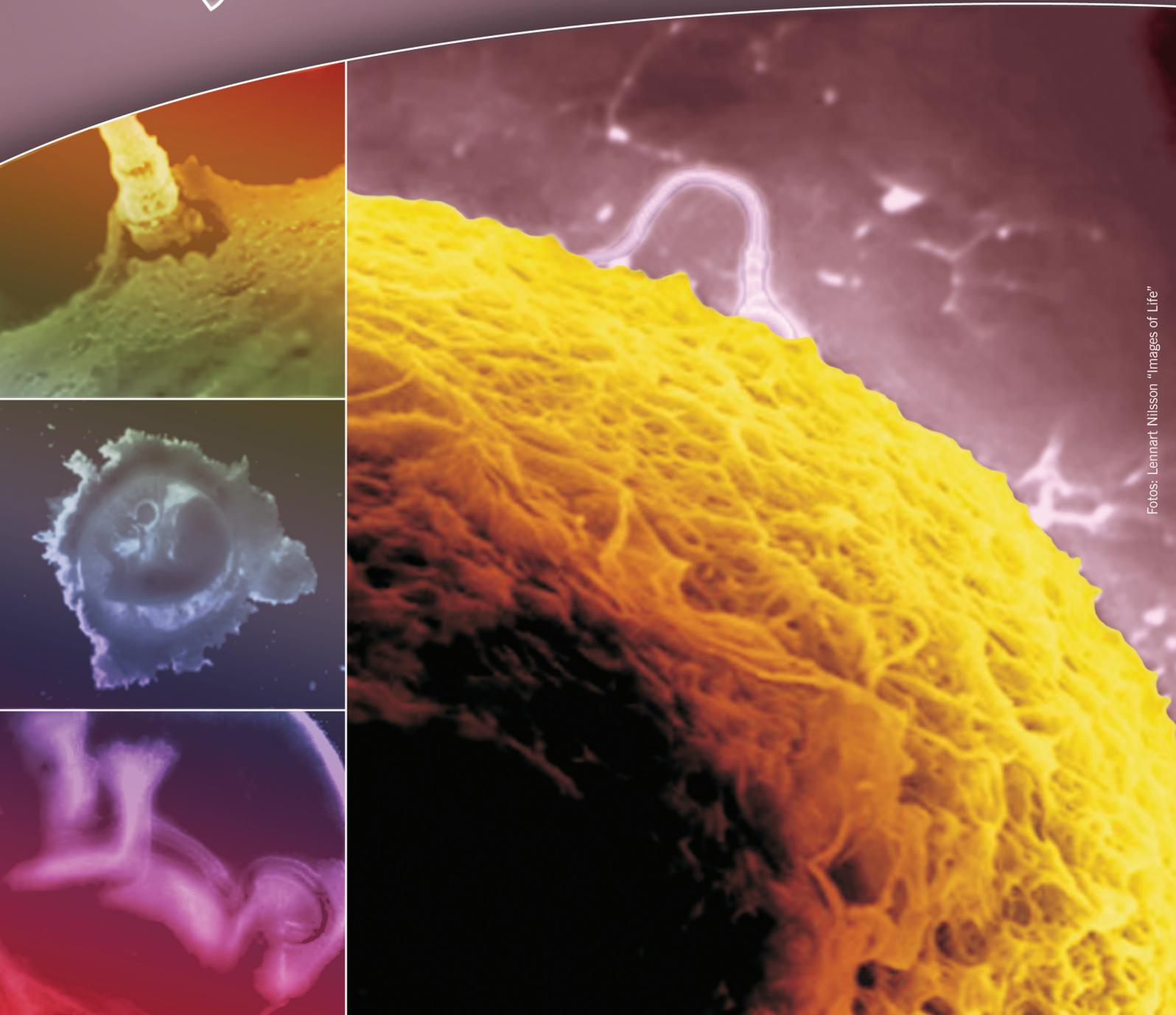


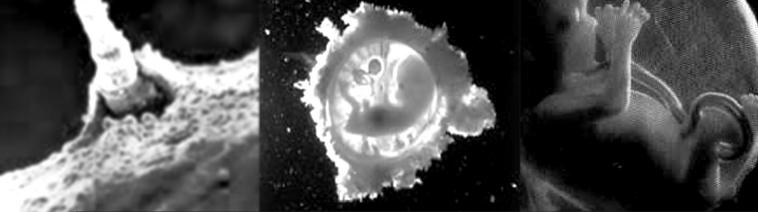
JB BRA

Volume 13 | Número 1 | Jan-Fev-Mar 2009 | ISSN 1517-5693

JORNAL BRASILEIRO DE
REPRODUÇÃO
ASSISTIDA



Fotos: Lennart Nilsson "Images of Life"



JBRA JORNAL BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA

CORPO EDITORIAL NACIONAL

Editor	Clínica	Região
Maria do Carmo Borges de Souza	G&O Barra / UFRJ	RJ
Editor Adjunto		
Paulo Franco Taitson	IRH	MG
Consultor Editorial		
José Gonçalves Franco Júnior	CRH	SP
Assistente Editorial		
Bruno B de Souza		
Editores Associados		
Edson Borges Junior	FERTILITY	SP
João Batista Alcântara Oliveira	CRH - Ribeirão Preto	SP
Selmo Geber	ORIGEN	MG
Weydson Barros Leal	UFPE	PE
Conselho editorial		
Adelino Amaral Silva	GENESIS	DF
Alessandro Schuffner	CONCEBER	PR
Alvaro Petracco	FERTILITAT	RS
Ana Cristina Allemand Mancebo	G&O BARRA	RJ
Aroldo Camargos	UFMG	MG
Bela Zausner	GENESE	BA
Bruno Scheffer	IBRA	MG
Carlos André Henriques	G&O BARRA	RJ
Claudia G. Petersen	CRH - Ribeirão Preto	SP
Condesmar Marcondes Filho	NÚCLEO REPRODUÇÃO	SP
Dirceu Mendes Pereira	PROFERT	SP
Eduardo Pandolfi Passos	SEGIR - UFRGS	RS
Elvio Tognotti	FMUSP	SP
Fabio Firmbach Pasqualotto	UCS - Conception	RS
Humberto Ikuo Shibasaki	UFMT	MT
João Pedro Junqueira Caetano	PRÓ-CRIAR/MATER DEI	MG
Joaquim Roberto Lopes	CENAFERT	BA
Jonathas Borges Soares	PROJETO ALPHA	SP

Jorge Hallak	REPROFERTY	SP
Leila Montenegro Silveira Farah	FERTILITY	SP
Lídio Jair Ribas Centa	ANDROLAB	PR
Luiz Fernando Dale	Centro de Medicina da Reprodução	RJ
Marcos Sampaio	ORIGEN	MG
Mariangela Badalotti	FERTILITAT	RS
Marilza Vieira Rudge	UNESP Botucatu	SP
Mario Cavagna	Hospital Pérola Byington	SP
Newton Eduardo Busso	UNIFERT	SP
Paulo Franco Taitson	IRH	MG
Paulo Serafini	HUNTINGTON	SP
Paulo Spinola	CEPARH	BA
Renzo Antonini Filho	Instituto de Saúde da Mulher	mg
Ricardo Melo Marinho	MATER DEI	MG
Roberta Wonchockier	Projeto Alfa	SP
Roger Abdelmassih	Clínica e Centro de Reprodução Humana	SP
Rosana Maria dos Reis	Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto	SP
Sidney Glina	Hospital Israelita Albert Einstein	SP
Silvana Chedid	CEPERH	SP

CORPO EDITORIAL INTERNACIONAL

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

Diretoria da SBRA - 2007/2008

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

Departamento de Publicações

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

Presidente: Eduardo Pandolfi Passos

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

Departamento de Publicações:

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

Comissão de Atividades Internacionais:

Marcos Sampaio
Ricardo Baruffi

Departamento Científico:

Mario Cavagna
Fabio Pasqualotto
Eduardo Motta

Comissão de Ética e Defesa de Prerrogativa:

Bela Zausner
Arthur Dzik
Lidio Jair Ribas Centa
Luiz Fernando Dale

Comissão de Educação Continuada:

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

Conselho Fiscal:

Joaquim Roberto C. Lopes
Condesmar Marcondes Filho
César
Jonathas Borges

Conselho Consultivo:

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

Comissão de Comunicação:

Paulo Franco Taitson
Lia Ferragut
César Cornel

Relações Governamentais:

Rosalv Rulli Costa
Hitomi Miura Nakagava

PGD:

Coordenador: Selmo Geber
Assumpto Iaconelli Junior
Leila Farah
Mariana Faller

DST:

Caio Parente Barbosa
Waldemar Diniz de Carvalho
Paulo Naud

Endoscopia:

Coordenador: Maria Cecilia Erthal
Paulo Beltrame
Sergio Galbinsky

Endometriose:

Coordenador: Vilmon de Freitas
Elvio Tognotti
João Pedro Junqueira

Enfermagem:

Coordenadora: Suzana Zachia
Renata Trigo
Jacqueline Aranki

Psicologia:

Coordenadora: Ana Rosa

Andrologia:

Coordenador: Edson Borges

Projetos Multicentricos:

Franco Junior

Comissão de Normatização - ANVISA e SELO SBRA

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

Endocrinologia:

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

INFORMAÇÕES GERAIS

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

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

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

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

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

6. Artigos de pesquisas clínicas (*clinical trials*) devem ser registrados em um dos Registros de 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, www.clinicaltrials.gov, www.ISRCTN.org, www.umin.ac.jp/ctr/index/htm e www.trialregister.nl). O número de identificação do estudo deverá ser apresentado ao final do resumo.

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

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

TIPOS DE ARTIGOS PUBLICADOS

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

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

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

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

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

PREPARAÇÃO DOS ORIGINAIS

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

Síglas devem ser definidas por extenso na primeira ocorrência no texto; após a primeira ocorrência, somente a sigla deverá ser utilizada. No resumo, o uso de siglas deve ser evitado.

Substâncias devem ser apresentadas utilizando seu nome genérico. Se relevante, o nome comercial da substância e o fabricante podem ser informados entre parênteses.

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

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

PÁGINA DE ROSTO

A página de rosto deve conter:

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

RESUMO E ABSTRACT

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

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

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

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

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

1. Artigo de periódico

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

2. Livro

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

3. Capítulo de livro

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

4. Artigo de revista eletrônica

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

5. Artigo publicado na Internet:

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

6. Site

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

7. Software

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

TABELAS E FIGURAS

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

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

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

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

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

Gráficos devem ser apresentados somente em duas dimensões.

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

ENVIO/SUBMISSÃO DE ARTIGOS

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

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

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

Editorial
CURITIBA recebe o XIII Congresso da SBRA

Dr. Lídio Jair Ribas Centa
 10

Artigo Original
Estudo comparativo entre meio GV e IVFTM no cultivo de embriões.

Carlos Gilberto Almodin, Vania Cibele Minguetti Câmara, Condesmar Oliveira Marcondes, Raul Nakano, Alvaro Pigatto Ceschini
 11

Comparação de resultados obtidos com uma nova técnica de vitrificação de blastocistos e com o congelamento lento de embriões no segundo e terceiro dias de cultivo.

Leonardo Augusto Meyer de Moraes, Luciana Pompermayer Teodoro de Aguiar, Rívia Mara Lamaita, Ricardo Mello Marinho, João Pedro Junqueira Caetano
 16

Relação entre dia de transferência e qualidade embrionária com taxas de gravidez.

Paula Andréa Sampaio de Vasconcelos, Ingridi de Souza Sene, Galgânia Nolêto Silva Sousa, Braulio Fernandes de Carvalho, André Luiz Eigenheer da Costa
 20

Correlação entre a taxa de fertilização e o fuso meiótico em oócitos humanos: uma meta-análise.

Claudia Guilhermino Petersen, João Batista Alcantara Oliveira, Ana Lucia Mauri, Fabiana C Massaro, Ricardo Baruffi, Anagloria Pontes, José Gonçalves Franco Jr
 25

Artigo de opinião
A summary for members of ASRM

Robert W. Rebar, M.D.
 30

Artigo de Atualização
O impacto da adenomiose na infertilidade

Haydée Castro Neves dos Santos, Cláudio Crispi
 34

Eventos

..... 40

Curitiba recebe o XIII Congresso da SBRA

Durante o Congresso Brasileiro de Reprodução Assistida, realizado em agosto de 2008, em São Paulo, a SBRA escolheu a cidade de Curitiba para sediar o XIII Congresso Brasileiro de Reprodução Assistida, o qual será realizado de 27 a 29 de agosto de 2009.

