista de espera en técnica de reproducción asistida. [http://www.defensor-and.es/informes\\_y\\_publicaciones/informes\\_estudios\\_y\\_resoluciones/resoluciones/contenido/resolucion\\_09\\_1337.html](http://www.defensor-and.es/informes_y_publicaciones/informes_estudios_y_resoluciones/resoluciones/contenido/resolucion_09_1337.html), em 09/06/2009.
11. Lacadena JR. La ley 14/2006 sobre Técnicas de Reproducción Humana Asistida: consideraciones científicas y éticas. *Revista de Derecho y Genoma Humano*, 2006; (24).
12. Pinto Andrade C. La responsabilidad civil medico sanitaria derivada de las técnicas de reproducción asistida. *Noticias Jurídicas*, 2009. <http://noticias.juridicas.com/>
13. [articulos/25-Derecho%20Sanitario/200910-6786874777989976543.html](http://articulos/25-Derecho%20Sanitario/200910-6786874777989976543.html)
14. Sánchez-Caro J, Abellán F. Breve análisis bioético y jurídico del consentimiento informado en reproducción humana asistida. <http://nuevo.sefertilidad.com/docs/infojuridica.pdf>, 2009.
15. SEF - Sociedad Española de Fertilidad en abril del año 2010: Registro de Inseminaciones (IAC-IAD) de la SEF. Año 2008. Informe estadístico final" y Registro FIV-ICSI de la Sociedad Española de Fertilidad. Año 2008. Informe estadístico final". <http://www.registrosef.com>.
16. Soutullo D. Selección de embriones mediante diagnóstico preimplantacional en la nueva Ley sobre técnicas de reproducción humana asistida. *Comentarios de Actualidad, Área Ética y Legal*, web Instituto Roche. 2010. [http://www.institutoroche.com/Legal\\_comentarios\\_de\\_actualidad/V75.html](http://www.institutoroche.com/Legal_comentarios_de_actualidad/V75.html)

# Doação de gametas e embriões pode ser praticada na rede privada?

## Can embryo and gametes donation be practiced in private centres?

Joaquim Roberto Costa Lopes<sup>1,2</sup>, Adriana Ávila de Bessa<sup>1</sup>, Cristina Rocha Barros<sup>1</sup>, Jean Pierre Barguil Brasileiro<sup>3</sup>, Vinícius Medina Lopes<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Cenafert – Centro de Medicina Reprodutiva, Salvador –Bahia

<sup>2</sup> Cenafert – Centro de Medicina Reprodutiva, Feira de Santana – Bahia

<sup>3</sup> Instituto Verhum – Brasília – DF

Tem sido motivo de amplos debates em congressos e de discordantes opiniões em publicações, nacionais e estrangeiras, a questão da doação de gametas e embriões. Esses debates são frutos dos conflitos médicos, éticos, legais e religiosos que envolvem o tema. Tais discórdias têm feito com que países como a Noruega, Austrália e Alemanha proibam doação de gametas em seus territórios.

Aqui no Brasil, faltam leis que regulamentem o assunto e a prática desses procedimentos tem tido como norma reguladora a Resolução nº 1.358/92 do Conselho Federal de Medicina (CFM), que estabelece duas premissas básicas: não ter caráter comercial e preservar o anonimato de doadores. O desenvolvimento tecnológico verificado nas últimas décadas, sobretudo com o advento da técnica de fertilização *in vitro* (FIV) com injeção intracitoplasmática de espermatozoide, permitiu restringirem-se os casos de doação de espermatozoides. Ainda assim, quando praticada, recorre-se a Bancos de Sêmen, próprios de clínicas ou de entidades privadas com custos variados. Contudo, dada frequência, a doação de óvulos torna-se cada vez mais relevante porque cada dia aumenta o volume de mulheres que necessitam de óvulos doados para realizarem seu projeto parental.

A técnica de doação de óvulos tem sido aplicada desde 1983 para atender a diversas indicações médicas. No entanto, com a tendência atual dos casais em retardar o advento de sua prole, muitas mulheres, ao decidirem engravidar, deparam-se com o declínio de sua capacidade fértil. Essa perda se expressa, essencialmente, por uma reserva ovariana qualitativa e quantitativamente empobrecida. Até o presente momento, a ciência tem falhado em oferecer alternativas eficazes para a mulher, nessas condições, engravidar com seus próprios óvulos.

Por outro lado, a vitrificação de óvulos, em que pese oferecer progressos alentadores após a desvitrificação dos mesmos, ainda está longe de assegurar a preservação da fertilidade, sobretudo em mulheres que desejam criopreservar seus gametas após os 35 anos, prevenindo uma gravidez futura. Com isso, crescem, nas diversas clínicas, as listas de espera de mulheres, habitualmente em faixas etárias mais avançadas, que buscam engravidar com a única alternativa eficaz que a reprodução assistida lhes oferece: FIV com óvulos doados.

Diversos modelos de doação de óvulos têm sido propostos. Entre eles, citam-se:

1. Altruista – segundo Reis et al., (2008), duas situações identificam essa modalidade: a) mulheres que, ao saberem do programa de doação de óvulos, decidem doar oócitos de forma altruista; b) pacientes alta-responderas, em preparação para FIV, que desejam doar parte dos óvulos obtidos;
2. Parental - quando uma irmã, parente ou amiga decide doar óvulos mesmo tendo que se submeter ao estímulo ovariano e coleta ovular;
3. Mercantil - quando o ato de doação é compensado por uma retribuição financeira;
4. Relacional cruzada ou anônima personalizada –

quando uma futura receptora seleciona uma doadora que oferecerá seus óvulos a outra mulher. Essa, por sua vez, já beneficiada, em contrapartida, providencia uma doadora, igualmente de modo anônimo, para a primeira mulher;

5. Compensada - personaliza a situação em que uma mulher que deseja uma ligadura tubária (ou mesmo diante de indicação cirúrgica frente a uma patologia benigna), aceita se submeter à estimulação ovariana, coleta de óvulos e doação dos mesmos, em troca da viabilização da cirurgia prevista;
6. Doação compartilhada de óvulos (DCO). Esta modalidade, amplamente utilizada no Brasil, envolve duas mulheres que não se conhecem, ambas inférteis, independente de condição socioeconômica. Uma candidata à recepção de óvulos e a outra, também com indicação de FIV, jovem e com reserva ovariana adequada ao processo e, além disso, após avaliação clínica e psicológica, disposta a doar parte de seus óvulos, se colhidos em grande número. Nesse procedimento, os custos e os óvulos obtidos (se  $\geq 8$  óvulos) são partilhados entre duas pacientes.

Em 1999, a DCO passou a ser empregada na Inglaterra após obter a aprovação da *Fertilization and Embryology Authority (HFEA)*, órgão que disciplina a prática de reprodução assistida naquele país (Blyth, 2002). Aqui no Brasil, foi reconhecida inicialmente pelo Conselho Regional de Medicina do DF em 2002 e, após essa aprovação regional, foi analisada e aceita pelo Conselho Federal de Medicina (CFM) em 2006 (CFM, 2006). Em alguns países, como Dinamarca e Israel, o único modelo de doação de óvulos permitido é aquele onde a origem dos oócitos provém de uma mulher que esteja se submetendo à FIV, porque não induz uma doadora aos riscos do procedimento sem benefício próprio (Ahuja et al., 1996).

A questão que ora se levanta abrange a doação de gametas, masculinos e femininos. Pergunta-se: existe algum modelo de doação que não fira o preceito de caráter não lucrativo ou comercial e, portanto, não torne o processo uma negociata?

### O SÊMEN DE DOADOR

Vejamos inicialmente o que acontece na maioria dos serviços que oferecem o uso de sêmen de doador. A mulher ou o casal consulta um catálogo oferecido por uma clínica, escolhe cor dos olhos, cor da pele e de cabelos, nível cultural, religião e outros pormenores do doador. O processo de preparação do casal tem início e, no momento oportuno, solicita-se ao Banco de Sêmen a amostra congelada desse doador altamente selecionado. A aquisição da amostra seminal pode ultrapassar R\$ 1.500,00, enquanto que o processo todo alcança cifras variáveis de acordo com o perfil do serviço e da técnica empregada. Pergunta-se: qual a essência básica do procedimento, senão o sêmen fornecido altruisticamente pelo doador? Quantas pessoas vão se beneficiar financeiramente com o processo? Não poderia isso ser entendido como um modo de comercialização de gametas?

## O ÓVULO DE DOADORA

O modelo de doação parental, por ferir a condição de anonimato, bem como aquele de doação mercantil, por envolver fins lucrativos, não merecem comentários, uma vez que contrariam a Resolução CFM 1358/92.

A doação altruística é pouco exequível na prática porque não é habitual mulheres se disporem a doar óvulos, espontânea e altruisticamente, quando não estão envolvidas em um tratamento de infertilidade. Por outro lado, não nos parece apropriado um médico ou seu emissário abordar uma mulher no curso do tratamento, quando ela produziu um recrutamento folicular exuberante ou colheu um número considerável de óvulos para que doe parte dos mesmos. Afinal, nesse momento ela se encontra fragilizada física e emocionalmente, podendo ser induzida a tomar uma decisão que não tomaria em condições normais. Citando Baetens, 2000: "As mulheres, por razões óbvias, desejam maximizar suas chances de gravidez usando um significativo número de seus próprios oócitos e criopreservando os embriões excedentes para uso futuro". Se aceita e não engravida, pode conviver com um sentimento de revolta atribuindo o insucesso à decisão pouco consciente. Se, por outro lado, deixa de atender à solicitação do seu médico, pode experimentar um sentimento de culpa por ter deixado de atender ao pedido de quem contribui para realizar um sonho tão especial.

Acrescente-se que exames são necessários para se compatibilizar a doação. Entre eles, aqueles preconizados pelo Instituto Valenciano de Infertilidade que incluem: determinação do cariótipo da doadora, bem como pesquisa de mutação no gene da fibrose cística e rastreamento da síndrome do cromossomo X frágil, que demandam tempo (Reis et al., 2008).

Outro aspecto a ser considerado é que, ao se utilizar os óvulos "excedentes" doados altruisticamente, muitas vezes com um enorme sacrifício emocional da doadora, está se objetivando produzir embriões que serão transferidos para uma receptora. Obviamente, que não serão cobrados da receptora os óvulos que lhes foram doados, entretanto, esse tratamento da receptora gera um lucro que é fruto dos óvulos doados. Não poderia isto ser entendido como um ato com característica comercial, se não lucrativo?

A modalidade relacional cruzada, independente de ser difícil de ser viabilizada na prática, expõe mulheres sadias, não portadoras de infertilidade, aos riscos inerentes ao procedimento como hiperestímulo ovariano, entre outros.

Na doação compensada, igualmente a mulher desnecessariamente corre os riscos do estímulo ovariano e coleta ovular sem que obtenha algum benefício oriundo deste procedimento. Deve-se considerar que muitas mulheres que aceitam esta alternativa, inscrevem-se nos serviços para conseguir realizar uma ligadura tubária, direito este garantido pelo art. 125 da Constituição Brasileira que preconiza o planejamento familiar como dever do Estado e direito do cidadão.

A doação compartilhada de óvulos foi reconhecida pelo CFM desde 2006, entendendo que: "*..... doação compartilhada, respeitando o anonimato, não representa comercialização de óvulos ou pré-embriões*". Esta modalidade de doação é praticada não só no Brasil, mas também em outros países. Na Inglaterra, a HFEA, ao aprovar a DCO, levou em consideração o fato de que a mesma tem vantagem sobre a doação direta porque evita que a doadora use drogas não apenas para doar óvulos, como, também, para o seu próprio tratamento. Independente disto, o esquema beneficia ambas as mulheres (Blyth, 2002; Lopes et al., 1996; Lopes et al., 2008).

Não obstante a ampla aceitação da doação compartilhada de óvulos, e mesmo com o seu reconhecimento pelo CFM no Brasil, tal alternativa ainda é motivo de controvérsias, na medida em que alguns autores veem este modelo como uma forma de "escambo" na condução do processo de doação (Ciocci et al., 2009). Já outros autores entendem ser necessário o compartilhamento dos custos para que não ocorra o locupletamento de uma das partes em detrimento da outra (Fonseca et al., 2009).

Em um trabalho realizado na Universidade São Camilo, publicado na Revista BIOETHIKOS, onde foram entrevistadas cinquenta pacientes inférteis, concluiu-se que: "Para estas mulheres, a DCO apresenta-se como uma solução mais segura e aceitável ética e moralmente em

tratamento de reprodução assistida, pois a remuneração das doadoras, nesse caso, apresenta-se como ressarcimento dos custos com o tratamento" (Fonseca et al., 2009). Vale aqui ressaltar que em todas as modalidades de doação de óvulos existe o óvulo doado, que será inseminado com o sêmen do parceiro da receptora e os embriões resultantes transferidos para o útero da mesma. Esse atendimento à receptora, que só estará acontecendo porque uma mulher doou óvulos, gratuitamente, tem uma remuneração de custo variável em cada serviço. Este fato também pode ser interpretado como ato revestido de fins comerciais ou lucrativos.

Diante do exposto, entendemos que não existe modelo de doação de gameta, quer seja masculino ou feminino, que não envolva diferentes interpretações quanto a características mercantilistas.

Assim sendo, nos parecem mais coerentes as seguintes alternativas a serem adotadas quanto à doação de gametas:

1. Proibir definitivamente a sua prática, a exemplo do que acontece na Alemanha, Austria e na Noruega, em face dos conflitos que envolvem o tema.

2. Recomendar sua prática tão somente no âmbito da rede pública onde não cabe nenhuma medida recompensatória que possa ser interpretada como transação comercial.

Obviamente que a primeira alternativa conduziria ao desalento um gigantesco universo de casais que necessita da doação de espermatozoides ou de óvulos para estabelecer sua prole. A segunda opção não mudaria em nada os resultados, vez que os escassos serviços governamentais que praticam a reprodução assistida estão restritos a poucos estados brasileiros e atendem a uma limitada demanda de casais.

No nosso entender, até que o Estado Brasileiro se disponha a criar, em número suficiente e qualidade adequada, serviços de reprodução assistida cobertos pelo SUS para atender ao casal infértil, o dilema permanecerá. Cumpre atender para a essência do que determina o Artigo 226 da Constituição Federal, no seu Parágrafo 7º - ... "o planejamento familiar é de livre decisão do casal, competindo ao Estado propiciar recursos educacionais e científicos para o exercício deste direito". Fora da rede pública, caracterizada pela gratuidade, a doação de gametas continuará sendo praticada envolta nas controvérsias que tornam a matéria a mais conflituosa no âmbito da reprodução assistida.

### Endereço para correspondência:

Joaquim Roberto Costa Lopes  
Cenafert – Centro de Medicina Reprodutiva  
Avenida Adhemar de Barros, 67 – Ondina  
Salvador – Bahia CEP: 40170-110  
Fone: 71- 3245-4009  
e-mail: joa\_lopes@terra.com.br

### Referências Bibliográficas

- Ahuja KK, Simons EG. Anonymous egg donation and dignity. Hum Reprod 1996; 11:1151-1154.
- Baetens P, Devroey P, Van Sterteghem AC et al. Counselling couples and donors for oocyte donation: the decision to use either know or anonymous oocytes. Hum Reprod 2000; 15: 476-485.
- Blyth E. Subsidized IVF: the development of egg-sharing in the UK. Hum Reprod. 2002; 17:3254-3259.
- Ciocci D, Viana RGC, Borges Junior E. Aspectos legais na utilização de doação de gametas e embriões nas técnicas de reprodução humana assistida. JBRA Assist Rep. 2009; 13 (4): 35-36.
- Conselho Federal de Medicina. Plenária de 12 de maio de 2006.
- Fonseca LL, Hossne WS, Barchifontaine CP. Doação compartilhada de óvulos: opinião de pacientes em tratamento para infertilidade. Revista BIOETHIKOS. 2009;3(2): 235-240.
- Lopes JRC, Lopes VM, Brasileiro JPB et al., Doação Compartilhada de Óvulos (DCO): Uma Alternativa Ética? J Bras Rep Assist. 2006; 10:10-16.
- Lopes VM, Lopes JRC, Pereira TR, Santos JJM et al., Egg sharing donation (ESD): an ethical and efficient model. Hum Reprod 2008; (Suppl 1)23 :i125
- Reis S, Domingo J, Bosch E, Remohí J. Donación de ovocitos. In: Remohí J et al., Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. 3ª edición; Madrid: McGraw-Hill-Interamericana; 2008.p.309-318.

# Avaliação da Reserva Ovariana em Técnicas de Reprodução Assistida

## *Assessment of ovarian reserve in Assisted Reproductive Technology*

Lucas Yugo Shiguehara Yamakami\*, Rafaela Alkimin, Carlos Roberto Izzo, Paulo Serafini, Edmund Chada Baracat

Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

São Paulo, SP, Brasil.

Centro de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

### RESUMO

A reserva ovariana é um fator determinante na fertilidade de um casal e, quando reduzida, traz conseqüências negativas às técnicas de reprodução assistida. Assim, métodos capazes de avaliá-la podem apresentar papel importante na conduta a ser tomada antes do tratamento. No entanto, o papel exato de cada um dos vários testes disponíveis atualmente é confuso e, não raramente, mais atrapalha que ajuda o médico e o casal. O objetivo desta revisão é estudar criticamente os métodos disponíveis para a avaliação da reserva ovariana e sua aplicabilidade como fator prognóstico de pacientes que serão submetidas a técnicas de reprodução assistida. Para tal, os seguintes testes foram pesquisados: dosagem na fase folicular precoce de hormônio foliculo-estimulante, estradiol, inibina B e hormônio anti-mülleriano; testes dinâmicos com citrato de clomifeno, FSH exógeno e agonista do GnRH e avaliação ultra-sonográfica dos ovários, representada pela contagem de folículos antrais e medida do volume ovariano. Concluiu-se que os testes com melhor acurácia na predição de resposta ovariana são a contagem de folículos antrais, a dosagem do hormônio anti-mülleriano e os testes dinâmicos com citrato de clomifeno e agonista do GnRH. No entanto, nenhum teste mostrou-se capaz de prever as chances de gestação após tratamento de reprodução assistida.

Palavras-chave: reserva ovariana, estimulação da ovulação, técnica de reprodução assistida.

### ABSTRACT

Ovarian reserve is an important factor for fertility in a couple and, when reduced, has negative impact on assisted reproductive technology. Therefore, methods for assessment of ovarian reserve could be used to determine the appropriate management. However, the true mean of which one of these tests is still questionable and they may be more confusing than elucidative to both physician and couple. The objective of this review is to critically study the ovarian reserve tests as a prognosis factor in patients treated with assisted reproductive technology. We studied the following tests: dosage in the early follicular phase of follicle-stimulating hormone, estradiol, inhibin B and anti-müllerian hormone; dynamic tests using clomiphene citrate, exogenous FSH and

GnRH agonist and ultra-sound evaluation (antral follicle count and ovarian volume measurement). We concluded that the more accurate tests are antral follicle count, anti-müllerian hormone dosage, clomiphene citrate challenge test and GnRH agonist stimulating test. However, there are no tests capable to predict the chance of pregnancy after assisted reproductive treatment.

**Key-words:** ovarian reserve, ovulation induction, assisted reproductive technique.

### INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, com a participação crescente da mulher em atividades sócio-econômicas, houve uma mudança clara em relação ao período da gestação. Atualmente, parte significativa das mulheres tenta adiar ao máximo a gravidez, até o limite que ela ou seu médico julgam possível. No entanto, muitas enfrentam dificuldades, mesmo frente a técnicas de reprodução assistida (TRA), decorrentes do envelhecimento ovariano (Coccia & Rizzello, 2008).

Sabe-se que a reserva ovariana reduzida é uma das principais causas de insucessos em TRA (Broekmans et al., 2006). Um método ideal de avaliação da reserva ovariana deveria ser capaz de prever a chance de gravidez, bem como contra-indicar um tratamento mais complexo em situações em que o prognóstico reprodutivo é sombrio. No entanto, muitos são os métodos atualmente disponíveis e, da mesma forma, muitas são as dúvidas que pairam sobre eles no que tange a sua acurácia (Coccia & Rizzello, 2008).

O objetivo da presente do presente artigo é revisar criteriosamente os métodos de avaliação da reserva ovariana e sua aplicabilidade como fator prognóstico em TRA.

### MÉTODOS

Foi pesquisado na base de dados Medline/Pubmed as citações bibliográficas com os termos "ovarian reserve" ou "follicular reserve" e "assisted reproductive technology", publicadas nos últimos dez anos.