Temos certeza que, como nos congressos anteriores, o de Curitiba também dará uma contribuição decisiva no sentido de permitir que, colegas de todo o país e de países vizinhos, possam rever e aprender desde os conceitos básicos até as mais recentes descobertas científicas e tecnológicas destinadas a traduzir em realidade a esperança de casais inférteis que buscam o sonho de gerar um filho através da evolução da Medicina. Para isso, toda a Comissão Organizadora do Congresso sabe que tem imensa responsabilidade. E é por isso que não vem medindo esforços com o objetivo de elaborar uma criteriosa e selecionada programação científica, com rico conteúdo científico.

Além de importantes convidados nacionais, o Congresso de Curitiba será pontuado especialmente, pela presença de renomados convidados internacionais. Entre eles, já confirmaram presença: Dr. Renato Fanchin (França), Dr. Klaus Wiemer (EUA), Dr. Patrick Quinn (EUA), Dra. Wana Popal (EUA).

Levando em conta o perfil multidisciplinar do Congresso, estamos empenhados, da mesma forma, em reunir os mais experientes profissionais das diversas áreas envolvidos com a problemática dos casais inférteis. Esses e outros temas serão abordados por meio de cursos pré-congresso, conferências e mesas redondas. E poderão ser apresentados, igualmente, através de pôsteres e trabalhos orais.

Temos, além desses motivos, mais razões para acreditar que nosso Congresso será um sucesso. Um deles diz respeito ao local onde será realizado: o Estação Embratel Convention Center, um moderno e espaçoso complexo, que foi considerado entre 2005 e 2007 como o melhor centro de convenções do Brasil. O outro é nossa cidade.

Curitiba é uma cidade com mais de 2 milhões de habitantes, e excelente infra-estrutura, que teve seu desenvolvimento fortemente influenciado pela imigração italiana, alemã, polonesa, árabe entre outras. Essa diversidade se mantém presente na gastronomia, religião, arquitetura e nos costumes da cidade - fatores que a fizeram receber, em 2003, o título de Capital Americana da Cultura. Modelo de desenvolvimento urbano para o mundo, Curitiba é uma cidade com extensa área verde, além de famosos atrativos turísticos.

Agende-se que Curitiba e o Congresso Brasileiro de Reprodução Assistida o aguardam de braços abertos.

Dr. Lídio Jair Ribas Centa

Presidente do XIII Congresso Brasileiro
de Reprodução Assistida

Estudo comparativo entre meio GV e IVF™ no cultivo de embriões

Comparative study between GV and IVF media for embryo culture

Carlos Gilberto Almodin ¹, Vania Cibele Minguetti Câmara ¹, Condesmar Oliveira Marcondes ², Raul Nakano ³, Alvaro Pigatto Ceschini ⁴

1- Materbaby Reprodução Humana – Maringá – PR.

2- Nucleo de Reprodução Humana – Santos – SP

3- Ferticlin – São Paulo – SP

4- Feliccita- Reprodução Humana – Curitiba – PR.

Trabalho realizado na Materbaby Reprodução Humana - Maringá – PR.

RESUMO

Objetivo: Comparar a taxa de fertilização, desenvolvimento embrionário, gestação e implantação na utilização de meios de cultivo GV e IVF.

Pacientes e métodos: Dos 46 ciclos iniciados, 32 tiveram ovócitos cultivados tanto em meio IVF™ quanto em meio GV com 10% de SSS (Grupo I). Os outros 14 ciclos utilizaram apenas o meio IVF™ (Grupo II). No grupo I, dos 190 ovócitos fertilizados, 96 foram colocados em IVF™ e 94 em meio GV com 10% de SSS.

Resultados: A taxa de fertilização no grupo I foi de 81%, sendo que 83% dos embriões tinham mais de 6 células e 56% destes tinham menos de 20% de fragmentação no terceiro dia pós-fertilização. No grupo II a taxa de fertilização foi de 81%, sendo que 82% dos embriões tinham mais de 6 células e 62% tinham menos de 20% de fragmentação no terceiro dia pós-fertilização. A taxa de implantação e gestação foi similar em ambos os grupos.

Conclusão: Não houve diferença estatística entre a utilização dos meios IVF ou GV no cultivo de embriões.

Palavras-chave: fertilização *in-vitro*, cultura, meios de cultivo

ABSTRACT

Objective: The aim of this paper was to compare fertilization, embryo development, pregnancy and implantation rates when embryo culture with GV or IVF media is used.

Patients and methods: From 46 initiated cycles, 32 had oocytes cultured either with IVF™ or GV medium with SSS 10% (Group I). The other 14 cycles were cultured with

IVF™ medium (Group II). In Group I, 190 oocytes were obtained, among which 96 were cultured in IVF™ and 94 in GV medium with SSS 10%. In Group II, 56 oocytes obtained that were culture in IVF™ medium.

Results: Among 190 oocytes from Group I, 154 developed into embryos (81%), and in Group II, from 56 oocytes, 45 developed into embryos (80%). In Group I 128 embryos (83%) had more than 6 cells on day three after fertilization, and 86 embryos (56%) had less than 20% of fragmentation. In Group II, 37 embryos (82%) had more than 6 cells on day three after fertilization and 28 embryos (62%) had less than 20% of fragmentation. The pregnancy and implantation rates were similar for both groups.

Conclusion: There were no statistically significant differences in the use of IVF or GV media for embryo culture.

Keywords: *In vitro*-fertilization, culture, culture media

INTRODUÇÃO

A insatisfação dos serviços de Reprodução Humana com relação às taxas de gestação obtidas tem mantido pesquisas entre as várias etapas da fertilização *in-vitro*. Os meios de cultivos têm sido avaliados e modificados exaustivamente com o intuito de melhorar estas taxas. Nos primórdios deste tipo de tratamento o interesse inicial foi identificar as substâncias na composição dos meios que pudessem ter algum efeito deletério (Nagata *et al.* 1993; Bastias *et al.* 1993) e, ao mesmo tempo avaliar possíveis componentes que poderiam melhorar o cultivo (Adler *et al.* 1993; Pool and Martin 1994). A manutenção dos embriões em laboratório que a princípio era de dois

dias tem sido estendida para três e até cinco dias na tentativa de que os meios pudessem ajudar a selecionar os melhores embriões e melhorar o sincronismo com o endométrio (Tucker *et al.* 1996; Desai *et al.* 1996; Yeung *et al.* 1992). A fonte protéica que era obtida de soro de cordão umbilical, passou a ser obtida do soro de sangue periférico da mãe, depois optou-se pelo uso do soro sintético e atualmente, pela soro albumina humana (Hargreaves *et al.* 1995; Weathersbee *et al.* 1995; Yeung *et al.* 1992; Zhang *et al.* 2007; Check *et al.* 1995; Jee *et al.* 2008; Check *et al.* 1995). A mensuração de substâncias produzidas pelo embrião tem sido utilizada também com intuito de entender melhor as necessidades metabólicas destes (Check *et al.* 1995; Best *et al.* 1994; Yeung *et al.* 1992; Vergouw *et al.* 2008; Check *et al.* 1995). O cultivo dos embriões com outro tipo celular tem sido aplicado por vários centros na busca de melhoria nas condições de cultura (Johnson *et al.* 2007; Koivisto *et al.* 2004; Spandorfer *et al.* 2004; Fabbri *et al.* 2000; Check *et al.* 1995). Entretanto, a avaliação comparativa entre os vários meios (Lane and Gardner 2007; Aoki *et al.* 2005; Oatway *et al.* 2004; Gardner 2000; Ben Yosef *et al.* 2001; Van Langendonck *et al.* 2001; Schoolcraft and Gardner 2001; Check *et al.* 1995) não tem levado à consenso quanto à melhor formulação. Apesar de todas as modificações nenhum meio de cultivo tem oferecido taxas de gestação significativamente diferentes. No entanto, há consenso de que as condições de armazenagem, transporte e ambiente de cultivo são essenciais para termos bons resultados. (Lane *et al.* 2008; Lane and Gardner 2007; Gardner *et al.* 2005; Aoki *et al.* 2005; Mikkelsen 2005; Gardner 2000; Van Langendonck *et al.* 2001; Check *et al.* 1995). O objetivo deste trabalho é comparar os resultados obtidos no cultivo de embriões com meio desenvolvido no Brasil e meio importado já consagrado no mercado.

MATERIAIS E MÉTODO

Pacientes

Este estudo envolveu pacientes com idade entre 25 a 41 anos, durante o período de abril a setembro de 2008, que procuraram o serviço de reprodução assistida da Materbaby-Reprodução Humana, e após avaliação tiveram indicação de tratamento com fertilização *in-vitro*. As pacientes que concordaram em participar do estudo receberam consentimento esclarecido e informado, e foram randomizadas em dois grupos: aquelas que tiveram metade de seus embriões cultivados em meio GV (Ingamed, Maringá, Brasil), e a outra metade no meio IVF™ (Vitrolife, Kungsbacka, Sweden), escolhidos aleatoriamente – Grupo I, e aquelas cujos embriões foram cultivados somente no meio IVF™ – Grupo II.

A hiperestimulação ovariana das pacientes foi iniciada com o bloqueio hipofisário com acetato de leuprolide (Lupron; TAP Pharmaceutical, Abbot Laboratories, Chicago, U.S.A.), como agonista de GnRH (0,15 ml/dia), iniciado entre o vigésimo primeiro ao vigésimo terceiro dia do ciclo menstrual até o início da menstruação seguinte. No segundo dia da menstruação o acetato de

leuprolide era reduzido para 0,05 ml/dia, e iniciava-se o FSH recombinante (Gonal®, Serono) em dose que variou de 150 a 300UI/dia, a critério clínico, por no mínimo sete dias. O crescimento folicular foi monitorado pelo ultrassom endovaginal e gonadotrofina coriônica humana (HCG; 10.000 IU; Choriomon; Meizler-São Paulo) foi administrada quando pelo menos três folículos com pelo menos 20 mm de diâmetro foram observados.

Fertilização *in-vitro* e cultivo embrionário

Os ovócitos foram aspirados 34-36 horas após a injeção de HCG usando punção ovariana transvaginal guiada por ultra-som. Os ovócitos colhidos foram lavados em D-PBS (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY, U.S.A.) e transferidos para placas contendo meio de cultura destinados a cada grupo e mantidos em incubadora (Forma modelo 3159) a 37°C, com atmosfera contendo 5,5% de CO₂ e umidade de 97%.

O sêmen foi preparado através de gradiente descontínuo "SpermGrad™" (55 / 90%; Vitrolife, Kungsbacka, Sweden). Nos casos de infertilidade por fator masculino os ovócitos foram submetidos à injeção intra-citoplasmática de espermatozoides (ICSI). Tal procedimento foi realizado 3 a 6 horas após a coleta dos ovócitos, quando estes eram desnudados com o auxílio de hialuronidase (Irvine Scientific, USA). Nos casos onde os parâmetros do sêmen eram considerados normais, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, foi realizada a inseminação dos ovócitos com 100.000 espermatozoides/ml.

Foi utilizado microscópio invertido Diaphot 300 (Nikon, Japan) para ICSI, com contraste de fase Hoffman, sob aumento de 400X. O microscópio foi equipado com micromanipuladores hidráulicos MMO-204D e injetores IM6 (Narishige, Tokyo, Japan). O procedimento iniciava-se com a identificação, imobilização e aspiração de um único espermatozoide de uma gota de polivinilpirrolidona a 10% (Irvine Scientific, U.S.A.). O espermatozoide era, então, injetado no oócito, mantido preso por uma pipeta de sustentação.

No grupo I, depois da micro-manipulação os oócitos injetados foram colocados em gotas de 50 µl de meio de cultivo sob óleo mineral. A metade dos oócitos injetados foi colocada em meio IVF™ e a outra metade em meio GV com 10% de soro sintético (SSS, Irvine Scientific, U.S.A.). Quando havia número ímpar de oócitos injetados, o meio IVF™ ficava com um oócito a mais. A escolha dos pré-embriões colocados em cada meio foi aleatória, resultando em número diferente de embriões em cada meio após observação da fertilização com 24 horas. No grupo II, as pacientes tiveram todos os oócitos colocados em meio IVF™.

Quando se optou pela inseminação dos oócitos, no grupo I, tal procedimento foi realizado em metade dos oócitos no meio IVF™ e metade no meio GV aleatoriamente. Quando havia número ímpar de oócitos, o meio IVF™ ficava com um oócito a mais. Após 18 a 22 horas, quando a fertilização era verificada, os embriões em pró-núcleo foram transferidos para os mesmos meios frescos em micro-gota. Nas pacientes do grupo II, a fertilização de todos os oócitos foi realizada em meio IVF™ e os pré-embriões transferidos para o mesmo meio fresco quando era checada a fertilização.

Em todos os ciclos onde mais que seis oócitos foram obtidos, apenas seis foram fertilizados, sendo o restante criopreservado pelo método de vitrificação (Kuwayama, 2005).

A fase lútea foi suplementada com 50 mg/dia de progesterona injetável, iniciando no dia da captação oocitária. A dosagem do β -hCG (gonadotrofina coriônica subunidade beta) foi realizada no 14º dia após a transferência dos embriões. A taxa de implantação foi definida somente após batimento cardíaco presentes após a 13ª semana pós-transferência.

A significância estatística foi estimada usando o teste do χ^2 . Adotou-se o nível de significância de 0,05% ($\alpha = 5\%$). Níveis descritivos (P) inferiores a esse valor foram considerados significantes.

RESULTADOS

Dos 46 ciclos iniciados, 32 tiveram ovócitos cultivados tanto em meio IVF™ quanto em meio GV com 10% de SSS (Grupo I). Os outros 14 ciclos utilizaram apenas o meio IVF™ na fertilização *in-vitro* (Grupo II). Os resultados de taxas de fertilização, clivagem, qualidade embrionária, implantação e gravidez clínica encontram-se na Tabela I, não tendo sido encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os 2 grupos, em nenhuma das variáveis avaliadas. Dos 190 ovócitos fertilizados no grupo I, 154 apresentavam 2 pró-núcleos 18 a 22 hs após a fertilização (81% de fertilização) e no grupo II dos 56 ovócitos fertilizados, 45 tinham 2 pró-núcleos (80% de fertilização). No grupo I foram cultivados 154 embriões, destes 128 tinham 6 ou mais células (83%) e 86 tinham 20% ou menos de fragmentação (56%). No grupo II foram cultivados 45 embriões, sendo que 37 tinham 6 ou mais células (82%) e 28 tinham 20% ou menos de fragmentação (62%). O número médio de células dos embriões no dia 3 de desenvolvimento do grupo I foi 6,95 e no grupo II 6,71. Dos 32 ciclos iniciados no grupo I, 16 engravidaram (50%). Destas 16, 1 abortou (6,2%). Dos 130 embriões transferidos, 21 implantaram (16% de implantação), e no grupo II dos 40 embriões transferidos, 10 implantaram (24%) de implantação.

No grupo I, dos 190 oócitos fertilizados, 96 foram colocados em IVF™ e 94 em meio GV com 10% de SSS. Dos 96 ovócitos colocados em IVF™ para fertilização, 83 tinham pró-núcleo 18 a 22 hs após (86% de fertilização) e do 94 colocados em GV, em 71 foi observado 2 pró-núcleos (76% de fertilização). Apesar de não ser significativa, a comparação entre os meios quanto à fertilização mostrou resultado marginalmente significativo ($p = 0,0055$), indicando uma tendência de a taxa de fertilização do meio IVF ser maior do que a do meio GV. Os embriões também foram avaliados quanto ao número de células e fragmentação, não sendo evidenciada diferença estatisticamente significativa na qualidade embrionária (tabela II). No meio IVF™ foram cultivados 83 embriões, destes 70 tinham 6 ou mais células (84%) e 46 tinham 20% ou menos de fragmentação (55%). Dos 71 embriões cultivados em GV, 58 tinham 6 ou mais células (82%) e 40 tinham 20% ou menos de fragmentação (56%). O número médio de células dos embriões no dia 3 de desenvolvimento do IVF™ foi 7,05 e no GV 6,83.

Tabela I

Parâmetros	GRUPO I	GRUPO II	P
N. de ciclos	32	14	---
Média de idade \pm DP	33,4 \pm 4,7	34,2 \pm 3,7	0,585
N. de oócitos fertilizados	190	56	---
Fertilização (%)	154 (81%)	45 (80%)	0,368
N. embriões cultivados	154	45	---
N. de células (média \pm DP)	6,94 \pm 2,04	6,71 \pm 1,86	
\geq 6 células D3 (%)	128 (83%)	37 (82%)	0,795
\leq 20% fragmentação (%)	86 (56%)	28 (62%)	0,560
N. embriões transferidos	132	42	---
Gravidez clínica (%)	16 (50%)	07 (50%)	1,000
Aborto (%)	01 (6,2%)	0	1,000
Implantação (%)	21 (16%)	10 (25%)	0,205

Nas comparações entre os grupos I e II não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre eles em nenhuma das variáveis analisadas ($p > 0,05$ em todas as análises).

Tabela II

Parâmetros	IVF	GV	P
N. oócitos fertilizados	96	94	---
Fertilização (%)	83 (86%)	71 (76%)	0,190
N. embriões cultivados	83	71	---
N. de células (média \pm DP)	7,05 \pm 1,98	6,83 \pm 2,11	
\geq 6 células D3 (% de embriões)	70 (84%)	58 (82%)	0,587
\leq 20% fragmentação (% de embriões)	46 (55%)	40 (56%)	0,909

Nas comparações entre os meios IVF e GV não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre eles em nenhuma das variáveis analisadas ($p > 0,05$ em todas as análises).

DISCUSSÃO

Há poucas publicações recentes comparando os diferentes tipos de meios de cultivo embrionário disponíveis, e ainda não há consenso quanto às melhores condições de cultura quanto aos nutrientes para o embrião. Este estudo comparou os resultados da utilização de 2 meios de cultivo até o dia 3 de desenvolvimento embrionário, pois, apesar de a transferência em estágio de blastocisto ainda ser uma boa alternativa para selecionar o melhor embrião a ser transferido, hoje já não é uma boa alternativa para diminuir o número de embriões a serem transferidos. Com os avanços nas técnicas de criopreservação, atualmente é uma boa opção a vitrificação de ovócitos, pois evita os problemas éticos relacionados ao congelamento de

embriões, além de diminuir o número de embriões a serem transferidos.

O embrião, após o terceiro dia de desenvolvimento, já no período pós-compactação aumenta as taxas de biossíntese, assim como a capacidade respiratória. Durante a compactação ocorre a formação do primeiro epitélio de transporte do conceito, quando o embrião é capaz de controlar o gradiente iônico ativamente e regular seu meio interno. Assim, como o metabolismo torna-se mais complexo a partir desse estágio, supõe-se que também as exigências em termos de nutrientes o sejam. Muito se tem estudado em relação às exigências metabólicas dos embriões após esse período, mas, infelizmente os meios de cultura disponíveis até o momento para tal finalidade, conseguem que menos da metade dos embriões acabem chegando ao estágio de blastocisto, inclusive em muitos casos a paciente não tem nenhum embrião a ser transferido nesse estágio. (Gardner and Lane 2005)

Uma das mais polêmicas discussões com relação aos meios de cultura até o momento é quanto à concentração de glicose e, ao tipo de suplementação protéica, com albumina ou soro sintético. Foi utilizado nesse estudo o meio GV com soro sintético e altas taxas de glicose (5,5 mM), enquanto o meio IVF™ tem soro albumina humana (HSA) e baixa taxa de glicose em sua composição. Não observamos diferenças na qualidade embrionária, entre os dois meios, nem na taxa de gravidez ou implantação. O efeito deletério da glicose não foi observado, já que as taxas de gravidez e implantação não foram diferentes entre os grupos.

Houve uma menor taxa de fertilização, porém não significativa, quando se usou o meio GV. Nos casos de FIV com IVF™ a taxa de fertilização foi 82% e nos casos com GV a taxa foi 74%. Isso leva a acreditar que a diminuição da glicose no meio não afeta a fertilização, mesmo através da inseminação, pois houve menor fertilização no meio com alta concentração de glicose (GV).

Na década passada vários autores concluíram que o uso de soro sintético era mais eficiente que o uso de albumina em promover o desenvolvimento embrionário e implantação (Hargreaves *et al.* 1995; Weathersbee *et al.* 1995), entretanto, poucos estudos recentes comparando a utilização de HSA ou soro sintético no cultivo de embriões *in-vitro* tem sido relatados. Gómez ; Diez (2000), concluíram que o efeito da glicose sobre o desenvolvimento *in-vitro*, depende da fonte de proteína. Não houve diferença entre o uso dos dois suplementos, mas nenhuma conclusão pode-se ter, devido ao fato de terem sido usados em meio diferentes. Mais estudos serão necessários, trocando o suplemento dos dois meios.

Em conclusão, não foi observado diferença entre os dois meios de cultivo embrionário em estudo, porém, o fato de termos um meio fabricado no Brasil, deve ser levado em consideração quando pensamos na facilidade de se adquirir e armazenar o produto. É necessário que outros estudos sejam realizados, principalmente para verificar a possibilidade de haver maior estabilidade nos resultados, já que os problemas inerentes à importação não existirão.

Endereço para correspondência:

Carlos Gilberto Almodin
Materbaby – Reprodução Humana
Av. XV de Novembro, 1232
CEP: 97 013 230 e-mail: almodin@materbaby.com.br
Maringá – PR.

Referências bibliográficas:

- Adler A, Reing AM, Bedford JM, Alikani M, Cohen J (1993) Plasmanate as a medium supplement for in vitro fertilization. *J.Assist.Reprod.Genet.* **10**, 67-71.
- Aoki VW, Wilcox AL, Peterson CM, Parker-Jones K, Hatasaka HH, Gibson M, Huang I, Carrell DT (2005) Comparison of four media types during 3-day human IVF embryo culture. *Reprod.Biomed. Online.* **10**, 600-606.
- Bastias MC, McGee-Belser ST, Bryan SH, Vasquez JM (1993) In vitro deleterious effect of hypoxanthine in Ham's Nutrient Mixture F-10 culture medium on human oocyte fertilization and early embryonic development. *Fertil.Steril.* **60**, 876-880.
- Ben Yosef D, Yovel I, Schwartz T, Azem F, Lessing JB, Amit A (2001) Increasing synthetic serum substitute (SSS) concentrations in P1 glucose/phosphate-free medium improves implantation rate: a comparative study. *J.Assist.Reprod.Genet.* **18**, 588-592.
- Best CL, Pudney J, Anderson DJ, Hill JA (1994) Modulation of human granulosa cell steroid production in vitro by tumor necrosis factor alpha: implications of white blood cells in culture. *Obstet.Gynecol.* **84**, 121-127.
- Check JH, Bollendorf A, Askari HA (1995) Evidence for a leukocyte adhesion factor produced by the early embryo. *Am.J.Reprod. Immunol.* **34**, 20-25.
- Desai NN, Sheehan LA, Martin D, Gindlesperger V, Austin CM, Lisbonna H, Peskin B, Goldfarb JM (1996) Clinical experience with synthetic serum substitute as a protein supplement in IVF culture media: a retrospective study. *J.Assist.Reprod.Genet.* **13**, 23-31.
- Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Primavera MR, Cecconi S, Nottola SA, Motta PM, Venturoli S, Flamigni C (2000) Human embryo development and pregnancies in an homologous granulosa cell coculture system. *J.Assist.Reprod.Genet.* **17**, 1-12.
- Gardner DK (2000) Blastocyst culture: toward single embryo transfers. *Hum.Fertil.(Camb.)* **3**, 229-237.
- Gardner DK, Lane M (2005) Ex vivo early embryo development and effects on gene expression and imprinting. *Reprod.Fertil. Dev.* **17**, 361-370.
- Gardner DK, Reed L, Linck D, Sheehan C, Lane M (2005) Quality control in human in vitro fertilization. *Semin.Reprod.Med.* **23**, 319-324.
- Hargreaves CA, Rahman F, Cowan D, Santis M, Keefe T, Howell RJ, Chard T, Homa ST (1995) Serum is more effective than albumin in promoting human embryo development and implantation. *Fertil.Steril.* **64**, 1162-1166.
- Jee BC, Han SH, Moon JH, Suh CS, Kim SH (2008) Influence of well defined protein source on in vitro maturation of human oocyte: human follicular fluid versus human serum albumin. *Fertil.Steril.* **89**, 348-352.
- Johnson JE, Higdon Iii HL, Boone WR (2007) Effect of human granulosa cell co-culture using standard culture media on the maturation and fertilization potential of immature human oocytes. *Fertil.Steril.*
- Koivisto H, Hyvarinen M, Stromberg AM, Inzunza J, Matilainen E, Mikkola M, Hovatta O, Teerijoki H (2004) Cultures of human embryonic stem cells: serum replacement medium or serum-containing media and the effect of basic fibroblast growth factor. *Reprod.Biomed.Online.* **9**, 330-337.
- Lane M, Gardner DK (2007) Embryo culture medium: which is the best? *Best.Pract.Res.Clin.Obstet.Gynaecol.* **21**, 83-100.
- Lane M, Mitchell M, Cashman KS, Feil D, Wakefield S, Zander-Fox DL (2008) To QC or not to QC: the key to a consistent

laboratory? *Reprod.Fertil.Dev.* **20**, 23-32.