Avaliação da Reserva Ovariana

Na literatura, os principais testes usados na avaliação da reserva folicular ovariana são:

- Dosagens hormonais na fase folicular precoce de hormônio folículo-estimulante (FSH), Estradiol (E2), Inibina B e hormônio anti-mülleriano (HAM).
- Testes dinâmicos: teste do citrato de clomifeno (TCC), teste com FSH exógeno (EFORT) e teste de estimulação com agonistas do GnRH (GAST).
- Avaliação ultra-sonográfica: contagem de folículos antrais (CFA) e medida do volume ovariano
- Biópsia ovariana com contagem de folículos primordiais

No intuito de permitir uma comparação adequada entre os testes e como não há valores de estabelecidos de normalidade para a maioria deles, deu-se preferência para utilização do cálculo de área sob a curva (ASC) obtidos através de regressão logística *receiver operating characteristics* (curva ROC) (Broekmans et al., 2006; Sun et al., 2008). Neste sentido, valores de ASC próximos a 1,0 indicam teste com melhor acurácia, enquanto valores próximos a 0,5 indicam testes com poder de discriminação ruim.

O uso da razão de verossimilhança (RV) também é importante. A RV representa a razão entre a chance do teste ser positivo (ou negativo) quando houver alteração real e a chance do teste ter o mesmo resultado sem que exista esta alteração. A RV indica quanto o teste aumenta ou diminui a probabilidade de determinado problema (chance pós-teste). Assim, RV igual a 1 significa que o teste não tem valor preditivo para o desfecho de interesse. Quando este valor é  $> 1$ , o teste aumenta a probabilidade do desfecho; quando é  $< 1$ , reduz esta probabilidade. Valores de  $RV > 10$  e  $< 0,1$ , para testes positivos e negativos, respectivamente, são representativos de testes com alta acurácia (Broekmans et al., 2006).

## RESULTADOS

Os resultados dos principais estudos podem ser vistos na tabela.

### FSH

A dosagem do FSH sérico no início da fase proliferativa é o teste mais realizado em reprodução humana para avaliação da reserva ovariana (Abdalla & Thum, 2004). Diversos estudos avaliaram sua acurácia na predição de sucesso em TRA (tabela). Os estudos que mostraram melhor capacidade discriminativa encontraram valor de ASC de 0,83, resultado inferior ao obtido com outros métodos como CFA e HAM.

### E2

Os estudos publicados não caracterizam o E2 como bom preditor de reserva ovariana (tabela). A ASC calculada aproximou-se de 0,50 na maioria dos estudos.

### Inibina B

Considerada inicialmente como grande marcador de reserva ovariana, a inibina B mostrou ter valor limitado na predição de sucesso de FIV. O trabalho que encontrou melhor acurácia da inibina B na predição da resposta ovariana mostrou ASC de 0,81, inferior ao obtido com outros testes.

### HAM

O HAM tem sido apontado como marcador promissor de reserva ovariana. Dentre as vantagens existentes estão o fato de poder ser realizado em qualquer fase do ciclo, ter pequena variação entre os ciclos e boa reprodutibilidade. A maioria dos trabalhos cujo desfecho foi resposta ovariana mostrou boa acurácia do teste, com  $ASC > 0,90$ . No entanto, em relação a taxa de gestação, a acurácia do HAM não foi alta, com valores de  $ASC < 0,8$ .

### TCC

O TCC consiste na administração exógena de 100mg de citrato de clomifeno por 5 dias a partir do 5º dia do ciclo menstrual. Os níveis hormonais de FSH são medidos nos dia 2 ou 3 do ciclo menstrual (níveis basais) e no décimo dia do ciclo (nível após estímulo). Níveis elevados de FSH após estímulo indicam menor reserva ovariana (Johnson et al., 2006). Os trabalhos mostraram boa acurácia do TCC em determinar resposta ovariana.

### EFORT

O EFORT é realizado através da administração de 300 UI de FSH recombinante no 3º dia do ciclo menstrual e avaliação de níveis basais de FSH, estradiol e inibina B e após 24h. Níveis mais baixos de estradiol e inibina B e mais altos de FSH indicam menor reserva folicular (Johnson et al., 2006).

Mesmo que tivesse boa acurácia, a grande desvantagem deste teste é seu alto custo. Os poucos estudos encontrados mostraram uma ASC que varia de 0,75 a 0,86.

### GAST

O GAST consiste em observar alterações nas concentrações de estradiol antes e após injeção subcutânea de análogo de GnRH (Johnson et al., 2006). Os trabalhos encontrados mostram um teste com boa acurácia, com ASC em torno de 0,9.

### Volume Ovariano

O volume ovariano é um indicador indireto do tamanho da coorte de folículos e não é só influenciado pelo número de folículos, mas também por seus tamanhos. Neste sentido, alguns trabalhos já demonstraram que a quantidade de folículos grandes se mantém constante com o avançar da idade da mulher, ao contrário dos folículos de pequeno volume. Este fato pode justificar porque a CFA prediz melhor a resposta ovariana ao estímulo exógeno que o volume ovariano (Jayaprakasan et al., 2008). Desta maneira, apesar de alguns trabalhos mostrarem uma diferença no volume ovariano de mulheres com boa e má resposta, esta foi menos marcante que aquela observada com o HAM e a CFA (Jayaprakasan et al., 2008). Além disso, não foi encontrada correlação significativa entre volume ovariano e chance de gestação.

### CFA

A CFA é exame simples e rápida e, apesar de operador-dependente, apresenta boa reprodutibilidade. O primeiro estudo que relaciona a CFA com a taxa de nascidos-vivos foi realizado por Maseelall e cols. e encontrou que quando a CFA era menor ou igual a 10 folículos, havia menor chance de sucesso do tratamento (Marseelall et al., 2008). Outros trabalhos mostraram resultados semelhantes, com ASC entre 0,85 e 0,99.

### Biópsia Ovariana

Apesar de considerado padrão-ouro na avaliação da reserva ovariana, apresenta uma série de desvantagens. Do ponto de vista prático, é realizado através de biópsia do ovário. No entanto, a distribuição dos folículos nos ovários é heterogênea e um fragmento pode não representá-lo (Lambalk et al., 2004). Além disso, trata-se de procedimento invasivo que pode levar a aderências e diminuir ainda mais a reserva ovariana (Lass et al., 2004). Sendo assim, o uso da biópsia não é realizado para avaliação da reserva ovariana.

### Discussão

Nos dias atuais, em que os casais postergam o início da prole, seria ideal encontrar um método capaz de predi-

**Tabela:** Resultados dos principais testes de avaliação da reserva ovariana.

Teste	Estudo	Ano	Tipo de estudo	Desfecho	ASC	RVS+	RVS-
FSH	Vladimirov et al.	2005	Prospectivo	RO	0,76	2,20	0,20
	Hendriks et al.	2005	Prospectivo	RO	0,83	NC	NC
	Kwee et al.	2006	Prospectivo	RO	0,83	NC	NC
	Barad et al.	2008	Retrospectivo	Gestação	0,55	NC	NC
	Sun et al.	2008	Revisão	Nascido-vivo	0,28	2,1	0,89
	Barad et al.	2009	Retrospectivo	RO	0,73	3,56	0,44
	Sun et al.	2008	Revisão	RO	0,77	NC	NC
	Riggs et al.	2008	Retrospectivo	RO	0,71	1,80	0,31
	E2	Vladimirov et al.	2005	Prospectivo	RO	0,6	4,83
	Hendriks et al.	2005	Prospectivo	RO	0,51	NC	NC
	Riggs et al.	2008	Retrospectivo	RO	0,54	1,30	0,47
Inibina B	Vladimirov et al.	2005	Prospectivo	RO	0,79	3,62	0,08
	Hendriks et al.	2005	Prospectivo	RO	0,81	NC	NC
	Kwee et al.	2006	Prospectivo	RO	0,56	NC	NC
	Sun et al.	2008	Revisão	RO	0,71	6,5	0,65
	Riggs et al.	2008	Retrospectivo	RO	0,68	4,55	0,58
HAM	Tremellen et al.	2005	Prospectivo	RO	NC	5,33	0,24
	Ficioglu et al.	2006	Prospectivo	RO	0,92	9,99	0,10
	Barad et al.	2009	Retrospectivo	Gestação	0,71	2,48	0,51
	Barad et al.	2009	Retrospectivo	RO	0,90	5,44	0,15
	Kwee et al.	2008	Prospectivo	Gestação	0,64	NC	NC
	Kwee et al.	2008	Prospectivo	RO	0,85	5,43	0,28
	Riggs et al.	2008	Retrospectivo	RO	0,81	3,95	0,22
	Jayaprakasan et al.	2008	Prospectivo	RO	0,90	3,70	0,10
	Sun et al.	2008	Revisão	RO	0,92	NC	NC
	TCC	Vladimirov et al.	2005	Prospectivo	RO	0,90	11,67
	Kwee et al.	2006	Prospectivo	RO	0,88	14,60	0,28
	Kwee et al.	2008	Prospectivo	Gestação	0,75	NC	NC
	Sun et al.	2008	Revisão	RO	0,81	5,75	0,35
EFORT E2	Kwee et al.	2006	Prospectivo	Gestação	0,71		
	Kwee et al.	2006	Prospectivo	RO	0,75		
EFORT inibina B	Kwee et al.	2006	Prospectivo	Gestação	0,86		
	Kwee et al.	2006	Prospectivo	RO	0,88		
GAST E2	Hendriks et al.	2005	Prospectivo	RO	0,91		
GAST inibina B	Hendriks et al.	2005	Prospectivo	RO	0,81		
CFA	Vladimirov et al.	2005	Prospectivo	RO	0,85	6,33	0,27
	Jayaprakasan et al.	2007	Prospectivo	Gestação	0,82	5,23	0,83
	Jayaprakasan et al.	2007	Prospectivo	RO	0,97	13,51	0,00
	Jayaprakasan et al.	2008	Prospectivo	RO	0,93	7,75	0,08
	Kwee et al.	2008	Prospectivo	RO	0,83		
	Sun et al.	2008	Revisão	RO	0,78	2,03	0,40
	Masehallal et al.	2009	Retrospectivo	Nascido-vivo		1,41	0,71
	V. Ovariano	Sun et al.	2008	Revisão	RO	0,82	4,26

Legenda: ASC: área sob a curva, RVS+: razão de verossimilhança positivo, RVS-: razão de verossimilhança negativo, FSH: hormônio folículo-estimulante, RO: resposta ovariana à indução, NC: não disponível, E2: estradiol, HAM: hormônio anti-mülleriano, TCC: teste do citrato de clomifeno, EFORT: teste com FSH exógeno, GAST: teste de estimulação com agonista do GnRH, CFA: contagem de folículos antrais, Vol.ovariano: volume ovariano

zer o potencial reprodutivo. Além disso, antes de TRA, a avaliação adequada da reserva ovariana seria de grande ajuda, tanto na escolha do tratamento quanto na determinação de seu prognóstico.

Um fator limitante na análise e comparação dos testes nos estudos publicados diz respeito à diferença de conceitos entre a avaliação de reserva ovariana e a avaliação da resposta ovariana ao estímulo. A primeira só deveria ser analisada em relação à capacidade do teste em prever taxa de gestação e taxa de nascido-vivo, enquanto a segunda pode ser estudada através do número folículos ou oócitos recrutados, duração da indução, quantidade de gonadotrofina utilizada e taxa de cancelamento por ciclo. No entanto, os trabalhos são heterogêneos quanto

aos desfechos estudados e, a maioria, apenas descreve a capacidade de predição da resposta ovariana ao estímulo e não a taxa de gestação ou nascido-vivo após FIV, sendo difícil a comparação entre eles.

Neste cenário, a melhor maneira de avaliá-los é através do cálculo da ASC. Tendo como base esta premissa, os teste que apresentaram maiores ASC (30,9) foram o HAM, a CFA, o TCC e o GAST.

No entanto, além da avaliação anterior, outras características devem ser consideradas para tornar um teste clinicamente viável, como a reprodutibilidade, a aplicabilidade, o custo e a sua disponibilidade. Deve-se ter em mente, por exemplo, que testes de imagem são operador-dependentes, que algumas medidas hormo-

nais variam dentro de um mesmo ciclo menstrual e entre ciclos menstruais diferentes e, também, que o uso de hormônios exógenos acarreta gastos e efeitos colaterais. Assim, na prática clínica, os testes mais acessíveis são a dosagem do HAM e a CFA.

Por fim, é de fundamental relevância ressaltar que os resultados expostos referem-se à predição de resposta ovariana ao estímulo, dado que muito interessa ao médico especialista em reprodução humana, mas que pouco ou nada importa ao casal que o procura.

## CONCLUSÃO

Nenhum teste de reserva ovariana mostrou-se capaz de prever as chances de gestação após TRA. Mesmo aqueles que predizem com bom desempenho a chance de resposta ovariana, não refletem com acurácia a taxa de gestação e nascido-vivo.

### Autor correspondente:

Lucas Yugo Shiguehara Yamakami  
Rua Mato Grosso, 306 cj 1310. Higienópolis.  
CEP 05410-020. São Paulo, SP, Brasil.  
Tel.: (011) 2114-6633

## Referências Bibliográficas

1. Abdalla H, Thum, MY. An elevated basal FSH reflects a quantitative rather than qualitative decline of the ovarian reserve. *Hum Reprod.* 2004;19:893-8.
2. Barad DH, Weghofer A, Gleicher N. Comparing anti-Müllerian hormone (AMH) and follicle-stimulating hormone (FSH) as predictors of ovarian functions. *Fertil Steril.* 2009;91:1553-5.
3. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update.* 2006;12:685-718.
4. Coccia ME, Rizzello F. Ovarian Reserve. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1127:27-30.
5. Fişcioglu C, Kutlu T, Baglam E, Bakacak Z. Early follicular antimüllerian hormone as an indicator of ovarian reserve. *Fertil Steril.* 2006;85:592-6.
6. Hendriks DJ, Broekmans FJ, Bancsi LF, Looman CW, de Jong FH, te Velde ER. Single and repeated GnRH agonist stimulation tests compared with basal markers of ovarian reserve in the prediction of outcome in IVF. *J Assisted Reprod and Genet.* 2005;22:65-73.
7. Jayaprakasan K, Hilwah N, Kendall NR, Hopkisson JF, Campbell BK, Johnson IR, Raine-Fenning NJ. Does 3D ultrasound offer any advantage in the pretreatment assessment of ovarian reserve and prediction of outcome after assisted reproduction treatment? *Hum Reprod.* 2007;22:1932-1941.
8. Jayaprakasan K, Campbell B, Hopkisson J, Johnson I, Raine-Fenning N. A prospective, comparative analysis of anti-müllerian hormone, inhibin-B, and three-dimensional ultrasound determinants of ovarian reserve in the prediction of poor response to controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril.* 2008; [in press].
9. Johnson NP, Bagrie EM, Coomarasamy A, Bhattacharya S, Shelling AN, Jessop S, Farquhar C, Khan KS. Ovarian reserve tests for predicting fertility outcomes for assisted reproductive technology: the International Systematic Collaboration of Ovarian Reserve Evaluation protocol for a systematic review of ovarian reserve test accuracy. *BJOG.* 2006;113:1472-80.
10. Kwee J, Schats R, McDonnell J, Schoemaker J, Lambalk CB. The clomiphene citrate challenge test versus the exogenous follicle-stimulating hormone ovarian reserve test as a single test for identification of low responders and hyperresponders to in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2006;85:1714-22.
11. Kwee J, Schats R, McDonnell J, Themmen A, de Jong F, Lambalk C. Evaluation of the anti-Müllerian hormone as a test for the prediction of ovarian reserve. *Fertil Steril.* 2008;90:737-743.
12. Lambalk CB, de Koning CH, Flett A, Van Kasteren Y, Gosden R, Homburg R. Assessment of ovarian reserve. Ovarian biopsy is not a valid method for the prediction of ovarian reserve. *Human Reprod.* 2004;19:1055-1059.
13. Lass A. Assessment of ovarian reserve: is there still a role for ovarian biopsy in the light of new data? *Human Reprod.* 2004;19:467-9.
14. Maseelall PB, Hernandez-Rey AE, Oh C, Maagdenberg T, McCulloh DH, McGovern PG. Antral follicle count is a significant predictor of livebirth in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril.* 2009; 91:1595-7.
15. Riggs RM, Duran EH, Baker MW, Kimble TD, Hobeika E, Yin L, Matos-Bodden L, Leader B, Stadtmauer L. Assessment of ovarian reserve with anti-Müllerian hormone: a comparison of the predictive value of anti-Müllerian hormone, follicle-stimulating hormone, inhibin B, and age. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;199:202.e1-8.
16. Sun W, Stegmann BJ, Henne M, Catherino WH, Segars JH. A new approach to ovarian reserve testing. *Fertil Steril.* 2008;90:2196-202.
17. Tremellen KP, Kolo M, Gilmore A, Lekamge DN. Anti-müllerian hormone as a marker of ovarian reserve. *Aust N Zealand J Obst Gyn.* 2005;45:20-4.
18. Vladimirov IK, Tacheva DM, Kalinov KB, Ivanova AV, Blagoeva VD. Prognostic value of some ovarian reserve tests in poor responders. *Arch Gynecol Obstet.* 2005;272:74-9.

# Seleção de espermatozoides para ICSI

## *Sperm selection for intracytoplasmic sperm injection*

J.G. Franco Junior<sup>1-2-3</sup>, R.L.R Baruffi<sup>1-2</sup>, M. Cavagna<sup>1</sup>, C.G. Petersen<sup>1-2-3</sup>, A.L.Mauri<sup>1-2</sup>, J.B.A Oliveira<sup>1-2-3</sup>

<sup>1</sup>Center for Human Reproduction Prof. Franco Junior, Ribeirão Preto, Brazil

<sup>2</sup>Paulista Center for Diagnosis, Research and Training, Ribeirão Preto, Brazil

<sup>3</sup>Department of Gynecology and Obstetrics, Botucatu Medical School São Paulo State University, Botucatu, Brazil

### ABSTRACT

The application of assisted reproduction techniques has provided help to many men seeking to father a child, although the current success of these procedures remains suboptimal. Today some protocols allow sperm to be selected according to their ultrastructural morphology or surface molecular characteristics. On the other hand, successful human reproduction relies partly on the inherent integrity of sperm DNA. Therefore, it is now necessary to improve the safety of the sperm selection method. It is urgent to optimize procedures to isolate spermatozoa for ICSI with low risk of DNA damage. In recent years, two technologies have attracted the attention of specialists as methods capable of identifying a spermatozoon with low risk of DNA damage: Ultrastructural morphology sperm selection at high magnification and sperm head birefringence selection. This review analyses these two technologies

Key words: sperm selection, high magnification sperm morphology, birefringence

### RESUMO

A aplicação de técnicas de reprodução assistida tem ajudado muitos homens, embora o sucesso desses procedimentos continue abaixo do ideal. Hoje alguns protocolos permitem a seleção do esperma de acordo com sua morfologia ultra-estrutural ou características moleculares de superfície. Por outro lado, a reprodução humana bem sucedida depende, em parte, da integridade inerente do DNA do espermatozoide. Portanto, é necessário melhorar a segurança do método de seleção, sendo urgente a otimização de procedimentos para isolar espermatozoides para ICSI com baixo risco de danos no DNA. Nos últimos anos, duas tecnologias têm atraído a atenção de especialistas como métodos capazes de identificar espermatozoides com baixo risco de danos no DNA: a seleção de esperma pela ultra-morfologia em alta magnificação e pela birrefringência da cabeça. Esta revisão analisa essas duas tecnologias

Palavras-chave: seleção do espermatozoide, alta magnificação, morfologia do esperma, birrefringência

The application of assisted reproduction techniques has provided help to many men seeking to father a child, although the current success of these procedures remains suboptimal. For many years the sperm selection methods were based on washing procedures with subsequent resuspension of the male germ cells. Double density gradient centrifugation and the swim-up procedure were

used as standard preparations. Today some protocols allow sperm to be selected according to their ultrastructural morphology or surface molecular characteristics.

On the other hand, successful human reproduction relies partly on the inherent integrity of sperm DNA. Clinical evidence has shown that sperm nuclear DNA damage is closely related to male-derived repeated failure of ICSI attempts (Tesarik *et al.*, 2004; Tesarik *et al.*, 2005). It was also noted that the late paternal effect, but not the early one, is associated with increased sperm DNA fragmentation (Tesarik *et al.*, 2004). Sperm DNA damage is associated with a significantly increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI (Zini *et al.*, 2008).

Therefore, it is now necessary to improve the safety of the sperm selection method. It is urgent to optimize procedures to isolate spermatozoa for ICSI with low risk of DNA damage. In recent years, two technologies have attracted the attention of specialists as methods capable of identifying a spermatozoon with low risk of DNA damage: I - Ultrastructural morphology sperm selection at high magnification (Bartoov *et al.*, 2001; Bartoov *et al.*, 2002); II - Sperm head birefringence selection (Gianaroli *et al.*, 2008).