Mikkelsen AL (2005) Strategies in human in-vitro maturation and their clinical outcome. *Reprod.Biomed.Online.* **10**, 593-599.

Nagata Y, Yoshimitsu K, Shirakawa K (1993) [A quality control for the culture system using endotoxin assays in human in vitro fertilization and embryo transfer]. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* **45**, 220-226.

Oatway C, Gunby J, Daya S (2004) Day three versus day two embryo transfer following in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Cochrane.Database.Syst.Rev.* CD004378.

Pool TB, Martin JE (1994) High continuing pregnancy rates after in vitro fertilization-embryo transfer using medium supplemented with a plasma protein fraction containing alpha and beta-globulins. *Fertil.Steril.* **61**, 714-719.

Schoolcraft WB, Gardner DK (2001) Blastocyst versus day 2 or 3 transfer. *Semin.Reprod.Med.* **19**, 259-268.

Spandorfer SD, Pascal P, Parks J, Clark R, Veeck L, Davis OK, Rosenwaks Z (2004) Autologous endometrial coculture in patients with IVF failure: outcome of the first 1,030 cases. *J.Reprod.Med.* **49**, 463-467.

Tucker KE, Hurst BS, Guadagnoli S, Dymecki C, Mendelsberg B,

Awoniyi CA, Schlaff WD (1996) Evaluation of synthetic serum substitute versus serum as protein supplementation for mouse and human embryo culture. *J.Assist.Reprod.Genet.* **13**, 32-37.

Van Langendonck A, Demylle D, Wyns C, Nisolle M, Donnez J (2001) Comparison of G1.2/G2.2 and Sydney IVF cleavage/blastocyst sequential media for the culture of human embryos: a prospective, randomized, comparative study. *Fertil.Steril.* **76**, 1023-1031.

Vergouw CG, Botros LL, Roos P, Lens JW, Schats R, Hompes PG, Burns DH, Lambalk CB (2008) Metabolomic profiling by near-infrared spectroscopy as a tool to assess embryo viability: a novel, non-invasive method for embryo selection. *Hum.Reprod.* **23**, 1499-1504.

Weathersbee PS, Pool TB, Ord T (1995) Synthetic serum substitute (SSS): a globulin-enriched protein supplement for human embryo culture. *J.Assist.Reprod.Genet.* **12**, 354-360.

Yeung WS, Ho PC, Lau EY, Chan ST (1992) Improved development of human embryos in vitro by a human oviductal cell co-culture system. *Hum.Reprod.* **7**, 1144-1149.

Zhang ZG, Zhao JH, Wei ZL, Cong L, Zhou P, Cao YX (2007) Human umbilical cord blood serum in culture medium on oocyte maturation In vitro. *Arch.Androl* **53**, 303-307.

2009 Congresso Brasileiro De Reprodução Assistida

Agosto de 2009 Curitiba, PR

Comparação de resultados obtidos com uma nova técnica de vitrificação de blastocistos e com o congelamento lento de embriões no segundo e terceiro dias de cultivo

Comparing the results obtained with a new blastocysts vitrification technique and with slow freezing of day 2 and day 3 embryos

Leonardo Augusto Meyer de Moraes, Luciana Pompermayer Teodoro de Aguiar, Rívia Mara Lamaita, Ricardo Mello Marinho, João Pedro Junqueira Caetano

Clínica Pró-Criar / Mater Dei – Belo Horizonte, Brasil

Estudo realizado na Clínica Pró-Criar / Mater Dei (www.pro-criar.com.br)

Estudo apresentado no 33º Congresso Mineiro de Ginecologia e Obstetrícia / 14º Congresso de Ginecologia e Obstetrícia da Região Sudeste da FEBRASGO.
Juiz de Fora, MG – 3 a 5 de setembro de 2008

RESUMO

Objetivo: comparar os resultados obtidos através de uma nova técnica de vitrificação de blastocistos com utilização de palhetas convencionais aos resultados obtidos com o congelamento lento de embriões no segundo e terceiro dias de cultivo.

Métodos: cinquenta e dois ciclos de vitrificação e desvitrificação de blastocistos, os quais resultaram em 43 transferências (grupo 1), e 60 ciclos de congelamento lento e descongelamento de embriões no segundo e terceiro dias de cultivo, os quais resultaram em 51 transferências (grupo 2), foram realizados na Clínica Pró-Criar / Mater Dei no período de janeiro de 2005 a dezembro de 2007. As 94 transferências resultantes de blastocistos vitrificados ou de embriões congelados foram analisadas retrospectivamente.

Resultados: as taxas de implantação e gravidez foram significativamente superiores no grupo 1 (34,7% e 48,8%) em relação ao grupo 2 (10,7% e 17,6%). Não houve diferença estatisticamente significativa com relação às taxas de implantação e gravidez de blastocistos vitrificados no quinto ou sexto dia de cultivo. Também não houve diferença entre as taxas de implantação e gravidez de embriões congelados no segundo ou terceiro dia de desenvolvimento.

Conclusão: esta nova técnica de vitrificação de blastocistos descrita no presente estudo apresentou bons resultados de sobrevida, implantação e gestação quando comparada à técnica de congelamento lento de embriões no segundo e terceiro dias de cultivo. Estudos prospectivos se fazem necessários para se confirmar a superioridade dessa nova técnica.

Palavras-chave: vitrificação, blastocisto, fertilização in vitro, criopreservação, congelamento lento.

ABSTRACT

Objective: compare the results of a new blastocysts vitrification technique using conventional straws with the results of day 2 and day 3 embryos slow freezing.

Methods: fifty-two cycles of blastocysts vitrification and warming, which resulted in 43 transfers (group 1), and 60 cycles of day 2 and day 3 embryos slow freezing and thawing, which resulted in 51 transfers (group 2), were done at Pró-Criar / Mater Dei Clinic in the period of January 2005 to December 2007. These 94 transfers of vitrified blastocysts or frozen embryos had been analyzed retrospectively.

Results: the implantation and pregnancy rates were significantly higher in group 1 (34.7% and 48.8%) compared to group 2 (10.7% and 17.6%). There was no statistically significant difference of pregnancy and implantation rates between blastocysts vitrified in the fifth or sixth day. Also there was no difference of pregnancy and implantation rates between frozen embryos in the second or third day of development.

Conclusion: this new blastocysts vitrification technique described in this study showed good results of survive, implantation and pregnancy compared to the technique of slow freezing of embryos in the second and third days of culture. Prospective studies are needed to confirm the superiority of this new technique.

Keywords: vitrification, blastocyst, in vitro fertilization, cryopreservation, slow freezing.

INTRODUÇÃO

O congelamento de embriões é um procedimento amplamente utilizado por clínicas de reprodução assistida em todo o mundo. A principal indicação consiste

no armazenamento dos embriões excedentes obtidos através de um ciclo de fertilização *in vitro* (FIV) que não foram transferidos, possibilitando uma nova tentativa de gravidez. Por outro lado, o congelamento de todos os embriões produzidos em um ciclo de FIV estaria indicado quando a paciente desenvolve a síndrome de hiperestímulo ovariano (SHO) ou nos casos de risco de perda da função reprodutiva como, por exemplo, antes de um tratamento quimioterápico.

Entretanto, apesar de ser utilizado há mais de duas décadas (Trounson & Mohr, 1983), o congelamento de embriões ainda não apresenta os mesmos resultados obtidos com a transferência de embriões a fresco. O principal problema se refere à formação de cristais de gelo intracelulares, os quais podem levar ao rompimento de blastômeros e comprometimento da viabilidade embrionária.

A técnica mais utilizada é a de congelamento lento, mas estudos recentes vêm demonstrando bons resultados obtidos através da vitrificação de embriões, particularmente em estágio de blastocisto (Choi et al., 2000; Yokota et al., 2001; Reed et al., 2002; Mukaida et al., 2003; Son et al., 2003; Hiraoka et al., 2004; Takahashi et al., 2005; Liebermann & Tucker, 2006). A técnica de vitrificação é bem mais simples e rápida em comparação ao congelamento lento, pois os embriões são imersos diretamente no nitrogênio líquido após curto período de exposição aos crioprotetores. Nesse caso, são utilizadas concentrações mais altas de crioprotetores, com intuito de evitar a formação de cristais de gelo intracelulares.

Entretanto, blastocistos humanos apresentam baixa permeabilidade aos crioprotetores e à água (Mukaida et al., 2003), fato que aumenta a incidência de injúrias decorrentes do processo de vitrificação. Uma forma de prevenir essas injúrias é através do aumento das velocidades de resfriamento e aquecimento, alcançado com a redução do volume da solução crioprotetora (Mukaida et al., 2003). Por isso, atualmente a grande maioria dos estudos reportados na literatura utiliza "cryoloops" (Reed et al., 2002; Mukaida et al., 2003; Takahashi et al., 2005) ou "cryotops" (Hiraoka et al., 2004; Liebermann & Tucker, 2006) para realização da vitrificação de blastocistos, pois esses sistemas permitem a utilização de volume bastante reduzido da solução crioprotetora.

Por outro lado, palhetas convencionais também podem ser empregadas na técnica de vitrificação de blastocistos, mas os resultados obtidos são inconsistentes. Yokota et al. (2001) relataram bons resultados com a utilização de palhetas de 0,25mL, enquanto outros autores relataram resultados inferiores (Vanderzwalmen et al., 2002). O objetivo do presente estudo é comparar os resultados obtidos através de uma nova técnica de vitrificação de blastocistos com utilização de palhetas convencionais aos resultados obtidos com o congelamento lento de embriões no segundo e terceiro dias de cultivo.

PACIENTES E MÉTODOS

O estudo foi realizado na Clínica Pró-Criar / Mater Dei, em Belo Horizonte (MG), entre janeiro de 2005 e dezembro de 2007. Todas as pacientes foram submetidas à estimulação

ovariana com gonadotrofina menopáusic humana (hMG - Merional®, Meizler), após bloqueio hipofisário com agonista do GnRH. A coleta oocitária foi realizada por via vaginal, 34 a 36 horas após a administração de gonadotrofina coriônica (hCG - Choriomon®, Meizler). O cultivo embrionário foi realizado em microgotas de meio Global (LifeGlobal) suplementado com albumina sérica humana (HSA, Irvine), na concentração de 5mg/mL, a 37°C e 5,5% de CO₂.

Os embriões viáveis não transferidos foram vitrificados em estágio de blastocisto, no quinto ou sexto dia de cultivo, ou criopreservados no segundo ou terceiro dia de cultivo, utilizando protocolo lento. A técnica de vitrificação de blastocistos começou a ser utilizada em abril de 2006 e, a partir de agosto de 2007, optou-se exclusivamente por essa técnica. Apenas blastocistos expandidos (blastocel representando mais de 50% do volume total) foram selecionados para vitrificação. Embriões apresentando multinucleação, parada de clivagem ou mais de 50% de fragmentação não foram criopreservados.

Durante o período do estudo, foram realizados 52 ciclos de vitrificação e desvitrificação de blastocistos, os quais resultaram em 43 transferências (grupo 1), e 60 ciclos de congelamento e descongelamento de embriões, os quais resultaram em 51 transferências (grupo 2). As 94 transferências de embriões vitrificados ou congelados foram analisadas retrospectivamente.

O processo de vitrificação de blastocistos foi realizado à temperatura ambiente, utilizando soluções denominadas V1, V2 e V3 contendo etilenoglicol e glicerol como crioprotetores, conforme protocolo descrito por Stachecki e colaboradores (2008). Os blastocistos foram vitrificados utilizando-se a solução V3, em palhetas de 0,25 mL, a qual era selada dos dois lados. Para realização do processo de desvitrificação dos blastocistos, as palhetas foram expostas à temperatura ambiente por 5 segundos e a 20°C por mais 10 segundos. Após essa etapa, procedeu-se a remoção dos crioprotetores, conforme protocolo descrito por Stachecki e colaboradores (2008), e incubação dos embriões em meio Global a 37°C por 0-4 horas até o momento da transferência. A sobrevivência dos blastocistos foi avaliada pela integridade da massa celular interna (ICM), do trofoectoderma e pela reexpansão da blastocel.