### ***I - Ultrastructural morphology sperm selection at high magnification***

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 (Bartoov *et al.*, 2003; De Vos *et al.*, 2003). At this magnification, only major sperm morphological defects can be observed, whereas it is more difficult to identify subtle sperm organelle malformations that seem to be related to the ICSI outcome. To test this latter hypothesis, in 2001, Bartoov's group developed a new method of unstained, real-time, high magnification motile sperm organellar morphology examination called MSOME. High magnification is made possible by the use of an inverted light microscope equipped with high-power Nomarski differential interference contrast optics enhanced by digital imaging to achieve a magnification of up to x6600 (Bartoov *et al.*, 2001; Bartoov *et al.*, 2002). Inclusion of MSOME, together with a micromanipulation system, enables the retrieval of a single motile spermatozoon with strictly defined morphologically normal nucleus to be injected into the retrieved oocytes. Bartoov and his group named this modified IVF procedure intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) (Bartoov *et al.*, 2001).

Furthermore, spermatozoa appearing morphologically normal at this magnification (x400) may in fact carry various structural abnormalities that can only be detected at higher optical magnification. The spermatozoa with vacuoles would not be detected in conventional ICSI (Bartoov *et al.*, 2003). This is a serious disadvantage, because microinjection of spermatozoa with vacuolated nuclei has been shown to be associated with low implantation and pregnancy rates, and with early miscarriage (Berkovitz *et al.* 2006; Hazout *et al.* 2006).

Sperm preparation and microscopy equipment for MSOME  
In our laboratory, a 1µl aliquot of sperm cell suspension was transferred to a 5µl microdroplet of modified HTF medium containing 7% polyvinylpyrrolidone solution (PVP medium; Irvine Scientific). 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 manner, suspended motile sperm cells in the observation droplet could be examined at high magnification by an inverted microscope (Eclipse TE 2000 U; Nikon, Japan) equipped with high-power differential interference contrast optics (DIC/Nomarski). The images were captured by a color video camera containing effective picture elements (pixel) for high quality image production, and a color video monitor (Fig.1). Morphological evaluation was accomplished on a monitor screen and the total calculated magnification was = x8400 (total magnification: objective magnification X magnification selector X video coupler magnification X calculated video magnification) (Franco *et al.*, 2008).

MSOME criteria for IMSI selected sperm cells

At least 200 motile spermatozoa per patient were evaluated and the percentage of normal spermatozoa was determined.

Normal spermatozoa

A spermatozoon was classified as morphologically normal (Fig. 2A) when it exhibited a normal nucleus as well as acrosome, post-acrosomal lamina, neck and tail, besides not presenting a cytoplasmic droplet or cytoplasm around the head (Bartoov *et al.*, 2001; Bartoov *et al.*, 2002). For the nucleus, the morphological state was defined by the form and content of the chromatin. The criterion for normality of nuclear form was a smooth, symmetric and oval configuration. Normal means for length and width were estimated as  $4.75 \pm 2.8$  and  $3.28 \pm 0.20 \mu\text{m}$ , respectively, whereas the form classified as abnormal presented variation of 2SD in at least one of the axes (length:  $\geq 5.31$  or  $\leq 4.19 \mu\text{m}$ , width:  $>3.7$  or  $<2.9 \mu\text{m}$ ). For rapid evaluation of nuclear form, a fixed, transparent, celluloid form of sperm nucleus fitting the criteria was superimposed on the examined cell (chablon construction based on ASTM E 1951-2). In the same manner, the form of the nucleus was considered normal if no extrusion or invagination of the nuclear chromatin mass had been detected (regional abnormality of nuclear form). Chromatin content was considered normal if the total vacuole area was found to occupy less than 4% of the nuclear area. A nucleus was considered normal if both nuclear form and chromatin content were normal.

Abnormalities of nuclear form

a- Spermatozoa with small or large oval nuclear forms (Fig.2B). Sperm cells exhibiting an abnormal but oval

nuclear shape and a morphologically normal nucleus, content length  $\leq 4.19 \mu\text{m}$  or  $\geq 5.31 \mu\text{m}$ .

b-Spermatozoa with wide or narrow nuclear forms (Fig.2C) - Sperm cells with non-oval, abnormal nuclear shapes, but with normal nuclear content, width:  $>3.7$  or  $<2.9 \text{mm}$ .

c-Spermatozoa with regional shape abnormality of nuclear form (Fig.2D) - sperm cells with an extrusion or invagination of the nuclear mass.

Abnormalities of nuclear chromatin content

a. Spermatozoa with vacuoles occupying  $>4-50\%$  of the nuclear area (Fig.2E)

b. Spermatozoa with large nuclear vacuoles (Fig.2F) - sperm cells with vacuoles occupying  $>50\%$  of the nuclear area.

Sperm cells with a severe abnormality (such as pin, amorphous, tapered, round, multinucleated head, double tail) easily identified at low magnification (200x-400x) were not assessed. The abnormalities observed at high magnification, in both form and nuclear content, also presented normal acrosome, post-acrosomal lamina, neck and tail, and did not show a cytoplasmic droplet or cytoplasm around the head. Spermatozoids that presented more than one alteration were classified as having the most severe alteration (small/large  $<$  wide/narrow  $<$  regional shape abnormality  $<$  with vacuoles occupying  $>4\%-50\%$   $<$  with vacuoles occupying  $>50\%$  of the nuclear area).

IMSI and sperm nuclear vacuoles

One specific sperm malformation, which has been negatively associated with natural male fertility potential, is the presence of large nuclear vacuoles. In 2006, Berkovitz *et al.* carried out a more specific analysis on the impact of sperm cells with normal nuclear shape but large vacuoles, identified by MSOME, on ICSI pregnancy outcome. They performed a comparative study testing the outcomes of two matched IMSI groups: an experimental group (n=28), where spermatozoa with strictly defined normal nuclear shape but large vacuoles were available for oocyte microinjection, and a control group (n=28), where strictly defined morphologically normal spermatozoa (including nuclear shape and content) were retrieved for microinjection into the oocytes. Both groups satisfied the following selection criteria: maternal age  $<40$  years and three or more retrieved metaphase II oocytes in the present cycle. As a result, the groups showed no differences as to fertilization, implantation rates or development of top quality embryos, whereas the pregnancy rate per cycle in the experimental IMSI groups was significantly lower, and the early miscarriage rate per pregnancy was significantly higher than that of the control group (18% versus 50%,  $p < 0.01$ , and 80% versus 7%, respectively,  $p < 0.01$ ). In this work, therefore, retrieval of spermatozoa with strictly normal nuclear shape but large vacuoles appeared to reduce ICSI pregnancy outcome and to be associated with early miscarriage. In fact, embryo development seemed normal at the early stages (no differences in top quality embryos, normal fertilization or implantation), whereas it seemed impaired at the later ones (low pregnancy and high miscarriage rates). In addition, according to Berkovitz *et al.* (2007) sperm nucleus morphological normality, assessed at high magnification, could decrease the prevalence of major fetal malformations in ICSI offspring.

IMSI and embryo development

Recently, it has been demonstrated that IMSI has no significant effect on embryo quality at day 2 in relation to the conventional ICSI procedure (Mauri *et al.*, 2010). In addition, a relationship has been shown between defec-

tive spermatozoa and higher early miscarriage rates, despite the apparent lack of decrease in embryo quality on day 3 (Hazout *et al.* 2006). Based on the hypothesis that the employment of spermatozoa with large nuclear vacuoles would not produce any early paternal effects on embryo development (up to day 3), Vanderzwalmen and his group (Vanderzwalmen *et al.*, 2008) investigated the possible influence of such nuclear vacuoles on the embryo's competence to develop to the blastocyst stage; according to the researchers this may suggest a late paternal influence on embryo development after paternal DNA content begins to contribute to such advancement at around day 3 after fertilization. The outcome of embryo development (until day 5) was assessed in a group of 25 patients who underwent sibling oocyte microinjection with four different grades of sperm cells: (i) grade I (absence of vacuoles); grade II ( $\leq 2$  small vacuoles); (iii) grade III ( $> 2$  small vacuoles or  $\geq 1$  large vacuole); and grade IV (large vacuoles with abnormal head shape or other abnormalities). Small ( $< 4\%$  of the head volume) and large vacuoles were defined according the classification of Bartoov (Bartoov *et al.*, 2001; Bartoov *et al.*, 2002), while grading was performed between  $\times 6000$  and  $\times 12000$  high magnification. To reduce the influence of female factor infertility, the inclusion criteria were female age less than 40 years and availability of at least eight oocytes at retrieval. As a whole, the four groups did not differ significantly as to the number of zygotes and embryo development up to day 3, including the subgroup analysis; on the contrary, the data showed highly significant differences in the development to blastocysts and the blastocyst quality among the four grades ( $p < 0.001$ ). On the other hand, comparing the groups one by one with regard to development to blastocysts, statistically significant differences were found between groups I (56.3%) and II (61.4%) and between groups III (5.1%) and IV (0%). Even when combining the groups into pairs, no significant difference in terms of embryo development to day 3 was seen (group I/II: 87.1% versus group III/IV: 66.7%), whereas the incidence of blastocyst and good quality blastocyst formation was significantly different between combined grades I/II and grades III/IV spermatozoa (43.5 and 19.1% versus 10.1 and 2.9% respectively,  $P < 0.001$ ). Based on these results, the researchers postulated that the size and number of sperm nuclear vacuoles, identified accurately at high magnification, negatively affected blastocyst development, especially after a day-3 embryo transfer, and reinforced previous studies suggesting the paternal effects on initial embryonic development (Nadalini *et al.*, 2009; Vanderzwalmen *et al.* 2008).