No protocolo de congelamento e descongelamento lento, foram utilizados propanodiol (PROH) e sacarose como crioprotetores. O processo também foi realizado à temperatura ambiente, iniciado com a transferência dos embriões para solução base contendo PBS e soro sintético substitutivo (SSS, Irvine). Posteriormente, os embriões foram transferidos para solução contendo 1,5M de PROH, na qual permaneceram por 10 minutos. O processo de congelamento lento foi realizado em solução contendo 0,1M de sacarose e 1,5M de PROH, utilizando-se palhetas de 0,25mL. Para realização desse processo, foi utilizado o equipamento Freeze Control (Cryologic). A curva de temperatura iniciou-se a 20°C, com queda de 2°C por minuto até -7°C, quando foi realizado o *seeding*. A temperatura de -7°C se manteve por 10 minutos e, posteriormente, baixou 0,3°C por minuto até -35°C e 2°C

por minuto até -43°C , quando então as palhetas foram submersas em nitrogênio líquido. Para o descongelamento dos embriões, as palhetas foram expostas à temperatura ambiente por 40 segundos e submersas em água a 30°C por mais 40 segundos. Imediatamente, os embriões foram transferidos sucessivamente para soluções contendo 0,2M de sacarose e 1,0M de PROH, 0,2M de sacarose e 0,5M de PROH e 0,2M de sucrose, permanecendo 5 minutos em cada uma das soluções, à temperatura ambiente. Depois, os embriões foram transferidos para meio contendo PBS e SSS e mantidos por 5 minutos em placa aquecida a 37°C , quando então foram colocados na placa de cultivo contendo meio Global até o momento da transferência para a paciente. Somente embriões com pelo menos 50% dos blastômeros intactos após descongelamento foram selecionados para transferência.

O preparo endometrial para transferência foi realizado através da administração oral de 6mg de estradiol micronizado (Estrofem®, Medley), a partir do primeiro dia da menstruação. A espessura e a morfologia endometriais foram avaliadas após um período de pelo menos 12 dias de administração do estradiol micronizado, sendo considerada adequada espessura endometrial acima de 7mm. A progesterona micronizada (Evocanil®, Zodiac; ou Utrogestan®, Farmoquímica) foi administrada por via vaginal, na dose de 900mg por dia. A transferência embrionária foi realizada no sexto dia de progesterona nos casos de blastocistos vitrificados. Embriões congelados no segundo ou terceiro dia de desenvolvimento foram transferidos no terceiro ou quarto dia de administração de progesterona, respectivamente. Todas as transferências embrionárias foram realizadas sob monitorização ultrassonográfica, utilizando-se cateter de Sydney (Cook). A gestação clínica foi diagnosticada através da presença de embrião com batimento cardíaco ao ultra-som.

A análise estatística foi realizada através do teste t Student para comparação entre médias e do teste exato de Fisher corrigido por Yates para comparação entre frequências, utilizando-se o programa GraphPad InStat. Foi considerado como significante um $P < 0,05$.

RESULTADOS

Cento e trinta e um blastocistos vitrificados foram submetidos ao processo de desvitrificação e 76 sobreviveram (58,0%). Trezentos e oitenta embriões congelados no segundo e terceiro dias de cultivo foram descongelados e 182 sobreviveram (47,9%). Embora a taxa de sobrevivência de blastocistos vitrificados tenha sido superior à taxa de sobrevivência de embriões congelados no segundo e terceiro dias de cultivo, não houve diferença estatisticamente significativa ($P = 0,054$).

No grupo 1, foram realizadas 27 transferências de blastocistos vitrificados no quinto dia de cultivo e 16 transferências de blastocistos vitrificados no sexto dia de cultivo e não se observou diferença nas taxas de implantação e gravidez clínica (Tabela 1).

No grupo 2, foram realizadas 19 transferências de embriões congelados no segundo dia de cultivo e 32 transferências de embriões congelados no terceiro dia de

Tabela 1: Resultados obtidos com a transferência de blastocistos vitrificados no quinto ou sexto dia de cultivo (grupo 1)

	Dia 5	Dia 6	P
Média de idade (anos)	31,8 ± 4,8	32,3 ± 5,3	0,74
Taxa de implantação	37,8% (17/45)	30,0% (9/30)	0,62
Taxa de gravidez clínica	51,9% (14/27)	43,8% (7/16)	0,33

Tabela 2: Resultados obtidos com a transferência de embriões congelados no segundo ou terceiro dia de cultivo (grupo 2)

	Dia 2	Dia 3	P
Média de idade (anos)	32,4 ± 3,15	33,3 ± 5,49	0,51
Taxa de implantação	12,1% (7/58)	9,8% (9/92)	0,79
Taxa de gravidez clínica	26,3% (5/19)	12,5% (4/32)	0,27

cultivo, não havendo diferença nas taxas de implantação e gravidez clínica (Tabela 2).

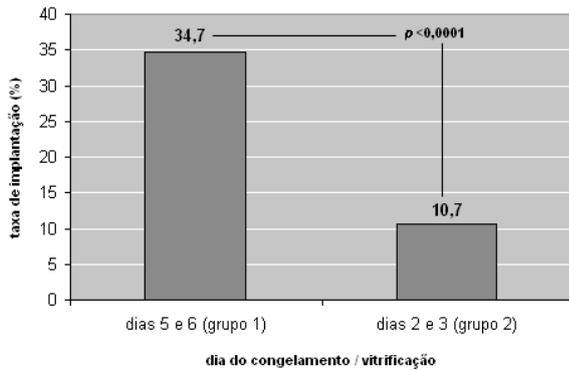
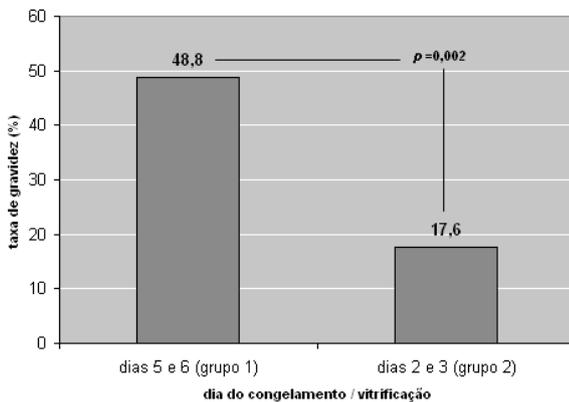
Comparando-se os resultados obtidos através da transferência de blastocistos vitrificados (grupo 1) aos resultados obtidos com a transferência de embriões congelados no segundo e terceiro dias de cultivo (grupo 2), observou-se taxas de implantação e gravidez clínica significativamente superiores no grupo 1 em relação ao grupo 2 (Figuras 1 e 2).

DISCUSSÃO

A vitrificação de blastocistos traz algumas vantagens em relação ao congelamento lento de embriões em estágios mais precoces de desenvolvimento. Além do processo de vitrificação ser bem mais rápido em comparação ao congelamento lento, demandando menor disponibilidade de tempo pelo embriologista, também não há necessidade de utilizar nenhum tipo de equipamento para o processo de criopreservação, mas somente um termômetro que registre a temperatura à qual os embriões estão submetidos durante a etapa de exposição ao vapor de nitrogênio. Outra vantagem é o menor número de embriões criopreservados, pois muitos embriões considerados viáveis para congelamento no segundo e terceiro dias de desenvolvimento interrompem o processo de clivagem e não atingem o estágio de blastocisto. Além disso, a opção pela transferência de embriões em estágio de blastocisto permite a redução do número de embriões transferidos e contribui para redução da taxa de gemelaridade.

A utilização de palhetas convencionais no processo de vitrificação facilita a execução da técnica, pois não há necessidade de utilizar volume muito reduzido da solução crioprotetora, tal como ocorre com a utilização de "cryoloops" ou "cryotops". Outra vantagem da utilização de palhetas convencionais é a facilidade de selamento, evitando-se assim o emprego de sistemas abertos, com risco de contaminação de amostras.

No presente estudo, a taxa de sobrevivência após desvitrificação de blastocistos foi de 58,0%, inferior às

Figura 1: Taxas de implantação de acordo com o dia do congelamento / vitrificação**Figura 2:** Taxas de gravidez clínica de acordo com o dia do congelamento / vitrificação

taxas obtidas com utilização de "cryoloops" (Reed et al., 2002; Mukaida et al., 2003; Takahashi et al., 2005) ou "cryotops" (Hiraoka et al., 2004; Liebermann & Tucker, 2006). Entretanto, se os resultados obtidos nos primeiros ciclos não tivessem sido incluídos, a taxa de sobrevivência teria sido maior. No início do estudo, houve alguns problemas técnicos causados pela utilização de uma palheta que não apresentava resistência suficiente para suportar o processo de vitrificação. Em alguns casos observamos o rompimento do lacre da palheta durante a desvitrificação, fato que prejudicou a sobrevivência dos blastocistos. Esse problema foi totalmente solucionado após troca da marca da palheta.

As taxas de implantação e gravidez de blastocistos vitrificados no quinto ou sexto dia foram similares, fato também observado em outros estudos (Mukaida et al., 2003; Hiraoka et al., 2004). Entretanto, Liebermann & Tucker (2006) relataram taxas superiores de implantação e gravidez com embriões vitrificados no quinto dia em comparação às taxas obtidas com blastocistos vitrificados no sexto dia.

Apesar dos resultados obtidos com transferência a fresco de blastocistos no quinto dia se mostrarem superiores em relação à transferência a fresco de blastocistos no sexto dia de cultivo (Shapiro et al., 2001), a vitrificação de blastocistos no sexto dia de cultivo se mostra também bastante eficaz e demonstra a boa qualidade desses

embriões. Uma explicação para esse fato seria a melhor sincronização entre o desenvolvimento embrionário e o endométrio, obtida através do esquema utilizado no preparo endometrial para recepção de embriões criopreservados (Liebermann & Tucker, 2006; Shapiro et al., 2008). Em um ciclo de FIV, o endométrio tende a estar histologicamente avançado em relação ao desenvolvimento embrionário, fato que se acentua quando há formação da blastocele apenas no sexto dia de cultivo. Entretanto, utilizando-se o mesmo número de dias de administração de progesterona antes da transferência de blastocistos vitrificados no quinto e sexto dias, possibilita-se melhor sincronização entre blastocistos com desenvolvimento mais atrasado e o endométrio.

Estudos que também utilizaram palhetas convencionais no processo de vitrificação de blastocistos relataram taxas inferiores de implantação e gravidez (Yokota et al., 2001; Vanderzwalmen et al., 2002), embora o protocolo de vitrificação utilizado em nosso estudo seja diferente dos protocolos reportados na literatura. No presente estudo, as taxas de implantação (34,7%) e gravidez clínica (48,8%) obtidas no grupo de vitrificação de blastocistos foram bastante satisfatórias, similares às obtidas com utilização de "cryotops" (Hiraoka et al., 2004; Liebermann & Tucker, 2006) e superiores às obtidas com utilização de "cryoloops" (Reed et al., 2002; Mukaida et al., 2003; Takahashi et al., 2005).

Alguns estudos reportaram maiores taxas de sobrevivência quando embriões são vitrificados em estágio de mórula ou de blastocisto inicial (Vanderzwalmen et al., 2002; Mukaida et al., 2003). A explicação para esse fato seria a baixa permeabilidade da membrana aos crioprotetores, os quais não atingiriam concentração satisfatória no fluido da blastocele (Vanderzwalmen et al., 2002). Alguns autores recomendam inclusive o esvaziamento da blastocele antes do processo de vitrificação, com intuito de evitar a formação de cristais de gelo e melhorar a taxa de sobrevivência (Vanderzwalmen et al., 2002; Son et al., 2003; Hiraoka et al., 2004). Ao contrário, a técnica descrita no presente estudo se mostra eficaz para vitrificação de blastocistos expandidos (blastocele representando mais de 50% do volume total), pois a utilização de sacarose em alta concentração possibilita a desidratação da blastocele. Isso representa uma grande vantagem, pois blastocistos mais expandidos geralmente correspondem aos de melhor qualidade.

Uma crítica ao presente estudo seria o fato do mesmo ser retrospectivo e comparar taxas obtidas em períodos diferentes (congelamento lento de 2005 a 2007 e vitrificação de blastocistos em 2006 e 2007). Entretanto, as taxas de implantação e gravidez clínica obtidas com a transferência de embriões a fresco durante os anos de 2005 a 2007 se mantiveram constantes (dados não reportados).