#### MSOME for routine laboratory semen analysis

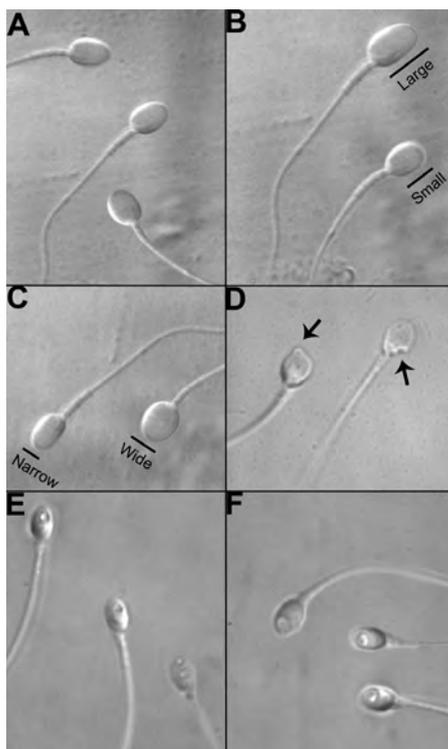
Although MSOME was initially developed by its creator only as a selection criterion (Bartoov *et al.*, 2001), its application as a morphological semen classification method could represent an improvement in routine laboratory sperm analysis, with potential clinical implications, especially in the field of medically assisted reproduction. In the past, only one study (Bartoov *et al.*, 2002) has examined the relationship between normal spermatozoa obtained by the WHO routine method (World Health Organization, 1999) and by MSOME in 20 patients. As a result, no significant correlation was found between the incidence of morphologically normal spermatozoa as defined by the WHO and by MSOME. Nevertheless, routine analysis reported a significantly higher percentage of sperm normality in relation to MSOME. In a very recent paper, Oliveira *et al.* (2009) adopted a similar approach, evaluating the correlation between MSOME classification and a highly diffuse sperm morphology classifica-

tion (Tygerberg criteria) (Menkveld *et al.*, 1990), in order to better understand the potential diagnostic/prognostic value of the MSOME method. The study design included 97 randomly selected semen samples. Regression analysis showed a significant positive correlation between the incidence of normal sperm forms by Tygerberg criteria and that obtained by MSOME ( $r=0.8395\%$ ; CI: 0.75 to 0.88;  $P < 0.0001$ ). Similarly to the work presented by Bartoov *et al.* (2002), the MSOME criteria appear to be much more restrictive, presenting significantly lower sperm normality percentages for the semen samples in comparison to those found after routine analysis by the Tygerberg classification ( $3.3 \pm 3.2\%$ , range 0-18%; and  $9.4 \pm 4.8\%$ , range 2-23% respectively,  $P < 0.0001$ ). Based on these results, the researchers postulated that despite the high positive correlation, MSOME represented a much stricter evaluation criterion for sperm morphology, since its resolution power ( $\geq \times 6000$ ) enabled the identification of vacuoles and chromatin abnormalities that could not be described with the same accuracy by a Tygerberg method analysis. In addition, its focus on motile sperm fractions could only represent an additional advantage for MSOME by providing information on the fertilization and development potential of the sample fraction referred for assisted reproduction treatment. Therefore, our group stressed the importance of not only including MSOME among the criteria for routine laboratory semen analysis, but of performing this step prior to the conventional ICSI procedure (Oliveira *et al.*, 2009).

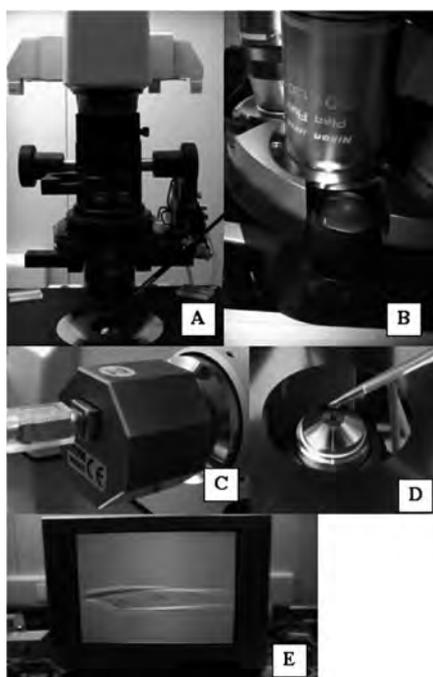
In 2006, Hazout *et al.*, reported a positive association between high-magnification selection of sperm cells with normal nuclear shape and pregnancy outcome in patients with repeated conventional ICSI failures; in a subgroup of patients ( $n=72$ ) involved in the study, the level of sperm DNA integrity (by TUNEL assay) was assessed, and the outcomes of IMSI could be compared in patients with several degrees of sperm DNA damage. The improvement of clinical ICSI outcomes was evident both in patients with an elevated degree of sperm DNA fragmentation and in those with normal sperm DNA status.

In 2008, Franco *et al.* (2008) compared the amount of DNA fragmentation (by TUNEL assay) and the incidence of denatured single-stranded or normal double-stranded DNA (by acridine orange fluorescence method) in sperm cells characterized by the presence of large nuclear vacuoles (LNV group) and in strictly morphologically normal spermatozoa (NN group), both selected at high magnification ( $\times 8400$ ). The analyses were carried out on fresh semen samples of 30 unselected patients. The authors reported a significantly higher level of DNA fragmentation in LNV sperm cells than in NN spermatozoa (29.1% versus 15.9%,  $P < 0.0001$ ). In addition, the LNV group also showed a significantly increased amount of single-stranded denatured DNA with respect to the NN sperm cells (67.9% versus 33.1%,  $P < 0.0001$ ). Thus, we postulated that the high levels of denatured DNA in LNV sperm cells pointed to early decondensation and disaggregation of sperm chromatin fibers: an unwanted high degree of sperm decondensation could result in asynchronous chromosome decondensation, and may lead to cytoplasmic fragments in the embryo (Menezo *et al.*, 2007). Therefore, the data presented stressed the link between the presence of large nuclear vacuoles and increased DNA damage in sperm cells and supported the routine selection of morphologically motile spermatozoa at high magnification (by MSOME) before conventional ICSI. A similar approach was adopted by Garolla *et al.* (2008) in particular, after observation via a high magnification system ( $\times 13000$ ), 20 strictly morphologically normal sperm cells (for acrosome, head, neck and tail,

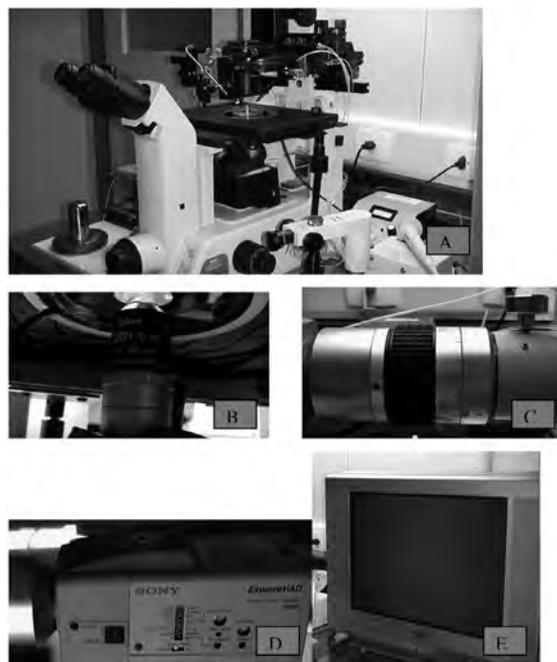
**Figure 1.** Microscope equipment for MSOME: (A) DIC system; (B) – Plan Fluor Apo x100 oil/1.35 lens + Prism; (C) Color video camera; (D) Immersion oil on objective; (E) Video monitor 21”.



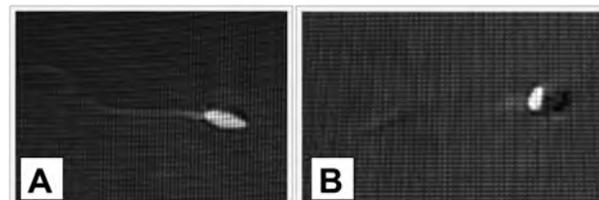
**Figure 2.** (A) Normal spermatozoa, (B-C); Abnormality of nuclear form: spermatozoa with small or large oval nuclear forms (B); spermatozoa with wide or narrow nuclear forms (C); (D-F) Abnormalities in nuclear chromatin: spermatozoa with regional shape abnormality of nuclear form (D), spermatozoa with vacuoles occupying 5-50% of the nuclear area (E) spermatozoa with large nuclear vacuoles (>50% of the nuclear area) (F).



**Figure 3.** (A) The polarization inverted microscope (TE 300 Nikon, Japan) equipped with Hoffman contrast and polarizing lens; (B) Hoffman objective of 20x; (C) C-mount; (D) Camera and 1.5-inch monitor.



**Figure 4.** (A) Spermatozoa with total sperm head birefringence (SHBF-T) observed at 2,500 x magnification; (B) Spermatozoa with partial sperm head birefringence (SHBF-P) observed at 2,500X magnification



including those cells which had large nuclear vacuoles, but were otherwise normal) were selected from each semen sample of 10 patients with severe testicular alteration and absent sperm motility: 10 with normal morphology and no vacuoles (group A) and 10 with normal morphology and at least one large head vacuole (group B), for a total of 200 sperm cells. Each spermatozoon was studied for mitochondrial membrane potential, DNA integrity (by acridine orange staining), DNA fragmentation (by TUNEL assay) and sperm aneuploidies (by FISH analysis). The data showed that single cells from group A exhibited a significantly better physiological status than cells from group B with regard to mitochondrial function, DNA integrity and DNA fragmentation ( $13.3 \pm 4.9\%$  versus  $52.2 \pm 14.7\%$ ,  $5.3 \pm 3.0\%$  versus  $71.9 \pm 11.1\%$ , and  $9.3 \pm 4.8\%$  versus  $40.1 \pm 11.6\%$  respectively, all  $P < 0.001$ ). No chromosomal alteration was present in cells from group A. Therefore, although the study was conducted on a highly restricted number of cells, the results strengthened the concept of an association between the incidence of sperm DNA damage and the presence of nuclear vacuoles and stressed the importance of a morphological selection by high-magnification microscopy (Nadalini *et al.*, 2009).

In conclusion, all the publications (Antinori *et al.*, 2008; Bartoov *et al.*, 2003; Berkovitz *et al.*, 2006; Hazout *et al.*, 2006) about IMSI reported not only better results as to implantation and clinical pregnancy rates but also a reduction in the miscarriage rates in couples whose sperm cells were strictly morphologically selected at high magnification (MSOME). In addition, the IMSI procedure improved the clinical ICSI outcome in patients with several degrees of sperm DNA damage.