Outro ponto a ser considerado é de que muitos embriões criopreservados no segundo e terceiro dias de cultivo não se desenvolveriam até o estágio de blastocisto e, por isso, o potencial de implantação dos embriões criopreservados em estágio de blastocisto é superior ao dos embriões criopreservados em estágios mais

precoces de desenvolvimento. Portanto, várias pacientes que tiveram embriões criopreservados após 2 a 3 dias de cultivo não teriam embriões para criopreservação se os mesmos tivessem sido cultivados até o estágio de blastocisto. Entretanto, procuramos analisar nesse estudo exclusivamente a eficácia da técnica, ou seja, as taxas de sobrevivência, implantação e gravidez. As maiores taxas de implantação e gravidez clínica foram observadas com a técnica de vitrificação de blastocistos, provavelmente devido à maior seleção embrionária, mas também a uma técnica de congelamento adequada a estes embriões, levando finalmente à melhor eficácia em comparação à técnica de congelamento lento de embriões no segundo e terceiro dias de cultivo.

O desenvolvimento de técnicas mais eficazes de criopreservação pode ampliar as indicações atualmente existentes. Em ciclos de fertilização assistida, grande parte das falhas de implantação pode ser atribuída ao endométrio, o qual tende estar avançado histologicamente em relação ao desenvolvimento do embrião devido aos altos níveis hormonais alcançados em um ciclo induzido. Uma forma de melhorar a sincronização entre a histologia do endométrio e o desenvolvimento do embrião seria criopreservar todos os embriões produzidos em um ciclo de FIV e transferi-los posteriormente após preparo endometrial adequado. Outra vantagem desse tipo de conduta seria a possibilidade de transferir os embriões um a um, evitando-se assim a ocorrência de gestações gemelares e de suas complicações.

A técnica de vitrificação de blastocistos descrita no presente estudo apresentou bons resultados de sobrevida, implantação e gestação quando comparada à técnica de congelamento lento de embriões no segundo e terceiro dias de cultivo. Entretanto, estudos prospectivos, preferencialmente comparando embriões no mesmo estágio de desenvolvimento, se fazem necessários para se confirmar a superioridade dessa nova técnica de vitrificação em relação ao congelamento lento de embriões.

Endereço para correspondência:

João Pedro Junqueira Caetano
Rua Alvarenga Peixoto, 1379 – Santo Agostinho
Belo Horizonte, MG - Brasil
CEP: 30180-121
Telefax: (31) 3292-5299
e-mail: joaopedro@pro-criar.com.br

Referências Bibliográficas:

- Choi DH, Chung HM, Lim JM, Ko JJ, Yoon TK, Cha KY. Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitrified blastocysts in an IVF-ET program. *Fertil Steril.* 2000;74:838-9.
- Hiraoka K, Hiraoka K, Kinutani M, Kinutani K. Blastocoele collapse by micropipetting prior to vitrification gives excellent survival and pregnancy outcomes for human day 5 and 6 expanded blastocysts. *Hum Reprod.* 2004;19:2884-8.
- Liebermann J, Tucker MJ. Comparison of vitrification and conventional cryopreservation of day 5 and day 6 blastocysts during clinical application. *Fertil Steril.* 2006;86:20-6.
- Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, Oka C, Kasai M, Takahashi K. Vitrification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles. *Hum Reprod.* 2003;18:384-91.
- Reed ML, Lane M, Gardner DK, Jensen NL, Thompson J. Vitrification of human blastocysts using the Cryoloop method: successful clinical application and birth of offspring. *J Assist Reprod Genet.* 2002;19:304-6.
- Shapiro BS, Richter K, Harris D, Daneshmand ST. A comparison of day 5 and 6 blastocysts transfers. *Fertil Steril.* 2001;75:1126-30.
- Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Ross R. Contrasting patterns in in vitro fertilization pregnancy rates among fresh autologous, fresh oocyte donor, and cryopreserved cycles with the use of day 5 or day 6 blastocysts may reflect differences in embryo-endometrium synchrony. *Fertil Steril.* 2008;89:20-6.
- Son WY, Yoon SH, Yoon HJ, Lee SM, Lim JH. Pregnancy outcome following transfer of human blastocysts vitrified on electron microscopy grids after induced collapse of the blastocoele. *Hum Reprod.* 2003;18:137-9.
- Stachecki JJ, Garrisi J, Sabino S, Caetano JPJ, Wiemer KE, Cohen J. A new safe, simple and successful vitrification method for bovine and human blastocysts. *RBMOOnline* 2008;17:360-7.
- Takahashi K, Mukaida T, Goto T, Oka C. Perinatal outcome of blastocyst transfer with vitrification using cryoloop: a 4-year follow-up study. *Fertil Steril.* 2005;84:88-92.
- Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983;305:707-9.
- Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche Ch, Standaert V, van Roosendaal E, Vandervorst M, Bollen N, Zech H, Mukaida T, Takahashi K, Schoysman R. Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoele cavity before vitrification. *Hum Reprod.* 2002;17:744-51.
- Yokota Y, Sato S, Yokota M, Yokota H, Araki Y. Birth of a healthy baby following vitrification of human blastocysts. *Fertil Steril.* 2001;75:1027-9.

2009 Congresso Brasileiro De Reprodução Assistida

Agosto de 2009 Curitiba, PR

Relação entre dia de transferência e qualidade embrionária com taxas de gravidez

Correlation of transferency day and embryos quality with pregnancy rate

Paula Andréa Sampaio de Vasconcelos^I, Ingridi de Souza Sene^{II}, Galgânia Nolêto Silva Sousa^{III}, Braulio Fernandes de Carvalho^{IV}, André Luiz Eigenheer da Costa^V

^I Graduanda em Bacharelado em Ciências biológicas – UFPI; Teresina (PI) – Brasil.

^{II} Bióloga, Embriologista- Criar- Clínica de Reprodução Humana – Teresina (PI) – Brasil.

^{III} Bióloga, Embriologista- Criar- Clínica de Reprodução Humana – Teresina (PI) – Brasil.

^{IV} Graduando em Biomedicina – Faculdade NOVAFAPI; Graduando em Bacharelado em Ciências Biológicas – UFPI; Teresina (PI) – Brasil.

^V Médico Criar – Clínica de Reprodução Humana, Teresina, Piauí – Fortaleza (CE).

Criar - Reprodução Assistida. Rua Anfrísio Lobão, 2039, Jóquei Clube – Fone: (86) 3232-2400 – Teresina – PI - www.criar.med.br Recebido em 18/11/2008

RESUMO

Objetivos: determinar se o dia da transferência e a qualidade embrionária estão relacionados com a porcentagem de gravidez. **Métodos:** Oitocentos e oitenta e três ciclos de ICSI foram analisados retrospectivamente. Pacientes foram divididas em dois grupos, tendo como diferencial o dia de transferência de embriões. GRUPO 01 e 02 para transferência em 48hs (D+2) e em 72hs (D+3), respectivamente. Para os estudos estatísticos utilizou-se teste de χ^2 a um nível de significância de $p < 0,05$. **Resultados:** A taxa de gravidez em pacientes que tiveram seus embriões transferidos no dia 3 é significativamente maior que no dia 2, 45,3% e 27,65%, respectivamente. Houve mais embriões Qualidade A transferidos no dia 3, 51%, que no dia 2, 40%. As taxas de aborto foram maiores para transferências 48hs pós ICSI, 31,3%, quando comparadas com taxas de 72hs, 28,15%. **Conclusão:** Confirmando o apresentado em estudos anteriores, a qualidade dos embriões transferidos, bem como as taxas de gravidez são maiores nos casos de transferência realizada 72hs pós ICSI, quando comparadas com 48hs.

Palavras chave: embriões; fertilização *in vitro*, ICSI, taxa de fertilização.

ABSTRACT

Objective: determinate the relation between transference day and embryo quality and its influence on pregnancy rate. **Methods:** eight hundred and three (803) cycles of ICSI were analyzed, retrospectively. Patients were classified into two groups, based on embryos transference day. GROUP 01 and 02 to transferences on 48hs (D+2) and on 72hs (D+3), respectively. Statistical study was done using χ^2 test, significance level of $p < 0,05$. **Results:** The rate of pregnancy on patients with their embryos

transferred on the third Day is significantly higher (45,3%) when compared with patients of the GROUP 01, with embryos transferred on the second day (27,65%). There were more quality A embryos transferred on day 3 (51%) than embryos transferred on Day 2 (40%). Abortion rate was higher on transferences with 48hs after ICSI (31,3%) when compared with 72hs (28,15%). **Conclusion:** Confirming presented previous studies, the quality of transferred embryos, as well as pregnancy rate, is higher on transferences made within 72hs after ICSI, when compared within 48 hs.

Key-words: embryos, *in vitro* fertilization, ICSI; pregnancy rate.

INTRODUÇÃO

Atualmente, o número de casais com problemas de infertilidade que recorrem à Reprodução Assistida (RA) tem aumentado significativamente.

Após 1993, com a introdução da ICSI (Intracytoplasmic sperm injection), solucionando problemas de infertilidade masculina e falha de fertilização, novas tecnologias têm surgido, aumentando as taxas de gestação (Sousa & Tesarik, 1994, Blake et al, 2000).

Outros fatores responsáveis por esse sucesso estão relacionados com o aprimoramento da fisiologia reprodutiva, diversidade de condições de cultura embrionária, melhora das taxas de fertilização e clivagem, seleção criteriosa dos embriões transferidos e a qualidade dos materiais envolvidos no processo (Serhal et al, 1997).

Na Fertilização *in vitro* busca-se, ao máximo, submeter o embrião às condições semelhantes ao trato reprodutivo. A qualidade do meio de cultura é fundamental para sustentar o desenvolvimento saudável até o momento da

Tabela 01: Critérios de classificação de embriões a serem transferidos

	Dia da transferência	Número de células	Frag	Semelhança	MN*	Cit**	ZP***
Qualidade A	Dia + 2 (44 - 47hs)	4	≤ 10% Não tipo IV				
	Dia + 3 (67 - 71hs)	4 → 7 - 8					
Qualidade B	Dia + 2 (44 - 47hs)	2 - 5 / 4 (frag 11 - 25)	< 26% Não tipo IV	Iguais ou semelhantes	Não	Sem vac	NI ****
	Dia + 3 (67 - 71hs)	4 → ≥ 7 - 8 (frag 11-25%) 4 → ≥ 9 2 à 5 → ≥ 9					
Qualidade C	Dia + 2 (44 - 47hs)	3 / 2 - 6 (frag < 26%)	26 - 35 % Não tipo IV	Assimétricos	Não	PC#	NI ****
	Dia + 3 (67 - 71hs)	2 / 4 / 5 → ≥ 7 6 → ≥ 8 (frag < 35%) 2 / 4 → 6					
Qualidade D	Dia + 2 (44 - 47hs)	1 - ≥ 6 3 (Semelhantes)	≥ 35% Qq % tipo IV	Assimétricos	Sim	INT##	ALT###
	Dia + 3 (67 - 71hs)	1 / > 6 → Independe Independente → < 6 NO. Cel → NO. Cel + 1					

MN: Multinucleado; Cit**: Citoplasma; ZP***: Zona pelúcida; NI****: Normal.
PC#: Pouco; INT##: Intenso; ALT###: Alterada.

Tabela 02 - Efeito do dia de transferência sobre a taxa de gravidez

	Dia 2	Dia 3
Número de casos	353 (40,5%)	525(59,5%)
Média de idade (±DP)	36±5,5	34±5,7
Média de embriões transferidos	3,0±1,2	3,7±1,0
Embriões transferidos qualidade A	40%	51%
Embriões transferidos qualidade B	44%	41,5%
Embriões transferidos qualidade C	13%	6,2%
Embriões transferidos qualidade D	2%	1,3%
BhCG positivo	99 (27,65%)	238(45,3%)
Taxa de aborto	31 (31,3%)	67(28,15%)

transferência sendo, considerados fatores indispensáveis: pH, taxas de CO₂, temperatura, além das características peculiares de cada meio (Takeuchi et al, 2001).

A alta incidência de gravidez múltipla é uma preocupação de casais que recorrem a RA. Segundo dados da Rede Latino-americana de Reprodução Assistida, essa taxa foi

de 28.1% em 2005. Estudos apontam que é necessária uma avaliação criteriosa antes da transferência embrionária, prevalecendo qualidade a quantidade (Ebner et al, 1999; Hardarson et al, 2001). Para isso, o cultivo *in vitro* deve ser, pelo menos, de 72 horas. Essa seleção seria uma solução para as freqüentes gestações gemelares sem comprometer taxas de gestação.