It has been reported that the presence of vacuoles could reflect molecular anomalies responsible for abnormal chromatin remodeling during the sperm maturation process and may contribute to making the spermatozoa more susceptible to sperm DNA impairment. The current results establish a crucial association between normal blastocyst development and both the number and size of vacuoles, indicating that routine morphological analysis of sperm cells, performed at high magnification (x6000), is of fundamental importance to improving the embryo implantation potential. In addition, the presence of vacuoles in the nuclei of spermatozoa is also associated with reduced pregnancy and with a high level of DNA damage. Therefore, in light of these findings, the MSOME method seems to be a powerful tool for selecting strictly morphologically normal spermatozoa, with a lower incidence of DNA defects that cannot be detected at routine ICSI magnification.

### 11. Sperm head birefringence (SHBF) selection

It is clear that in cases of intracytoplasmic sperm injection (ICSI), although the "best" spermatozoon is selected, cells with DNA damage are routinely injected into the oocyte. Baccetti *et al.* (2004) demonstrated that it is possible to combine a polarization apparatus with an inverted light microscope used by ICSI to analyze the human motile sperm head birefringence (SHBF) to indicate sperm structural normality. Gianaroli *et al.* (2008) were the first to use SHBF characteristics and apply polarization inverted microscopy to select sperm for ICSI and demonstrated better embryo development and clinical outcome results after injection of SHBF spermatozoa when compared with controls (no SHBF spermatozoa). Recently, the same group carefully evaluated two types of SHBF on the basis of their acrosomal integrity (acrosome-reacted and acrosome-non-reacted spermatozoa) and demonstrated better clinical results when acrosome-reacted spermatozoa were used for ICSI (Gianaroli *et al.*, 2010). The data from this study point to the injection of reacted spermatozoa as the best option to achieve pregnancy in patients with male factor infertility.

#### Semen evaluation and processing

Semen samples were collected in sterile containers by masturbation after a period of 2 to 5 days of sexual abstinence. The semen was analyzed for sperm concentration, volume and quality of motility. The liquefied fresh semen samples were prepared by using a layering method that consisted of permitting the ejaculated sperm sample to migrate up to the human tubal fluid (HTF) medium with 10% human serum albumin (10% HAS) deposited on top of the fresh semen sample, at 2:1 proportion, for 30 minutes at the temperature of 37°C. The portion of motile sperm was resuspended in HTF/10%HSA medium and the concentration was adjusted to  $3 \times 10^6$  sperm/ml.

#### Birefringence evaluation

The SHBF was assessed and selected by using an inverted microscope (TE 300 Nikon, Japan) equipped with Hoffman contrast and polarizing lenses. The total calculated

magnification was 2,500X obtained by using x20 Hoffman objective, camera, C-mount and 21-inch monitor (Fig. 3). SHBF selection was performed after a half hour of the deposition of 1 µl of prepared sperm into a 10 µl microdrop of 7% polyvinylpyrrolidone solution (PVP 7%) (Irvine, USA) covered by oil (Vitrolife, Sweden) and presented in a plastic Petri dish (Corning ref: 430166) at room temperature. Two types of SHBF can be selected: 1. SHBF total (SHBF-T) consists of motile spermatozoa that presented BF throughout their head (Fig. 4A); SHBF partial (SHBF-P) is comprised of those motile spermatozoa with BF present in 50% of their head, with this birefringence being localized in the post-acrosomal region (Fig. 4B).

The analysis of birefringence in sperm cells by using polarization microscopy has been reported to be an indicator of nuclear structural normality. The presence of SHBF is expressed by an organized and highly compacted texture that characterizes normal sperm nuclei, acrosomes, and motile tails (Baccetti, 2004).

Gianaroli *et al.* (2008) have proposed the injection of spermatozoa with birefringence in their head as a diagnostic tool to improve clinical outcome in treatment of the most severe male factor cases. Along this line of thought, the same group recently defended the hypothesis that human spermatozoa possess birefringence characteristics that reflect the state of the inner protoplasmic structures (Gianaroli *et al.*, 2010). The authors argue the hypothesis that abnormalities in the protoplasmic compartment of the sperm head may be related to anomalies of sperm chromatin packaging and incomplete nuclear remodeling occurring in the final phase of spermatogenesis. However, there are no studies in the literature that define the precise correlation between birefringence and protoplasmic structure.

In the literature, only one study analyzed the relationship between sperm head birefringence and DNA damage (Crippa *et al.*, 2009). The authors found a negative correlation between SHBF and DNA fragmentation, i.e. they showed that the proportion of sperm birefringence was inversely correlated with the incidence of fragmented DNA. In their study, they evaluated the total semen sample both by the presence of SHBF in their head and the DNA fragmentation, but did not describe the types of SHBF (partial and total).

Recently, our group evaluated two types of SHBF (total and partial) and their relationship with DNA fragmentation, directly from those spermatozoa selected according to their birefringence. The data show that DNA fragmentation values are significantly higher in spermatozoa with total SHBF, compared to those with partial SHBF (Petersen *et al.*, 2010). This fact could explain the results obtained by Gianaroli *et al.* (2010), who reported higher embryo implantation rate (39% vs. 8.6%) when oocytes were injected with reacted spermatozoa (SHBF-P) than when injected with non-reacted (SHBF-T) spermatozoa. Gianaroli *et al.* (2010) also suggest that birefringence in the absence (SHBF-T) or presence (SHBF-P) of the acrosomic reaction would be their selection criterion for identifying sperm health. But this hypothesis remains to be proven. However, DNA damage should alter the special cellular functions of human spermatozoa, and lead to diminished acrosome reaction with reduced fertilization rates. Moreover, negative correlation was identified between DNA damage and acrosome reaction and/or viability of human spermatozoa (Ozmen *et al.*, 2007).

Recently, our group demonstrated that the specific SHBF pattern (total or partial) was not an efficacious means of selecting sperm chromatin packaging abnormalities, at least when observed by chromomycin A3 staining.

The percentage of positive chromomycin A<sub>3</sub> (abnormal chromatin packaging) in spermatozoa with SHBF-T was (40.5%) not significantly different (Fisher's exact test; p=0.28) from the percentage (37.3%) of spermatozoa with SHBF-P (Vagnini et al., 2010).

In conclusion, there was significantly more DNA fragmentation in spermatozoa with SHBF-T than in those with SHBF-P. The results support a positive relationship between spermatozoa with SHBF-T and increase in DNA fragmentation and the use of SHBF as a sperm selection method.

#### Correspondence to:

Prof. J. G. Franco Junior  
Av. Prof. João Fiusa, 689  
Zip Code: 14025-310, Ribeirão Preto-SP-Brazil  
Phone/ FAX: 551639111100  
E-mail: crh@crh.com.br

#### References

- Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, d'Angelo D, Antinori S. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *Reprod Biomed Online*. 2008;16:835-41.
- Baccetti B. Microscopical advances in assisted reproduction. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 2004;36:333-9.
- Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F. Selection of spermatozoa with normal nuclei to improve the pregnancy rate with intracytoplasmic sperm injection. *N Engl J Med*. 2001;345:1067-8.
- Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezo Y, Barak Y. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl*. 2002;23:1-8.
- Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosovsky A, Yagoda A, Lederman H, Artzi S, Gross M, Barak Y. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril*. 2003;80:1413-9.
- 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*. 2006;21:1787-90.
- Berkovitz A, Eltes F, Paul M, Adrian E, Bartoov B. The chance of having a healthy normal child following intracytoplasmic morphologically-selected sperm injection (IMSI) treatment is higher compared to conventional IVF-ICSI treatment. *Fertil Steril*. 2007;88:S20.
- Crippa A, Magli MC, Paviglianiti B, Boudjema E, Ferraretti AP, Gianaroli L. DNA fragmentation and characteristics of birefringence in human sperm head. *Hum Reprod*. 2009;24:i95.
- 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*. 2003;79:42-8.
- Franco JG, Jr., Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JB, Vagnini L. Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI. *Reprod Biomed Online*. 2008;17:42-5.
- Garolla A, Fortini D, Menegazzo M, De Toni L, Nicoletti V, Moretti A, Selice R, Engl B, Foresta C. High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status. *Reprod Biomed Online*. 2008;17:610-6.
- Gianaroli L, Magli MC, Collodel G, Moretti E, Ferraretti AP, Baccetti B. Sperm head's birefringence: a new criterion for sperm selection. *Fertil Steril*. 2008;90:104-12.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Crippa A, Lappi M, Capitani S, Baccetti B. Birefringence characteristics in sperm heads allow for the selection of reacted spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2010;93:807-13.
- 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*. 2006;12:19-25.
- Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JB, Massaro FC, Baruffi RL, Franco JG, Jr. Comparison of day 2 embryo quality after conventional ICSI versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) using sibling oocytes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2010;150:42-6.
- Menezo YJ, Hazout A, Panteix G, Robert F, Rollet J, Cohen-Bacrie P, Chapuis F, Clement P, Benkhalifa M. Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. *Reprod Biomed Online*. 2007;14:418-21.
- Menkveld R, Stander FS, Kotze TJ, Kruger TF, van Zyl JA. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod*. 1990;5:586-92.
- Nadalini M, Tarozzi N, Distratis V, Scaravelli G, Borini A. Impact of intracytoplasmic morphologically selected sperm injection on assisted reproduction outcome: a review. *Reprod Biomed Online*. 2009;19 Suppl 3:45-55.
- Oliveira JB, Massaro FC, Mauri AL, Petersen CG, Nicoletti AP, Baruffi RL, Franco JG, Jr. Motile sperm organelle morphology examination is stricter than Tygerberg criteria. *Reprod Biomed Online*. 2009;18:320-6.
- Ozmen B, Caglar GS, Koster F, Schopper B, Diedrich K, Al-Hasani S. Relationship between sperm DNA damage, induced acrosome reaction and viability in ICSI patients. *Reprod Biomed Online*. 2007;15:208-14.
- Petersen CG, Vagnini LD, Junta CM, Mauri AL, Massaro FC, Silva LFI, Ricci J, Cavagna M, Pontes A, Baruffi RLR, Oliveira JBA, Franco Jr. JG Relationship between DNA damage and sperm head birefringence *Hum Reprod* 2010;25:i35-6.
- Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod*. 2004;19:611-5.
- Tesarik J. Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. *Reprod Biomed Online*. 2005;10:370-5.
- Vagnini LD, Petersen CG, Mauri AL, Massaro FC, Junta CM, Silva LF, Nicoletti AP, Cavagna M, Pontes A, Baruffi RL *et al*. Can sperm-head birefringence indicate sperm chromatin packaging abnormalities? *Hum Reprod* 2010;25:i279.
- Vanderzwalmen P, Hiemer A, Rubner P, Bach M, Neyer A, Stecher A, Uher P, Zintz M, Lejeune B, Vanderzwalmen S *et al*. Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *Reprod Biomed Online*. 2008;17:617-27.
- World Health Organization. *WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*. 4th edn. Published on behalf of the World Health Organization by Cambridge University Press, Cambridge, UK ; New York, NY, 1999.
- Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*. 2008;23:2663-8.

**AGENDA DE EVENTOS PARA 2010****MARÇO****3 – 6****19ª Jornada de Ginecologia e Obstetrícia  
Maternidade Sinhá Junqueira**Centro de Convenções Ribeirão Preto – São Paulo – SP  
sinha@eventus.com.br**11 - 15****Southeastern Section 74th Annual Meeting -  
American Urology of Association**Miami Beach, FL  
ses@wjweiser.com**26 - 27****Evento Regional Rede Latino-americana de  
Reprodução Assistida**Região Brasil - Workshop "Como escrever e publicar  
melhor: informação, dicas e técnicas de redação e  
publicação científica. Hotel Royal Center, Belo Horizonte-MG  
www.redlara.com  
selmogeber@origen.com.br**ABRIL****10 – 13****American Society of Andrology (ASA) Annual Meeting**Houston, TX USA  
annmarie@wjweiser.com**25th Anniversary EAU Congress**Barcelona, Spain  
info@eaubarcelona2010.org**MAIO****22 - 25****16th World Congress of Pediatric and Adolescent  
Gynecology**Montpellier, le Corum – FranceMCI France  
info@figij2010.com**JUNHO****27 - 30****26th Annual Meeting of the European Society of  
Human Reproduction and Embryology**Roma, Italia  
www.eshre.com**AGOSTO****5 - 7****Evento Regional Rede Latino-americana de  
Reprodução Assistida**Região Guatemala, México e Rep. Dominicana  
Tijuana-BC, México  
www.redlara.com**25 - 28****XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO  
ASSISTIDA**FORTALEZA – CEARÁ BRASIL  
WWW.SBRA.COM.BR**SETEMBRO****17 - 18****Evento Regional Rede Latino-americana de  
Reprodução Assistida**Região Colombia, Equador e Venezuela  
Quito, Equador  
www.redlara.com  
mturbina@hotmail.com**22 - 24****43º Congresso de Ginecologia e Obstetrícia do  
Distrito Federal**1º Congresso de Ultrassonografia em G. e O. FEBRASGO  
Brasília – DF  
sgob@ambr.com.br**OUTUBRO****23-27****American Society for Reproductive Medicine, 66th  
Annual Meeting**Denver, EUA  
www.asrm.org**NOVEMBRO****Evento Regional Rede Latino-americana de  
Reprodução Assistida**Região Argentina, Paraguai e Uruguai  
Hands on para Biólogos (Super ICSI, Criopreservação,  
Anexinas, Falhas de Fertilização)  
Buenos Aires, Argentina  
www.redlara.com

# **SBRA**

**SOCIEDADE BRASILEIRA DE  
REPRODUÇÃO ASSISTIDA**

## **Venha para a SBRA!**

### **Para ser sócio da SBRA:**

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

**2- depósito direto na conta da sociedade:  
R\$ 190,00:0 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<sup>®</sup>

## progesterona natural micronizada

Quando a fertilidade se transforma em maternidade

## Fertilidade

- Indução da ovulação.<sup>(1)</sup>
- Insuficiência lútea.<sup>(2)</sup>
- Inseminação intrauterina.<sup>(1)</sup>
- FIV e ICSI.<sup>(1)</sup>

## Gestação

- Ameaça de aborto.<sup>(3)</sup>
- Abortamento habitual.<sup>(4)</sup>

**Contraindicação:** este medicamento é contraindicado em doenças graves do fígado.

**Interação medicamentosa:** o uso crônico de barbitúricos pode diminuir a eficácia de UTROGESTAN<sup>®</sup>.

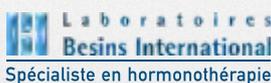
Referências: (1) Posaci C, et al. Progesterone for the luteal support of assisted reproductive technologies: clinical options. Human Reprod. 2000; 15 (Suppl. 1): 129-148. (2) Róman E, et al. Analysis of the bleeding pattern in assisted reproduction cycles with luteal phase supplementation using vaginal micronized progesterone. Human Reprod. 2000; 15: 1435-1439. (3) Smitz 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. (4) 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<sup>®</sup>** (progesterona). **Forma farmacêutica e apresentação:** Cápsulas com 100mg - Embalagem contendo 30 cápsulas, e cápsulas com 200mg - Embalagem contendo 14 cápsulas. **Indicações:** Utrogestan<sup>®</sup> é indicado nos distúrbios da ovulação relacionados à deficiência de progesterona, como alterações do ciclo menstrual e amenorreia secundária (ausência de menstruação), na insuficiência lútea, na deficiência de progesterona, na pré-menopausa e na reposição hormonal da menopausa (como complemento à terapia com estrogênio). Por via vaginal, Utrogestan<sup>®</sup> é indicado também na implantação do embrião e manutenção da gravidez durante o primeiro trimestre. **Contraindicações:** Utrogestan<sup>®</sup> não deve ser administrado em casos de neoplasia maligna de mama ou dos órgãos genitais, sangramento genital não diagnosticado, acidente vascular cerebral, doenças do fígado, aborto incompleto, neoplasia maligna do fígado, doenças tromboembólicas, tromboflebitis, porfiria, e hipersensibilidade e/ou alergia a qualquer um dos componentes da fórmula. **Advertências:** Utrogestan<sup>®</sup> não trata todas as causas de aborto espontâneo precoce e, particularmente, não tem ação sobre abortos provenientes de defeitos genéticos. Pacientes que apresentem alguma das condições que possam ser agravadas pela retenção de líquidos (distúrbios cardíacos ou renais), epilepsia, depressão, diabetes, cisto ovariano, disfunção hepática, asma brônquica, intolerância à glicose ou enxaqueca devem ser avaliadas quanto ao risco/benefício. Não é recomendável dirigir ou operar máquinas após a administração deste medicamento. **Interações medicamentosas:** O efeito da progesterona pode ser diminuído pelo uso concomitante de barbitúricos, carbamazepina, hidantoína ou rifampicina. Utrogestan<sup>®</sup> pode aumentar os efeitos dos betabloqueadores, teofilina ou ciclosporina. **Reações adversas:** As reações mais comumente observadas, na administração oral, são distensão abdominal, sonolência, cefaleia, alterações de apetite (diminuição ou perda), aumento ou perda de peso, metrorragia, período menstrual irregular, edema e fadiga. Para a administração vaginal, estudos clínicos não relataram a ocorrência de intolerâncias locais. **Posologia:** Via oral - Na insuficiência de progesterona, a dosagem média é de 200 a 300mg de progesterona micronizada por dia. Na insuficiência lútea, o regime de tratamento usual é de 10 dias por ciclo, habitualmente do 16º dia ao 25º dia, devendo ser usados 200 a 300mg por dia do seguinte modo: 200mg em dose única, antes de dormir; 300mg divididos em duas doses, 100mg duas horas após o desjejum e 200mg à noite, ao deitar. Em terapia de reposição hormonal para menopausa, a terapia estrogênica isolada não é recomendada (maior risco de hiperplasia endometrial). Conseqüentemente, a progesterona é combinada em dose de 100 a 200mg por dia, da seguinte forma: dose única de 100mg à noite antes de dormir, de 25 a 30 dias por mês (neste caso, a maioria das pacientes pode não apresentar sangramento) ou, divididos em duas doses de 100mg, 12 a 14 dias por mês, ou nas últimas duas semanas de cada seqüência do tratamento ou, dose única de 200mg à noite antes de dormir, de 12 a 14 dias por mês, ou nas últimas duas semanas de cada seqüência do tratamento. Na dose de 200mg, é comum observar um sangramento de privação após o uso da progesterona. Em todas as indicações, a via vaginal pode ser utilizada, nas mesmas dosagens da via oral, em casos de efeitos colaterais pelo uso da progesterona (sonolência após absorção oral). Via vaginal - Cada cápsula gelatinosa deve ser introduzida profundamente na vagina. Suporte de progesterona durante a insuficiência ovariana ou carência ovariana completa de mulheres com diminuição da função ovariana (doação de oócitos): 200mg de progesterona micronizada do 15º ao 25º dia do ciclo, em uma dose ou divididos em duas doses de 100mg e, em seguida; do 26º dia do ciclo ou no caso de gravidez, esta dose pode ser elevada para o máximo de 600mg por dia, divididos em três doses. Esta dosagem será continuada até o 60º dia e, portanto, não deve ser administrada após a 12ª semana de gravidez. Suplementação da fase lútea durante ciclos de fertilização *in vitro* ou ICSI: A dosagem recomendada é de 600 a 800mg por dia, divididos em três ou quatro doses (6/6 ou 8/8 horas), iniciados no dia da captação ou no dia da transferência, até a 12ª semana de gravidez. Suplementação da fase lútea durante ciclos espontâneos ou induzidos, em caso de subfertilidade, ou infertilidade primária ou secundária, particularmente devido à anovulação: a dosagem recomendada é de 200 a 300mg por dia, divididos em duas doses, a partir do 16º 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 devido à insuficiência lútea: a dosagem recomendada é de 200 a 400mg por dia, divididos em duas doses, até a 12ª semana de gravidez. MS: 1.0390.0167. **VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA.** SAC 08000-250110. Para ver o texto de bula na íntegra, acesse o site [www.fqm.com.br](http://www.fqm.com.br)

Material destinado exclusivamente à classe médica.

junho/2010

**SE PERSISTIREM OS SINTOMAS, O MÉDICO DEVERÁ SER CONSULTADO.**





## FAZENDO SONHOS ACONTECEREM

A gravidez sempre é um sonho para os casais. Hoje, existe tecnologia disponível para realizar esse sonho, quando ele não acontece naturalmente.

A **Ferring** contribui para tornar o sonho da gravidez possível a todos os casais através de seus medicamentos para Reprodução Humana.

Saiba mais: [www.ferring.com.br](http://www.ferring.com.br)

I/0032/Jan10

reprodução  
Humana

FERRING



FALE FERRING  
0800 772 4656

Laboratórios Ferring - Brasil  
Pça. São Marcos, 624 - 1º andar  
05455-050 - São Paulo - Brasil  
PABX - 55 11 3024.7500

FERRING  
PHARMACEUTICALS