Por outro lado, é possível que características que tornam o embrião de boa qualidade sejam alteradas com o passar de mais vinte e quatro horas em meio de cultura (Ebner et al, 2001), induzindo embriologistas a transferir embriões em dia 2 nos casos de pacientes com baixo número de embriões (menor que 4).

Em nosso centro, o sistema utilizado para classificação e seleção de pré-embriões a serem transferidos analisa parâmetros morfológicos característicos de cada fase do desenvolvimento. Desse modo, a transferência para o útero materno está associada com o fator de infertilidade, idade da paciente, número do ciclo, quantidade e qualidade de embriões.

Este trabalho tem como objetivo comparar a influência das características acima mencionadas com a transferência embrionária nos dias 2 e 3 pós ICSI.

MATERIAIS E MÉTODOS

Um total de 883 ciclos de ICSI foi analisado retrospectivamente entre agosto de 2001 a dezembro de 2007. Foram excluídas do estudo ciclos de pacientes azoospermicos e de embriões criopreservados. Pacientes foram divididas em dois grupos, tendo como diferencial o dia de transferência de embriões. GRUPO 01 e 02 para transferência em 48hs (D+2) e em 72hs (D+3), respectivamente.

Neste trabalho utilizamos como fator de inclusão pacientes com um nível de FSH <15 UI /ml, no mínimo 2 folículos, com média de 16 - 17 milímetros de diâmetro, medidos por ultra-sonografia transvaginal. Na maioria dos casos, foi utilizado protocolo de estímulo longo (Sonntag et al, 2005), somente em casos excepcionais o ciclo curto foi usado (<1% dos casos). Utilizou-se agonista do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH-a) para bloqueio hipofisário (Lupron Depot®, ½ ampola de 3,75 mg; Abbott, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) no 21º dia do ciclo anterior. Foi confirmada a supressão ovariana mediante avaliação ultra-sonográfica transvaginal.

A aspiração dos oócitos ocorreu 34 - 36hs pós hCG em ASP 125, *Vitrolife* a 37°C, por ultrassom transvaginal. Após a recuperação o gameta feminino foi lavado em Modified HTF with HEPES Buffer (mHTF), *Irvine Scientific*, à 10% de Human Serum Albumin (HSA) *Irvine Scientific* e imediatamente passados em Hialuronidase - (HYASE) *Vitrolife*, para retirada das células do cúmulo. Placas contendo gotas com 50,0µl de HTF suplementados a 10% de HSA, coberta com 10,0ml de óleo mineral (OVOIL) *Vitrolife*, previamente equilibradas foram designadas para incubação dos oócitos por 3 a 5hs a 37°C, pH 7,3 - 7,4 e concentração de CO₂ a 5,5 - 6.5%.

Denudação dos oócitos foi realizada manualmente com micropipetas de silicone 125µm, em placa de incubação e classificados quanto à maturação.

Apenas gametas maduros, oócitos MII (Metáfase II) foram transferidos para placa com gotas numeradas circularmente, com 5,0µl de mHTF a 10% de HSA e gota central contendo meio viscoso que diminui a motilidade dos espermatozoides (PVP) ICSI 100, *Vitrolife*, coberta por 10,0ml de OVOIL, submetidos à ICSI.

Amostras seminais foram avaliadas e preparadas de acordo com a concentração e motilidade dos espermatozoides. A técnica *Swim up*, migração ascendente dos espermatozoides do líquido seminal para mHTF a 10% de HSA por 1 hora foi utilizada para concentrações > 10 milhões/ml. Amostras com concentração inferior a 10,0 milhões/ml foram submetidas a *Sperm wash*, centrifugação por 10 minutos a 2000 rpm de 1,0ml de líquido seminal em 1,0ml de mHTF a 10% de HSA .

Amostras seminais foram avaliadas e preparadas quanto a concentração de espermatozoides pelas técnicas de *Swim up*, migração ascendente dos espermatozoides do líquido seminal para mHTF a 10% de HSA por 1 hora, para concentração de espermatozoide > 10 milhões/ml. *Sperm wash*, centrifugação por 10 minutos a 2000rpm, de 1,0 ml de líquido seminal em 1,0ml de mHTF a 10% de HSA, para amostras com concentração até 10,0 milhões/ml. *Gradiente descontínuo*, ISOLATE *Irvine Scientific*, foi utilizado em amostras com concentração >10,0 milhões/ml, motilidade A+B< 50% e celularidade aumentada. Partículas de sílica em concentrações diferentes capacitam e selecionam os gametas masculinos, centrifugados por 20 minutos a 2000rpm. Um *pool* de espermatozoide em meio de cultura foi utilizado para ICSI.

A verificação da fertilização ocorreu de 16 a 19hs pós ICSI, quanto a presença do segundo corpúsculo polar, pró-núcleos e suas características.

No D+2, a avaliação será feita considerando-se o número de células do embrião, a presença de multinucleação e a porcentagem de fragmentação. Para D+3, serão avaliados ritmo de clivagem, a regularidade e grau de adesão dos blastômeros e quanto à presença e tipo de fragmentação (Tabela 01).

Para a transferência, os embriões selecionados serão colocados em placa de Petri *Falcon 3001* com 1,0ml de HTF 10% HSA. O Cateter *Soft Cook Sidney IVF®* foi lavado com o mesmo meio, e com o auxílio de uma seringa 1CC *Normanject*, os embriões foram aspirados entre duas colunas de ar. No centro cirúrgico a paciente foi colocada em posição ginecológica e com ajuda do espelho o colo uterino foi exposto e lavado com 10,0ml de PBS *Irvine Scientific*. Por ultra-sonografia abdominal, visualizou-se a guia do cateter e o *Soft* passando com os embriões que serão descarregados suavemente 1,0 - 2,0cm do fundo da cavidade uterina.

Gravidez bioquímica foi avaliada entre 11º - 13º dia pós transferência embrionária, e gravidez clínica por ultra-sonografia transvaginal 5 - 6 semanas após, comprovando a presença de saco gestacional com batimentos cardíacos.

Para a análise estatística das diferenças na taxa de gestação entre pacientes que transferiram seus embriões em dia 2 e de transferência no dia 3, utilizou-se o teste de χ^2 , a um nível de significância de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Foram realizadas 358 transferências no D+2, GRUPO 01 com idade média 36 anos ($\pm 5,5$) e aproximadamente 3,0 embriões por ciclo, sendo, 40% Qualidade A, 44% Qualidade B, 13% Qualidade C e 2% Qualidade D. As taxas de β hCG positivo nesse grupo foram de 27,65% e aborto 31,3% dos casos.

No GRUPO 02, D+3, foram realizadas 525 transferências embrionárias em pacientes com média de idade de 34 anos ($\pm 5,7$), e transferência de 3,7 embriões por ciclo, sendo a maioria, de Qualidade A: 51%. Qualidade B, C e D ocorreram com freqüências de 41,5%, 6,2% e 1,3% respectivamente. O resultado de gravidez foi 45,3%, e abortos 28,15% (Tabela 02).

DISCUSSÃO

Na literatura, estudos que avaliam o período de incubação embrionária sobre as taxas de gravidez não são conclusivas (ASRM, 2002; Chen et al, 2005). Pesquisas anteriores verificaram que a cada três embriões de qualidade A no D+2, apenas um permanecerá nessa classificação no D+3 (Coskun et al, 2000; Milki et al, 2000). Entretanto, um outro relato sugeriu que seria arriscado manter em cultura embrionária até D+3, casos de pacientes com número de embrião < 4 (Gardner et al, 2000; Desai et al, 2000).

Nesse trabalho foi analisada a taxa de gravidez em relação ao dia da transferência embrionária. Observamos uma diminuição significativa deste índice nas transferências realizadas no D+2 em relação às transferências em D+3 (27,65% e 45,3% respectivamente). Nossos resultados estão de acordo com os dados apresentados em literatura,

confirmando a influência do dia de transferência com o valor do β hCG positivo, que pode também estar associados ao melhor sincronismo do endométrio com os embriões no D+3.

Pacientes que apresentam sucesso no tratamento transferiram maior quantidade de embriões qualidade A (Grupo 01: 41% vs Grupo 02: 53%) o que pode estar relacionado ao aumento de gravidez do D+3 em relação a D+2.

Outro achado em nosso estudo foi a menor média de idade das pacientes do Grupo 02 em relação ao Grupo 01 ($34 \pm 5,7$ e $36 \pm 5,5$ respectivamente). Assim como a taxa de aborto (28,15% e 31,3%). Embora os valores sejam estatisticamente insignificantes ($p > 0,05$).

Concluímos, portanto, que o D+3 de transferência embrionária apresenta melhores resultados de gravidez nos ciclos de ICSI quando comparados ao D+2.

Referências bibliográficas:

- American Society for Reproductive Medicine. Ethics Committee. Donating spare embryos for embryonic stem-cell research. *Fertil Steril*. 2002;78(5):957-60.
- Blake, M., Garrisi, J., Tomkin, G. and Cohen, J. Sperm deposition site during ICSI affects fertilization and development. *Fertil Steril* 2000; 73: 31-37.
- Chen H, Qian K, Hu J, Liu D, Lu W, Yang T, et al. The derivation of two additional human embryonic stem cell lines from day 3 embryos with low morphological scores. *Hum Reprod*. 2005;20(8):2201-6.
- Ciotti PM, Notarangelo L, Morselli-Labate AM, Felletti V, Porcu E, Venturoli S. First polar body morphology before ICSI is not related to embryo quality or pregnancy rate. *Hum Reprod*. 2004;19(10):2334-9.
- Cohen Y, Malcov M, Schwartz T, Mey-Raz N, Carmon A, Cohen T, et al. Spindle imaging: a new marker for optimal timing of ICSI? *Hum Reprod*. 2004;19(3):649-54.
- Coskun S, Hollanders J, Al-Hassan S, Al-Sufyan H, Al-Mayman H, Jaroudi K. Day 5 versus day 3 embryo transfer: a controlled randomized trial. *Hum Reprod* 2000;15:1947-52.
- Desai NN, Goldstein J, Rowland DY, Goldfarb JM. Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. *Hum Reprod*. 2000;15(10):2190-6.
- Ebner T, Moser M, Yaman C, Feichtinger O, Hartl J, Tews G. Elective transfer of embryos selected on the basis of first polar body morphology is associated with increased rates of implantation and pregnancy. *Fertil Steril*. 1999;72(4):599-603.
- Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Polz W, Tews G. Embryo fragmentation in vitro and its impact on treatment and pregnancy outcome. *Fertil Steril*. 2001;76(2):281-5.
- Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Donating spare embryos for embryonic stem-cell research. *Fertil Steril*. 2004;82 Suppl 1:S224-7.
- Gardner DK, Lane M, Schoolcraft WB. Culture and transfer of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF. *Human Reprod* 2000;15(Suppl 6):9-23.
- Hardarson T, Hanson C, Sjogren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod*. 2001;16(2):313-8. 28.
- Milki AA, Hinckley MD, Fisch JD, Dasig D, Behr B. Comparison of blastocyst transfer with day 3 embryo transfer in similar patient populations. *Fertil Steril* 2000;73:126-9.
- Salumets A, Tuuri T, Mäkinen S, Vilks S, Husu L, Tainio R, et al. Effect of developmental stage of embryo at freezing on pregnancy outcome of frozen-thawed embryo transfer. *Hum Reprod*. 2003;18(9):1890-5.
- Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, Khadum IM. Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1997;12(6):1267-70.
- Sonntag B, Kiesel L, Nieschlag E, Behre HM. Differences in serum LH and FSH levels using depot or daily GnRH agonists in controlled ovarian stimulation: influence on ovarian response and outcome of ART. *J Assist Reprod Genet*. 2005; 22(7-8):277-83.
- Sousa M, Tesarik J. Ultrastructural analysis of fertilization failure after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1994;9(12):2374-80.
- Takeuchi T, Gong J, Veeck LL, Rosenwaks Z, Palermo GD. Preliminary findings in germinal vesicle transplantation of immature human oocytes. *Hum Reprod* 2001; 16: 730-7.

Correlação entre a taxa de fertilização e o fuso meiótico em oócitos humanos: uma meta-análise

Correlation between fertilization rates and meiotic spindle in human oocytes: a meta-analysis

Claudia Guilhermino Petersen¹, João Batista Alcantara Oliveira^{1,2}, Ana Lucia Mauri¹, Fabiana C Massaro¹, Ricardo Baruffi¹, Anagloria Pontes¹, José Gonçalves Franco Jr^{1,2,3}

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

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

RESUMO

Objetivo: Esta meta-análise objetivou investigar a relação entre a presença do fuso meiótico no oócito humano e a taxa de fertilização em ciclos de ICSI.

Métodos: A estratégia de busca incluiu pesquisas em bancos de dados "on-line" de 1990 a 2008. Nove estudos preencheram os critérios de inclusão.

Resultados: A reunião dos resultados dos estudos demonstrou uma taxa de fertilização maior estatisticamente significativa quando o fuso meiótico foi visualizado do que quando não foi visualizado ($P < 0,0001$). Houve heterogeneidade nesta comparação.

Conclusão: A presença de um fuso meiótico birefringente em oócitos humanos pode predizer uma taxa de fertilização mais elevada. Esta observação tem a relevância clínica principalmente em países onde há um limite legal no número de oócitos a ser fertilizado.

Palavras-chave: taxa de fertilização; oócito humano; ICSI; fuso meiótico; meta-análise

ABSTRACT

Objective: To investigate the relationship between the presence of meiotic spindle in human oocytes and fertilization rates in ICSI cycles.

Methods: Search strategies included online surveys of databases from 1990 to 2008. Nine trials fulfilled the inclusion criteria

Results: According to the meta-analysis, the results showed statistically significant higher fertilization rate ($p < 0.0001$) when the meiotic spindle was viewed than when it was not. There was heterogeneity in this comparison.

Conclusion: The presence of a birefringent meiotic spindle in human oocytes can predict a higher fertilization rate. This observation has clinical relevance mainly in countries where there is a legal limit on the number of oocytes to be fertilized.

Key Words: fertilization rate; human oocyte; ICSI; meiotic spindle; meta-analysis

INTRODUÇÃO

Na reprodução assistida, a seleção dos gametas com o objetivo de obter melhores resultados clínicos é uma tarefa importante dos embriologistas. Esta questão tem particular relevância quando considerações éticas e/ou legais limitam a seleção dos embriões depois da fertilização. Características morfológicas oocitárias extracelulares, como cumulus, corpúsculo polar, zona pelúcida, e intracelulares (granulações e inclusões citoplasmáticas) têm sido relacionadas à fertilização, clivagem e desenvolvimento embrionário (Coticchio et al, 2004; Borini et al, 2005; Ebner et al, 2006; Balaban & Urman 2006, Chamayou et al, 2006)

Entre as características intracelulares, a avaliação do fuso meiótico em oócitos maduros vem despertando grande interesse. Os primeiros estudos sobre o fuso meiótico forneceram extensa informação de sua função na divisão celular. Contudo, como a metodologia para visualização era baseada em fixação, sua aplicação rotineira em procedimentos de reprodução assistida ou em estudos dinâmicos do fuso ficava frustrada devido à impossibilidade de manter vivos os oócitos (Coticchio et al., 2004; Borini et al., 2005; Wang et al., 2001a,b; Eichenlaub-Ritter et al., 2002; Rama Raju et al., 2007). Mais recentemente, com o surgimento da microscopia com luz polarizada integrada a software processador de imagem, foi possível a visualização do fuso meiótico conservando a viabilidade de célula (Wang et al., 2001a,b; Cooke et al., 2003; Moon et al., 2003; Rienzi et al., 2003; Cohen et al., 2004; Konc et al., 2004; Chamayou et al., 2006; Montag et al., 2006; Shen et al., 2006; Taylor et al., 2006; Fang et al., 2007; Rama Raju et al., 2007; Varghese et al., 2007; Madaschi et al., 2008).

O fuso meiótico, controlando movimentos cromossômicos em todas as diferentes etapas, desempenha um papel-chave na realização bem sucedida da meiose. Distúrbios no fuso meiótico predispõem os oócitos à perturbação na segregação cromossômica e subsequente aneuploidia, à parada de maturação, ao aumento da incidência

Tabela I – Oócitos com e sem imagem do fuso meiótico: taxa de fertilização

Estudo	Fuso (+)	Fuso (-)	%peso Fixo/aleatório	Odds ratio	95%IC
Wang et al 2001a	879/1266	175/278	29,4/13,5	1,34	1,01-1,77
Moon et al 2003	430/523	78/103	7,8/11,8	1,48	0,86-2,50
Rienzi et al 2003	362/484	16/48	2,4/10,7	5,93	3,03-11,96
Cohen et al 2004	412/585	115/185	17,3/13	1,45	1,01-2,08
Shen et al 2006	676/739	116/158	5,4/12,3	3,88	2,43-6,13
Taylor et al 2006	109/126	10/17	0,8/7,2	4,49	1,25-15,04
Fang et al 2007	85/112	14/22	1,9/8,1	1,80	0,58-5,18
Rama Raju 2007	132/160	14/45	1,3/9,8	10,44	4,63-23,88
Madaschi et al 2008	458/689	239/408	33,7/13,6	1,40	1,08-1,82
Total	3543/4684	777/1264			
Odds ratio comum					
Efeito fixo (Mantel-Haenszel, Robins-Breslow-Greenland)				1,79	1,56-2,05
Efeito aleatório (DerSimonian-Laird)				2,51	1,65-3,82

Efeito fixo: χ^2 (test odds ratio differs from 1) = 73,848739 $p < 0,0001$

Efeito aleatório: χ^2 (test odds ratio differs from 1) = 18,83554 (df = 1) $p < 0,0001$

Heterogeneidade dos estudos

-Breslow-Day = 63,638145 (df = 8) $p < 0,0001$

-Cochran Q = 59,662241 (df = 8) $p < 0,0001$

-I² (inconsistency)=86,6% (95% CI = 76% to 91,3%)

de morte celular e à redução nas taxas de fertilização (Battaglia *et al.*, 1996; Hardarson *et al.*, 2000; Eichenlaub-Ritter *et al.*, 2002; Cooke *et al.*, 2003; Varghese *et al.*, 2007). Em vários estudos, oócitos nos quais o fuso meiótico foi visualizado demonstraram aumento estatisticamente significativo das taxas de fertilização (Wang *et al.*, 2001a; Rienzi *et al.*, 2003; Cohen *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2006; Rama Raju *et al.*, 2007; Madaschi *et al.*, 2008) em comparação com oócitos sem fuso visível. Contudo, outros estudos de não confirmaram esta correlação (Moon *et al.*, 2003; Fang *et al.*, 2007). O objetivo desta meta-análise é investigar a relação entre a presença do fuso meiótico em oócitos humano e as taxas de fertilização em ciclos ICSI.

MATERIAL E MÉTODO

-Critérios para inclusão dos estudos na meta-análise: Todo estudo controlado publicado ou em andamento comparando taxa de fertilização entre oócitos nos quais o fuso meiótico foi visualizado e aqueles cujo fuso meiótico não foi observado, em ciclos ICSI.

Resultado avaliado: Taxa de fertilização.

Identificação de estudos: A estratégia de busca incluiu pesquisas em bancos de dados "online" (MEDLINE, EMBA-SE, Science Citation Index, Cochrane Controlled Trials Register e OVID) de 1990 a 2008. Não houve nenhuma restrição quanto ao idioma. As seguintes palavras foram utilizadas para a procura: meiotic spindle, spindle view, spindle, polarization microscope, polarization light microscopy, Polscope and ICSI guard.

Avaliação de validade e extração de dados: Cada estudo foi avaliado independentemente por dois revisores (CG Petersen e JBA Oliveira) e classificados quanto ao rigor metodológico e ao potencial para introdução de viés. Qualquer diferença de opinião foi resolvida pelo grupo de discussão (CG Petersen, JBA Oliveira, AL Mauri, FC Massaro, RLR Baruffi, A Pontes, JG Franco Jr) até que o consenso fosse alcançado.

Análise estatística: O manejo dos dados e a análise estatística foram conduzidos usando o software estatístico StatsDirect (Cheshire, Reino Unido). O modelo de efeito fixo foi usado para cálculo do "odds ratio" (OR). Caso os cálculos mostrassem heterogeneidade estatística, uma análise adicional era executada usando o modelo de efeito aleatório. A eficácia no modelo de efeito fixo foi avaliada pelo método de Mantel-Haenszel. O intervalo de confiança (IC) do OR pelo método Mantel-Haenszel no StatsDirect foi calculado usando a fórmula de Robins, Breslow and Greenland. Para o efeito aleatório, o intervalo de confiança para OR foi calculado usando a fórmula de DerSimonian-Laird. O teste estatístico de chi-quadrado foi usado com a sua probabilidade associada de que o OR do conjunto dos resultados dos trabalhos fosse igual a 1. A medida de heterogeneidade (non-combinability) foi avaliada pelos teste Cochran Q, Breslow-Day e I² (Higgins *et al.*, 2003). Um resultado não significativo (isto é a falta da heterogeneidade) indica que nenhum estudo tem um OR pior ou melhor estatisticamente significativo do que o OR comum total obtido juntando os dados de todos os trabalhos.

RESULTADOS

Revisão bibliográfica

Entre 15 estudos potencialmente relevantes, um total de nove cumpriram os critérios inclusão (Wang *et al.*, 2001a; Moon *et al.*, 2003; Rienzi *et al.*, 2003; Cohen *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 2007; Rama Raju *et al.*, 2007; Madaschi *et al.*, 2008).

Taxa de fertilização

A taxa de fertilização foi estatisticamente maior no grupo de oócitos no qual o fuso meiótico foi visto (75,6%, 3543/4684) do que no grupo de oócitos que não mostrou o fuso meiótico (61,5 %, 777/1264) ($p < 0,0001$; $OR = 1,79$, 95% $IC = 1,57-2,05$). Houve heterogeneidade nesta comparação (Breslow-Day=63,6, $df = 8$, $p < 0,0001$; Cochran $Q = 59,7$, $df = 8$, $p < 0,0001$; $I^2 = 86,6\%$). Utilizando o modelo de efeito aleatório, o conjunto dos resultados também mostrou uma taxa de fertilização estatisticamente maior quando o fuso meiótico foi visualizado ($p < 0,0001$, $OR = 2,52$, 95% $IC = 1,65-3,81$). A tabela 1 resume os resultados

DISCUSSÃO

Diferentes estudos relataram que, imediatamente após a captação, muitos oócitos que expeliram o primeiro corpúsculo polar também apresentam o fuso meiótico (Wang *et al.*, 2001a,b; Moon *et al.*, 2003; Rienzi *et al.*, 2003; Cohen *et al.*, 2004; Konc *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2006; Madaschi *et al.*, 2008; Rama Raju *et al.*, 2007). Na maior parte dos casos, a presença do fuso meiótico está associada com taxas de fertilização mais elevadas (Wang *et al.*, 2001a,b; Rienzi *et al.*, 2003; Cohen *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2006; Madaschi *et al.*, 2008; Rama Raju *et al.*, 2007) e com melhor desenvolvimento embrionário (Wang *et al.*, 2001a; Moon *et al.*, 2003; Rama Raju *et al.*, 2007). Nessa meta-análise, uma taxa de fertilização significativamente mais alta foi encontrada entre os 4684 oócitos nos quais o fuso meiótico foi observado comparado com 1264 oócitos onde nenhum fuso meiótico foi visualizado (75.6% versus 61.5% respectivamente, $p < 0,0001$; $OR = 1,79$, 95% $IC = 1,57-2,05$). Este resultado indica que a presença do fuso meiótico é capaz de predizer uma melhor taxa de fertilização. Contudo, este resultado foi prejudicado devido à heterogeneidade observada entre os estudos (Breslow-Day 63,6, $df = 8$, $p < 0,0001$; Cochran $Q = 59,7$, $df = 8$, $p < 0,0001$; $I^2 = 86,6\%$). Por outro lado, quando os dados foram analisados usando o modelo de efeito aleatório, a diferença na taxa de fertilização continuou significativa ($p < 0,0001$; $OR = 2,52$, 95% $IC = 1,65-3,81$).

A diferença entre os estudos nas porcentagens de oócitos que apresentam fuso meiótico (mínimo de 62,8% e máximo de 91%) pode estar relacionada a uma variação na população ou aos protocolos de estimulação ovariana. Contudo, como o controle térmico estabiliza o fuso meiótico, a precisão de como este controle de temperatura foi executado durante a coleta oocitária, a cultura ou a microinjeção também pode justificar a diferença (Wang *et al.*, 2002; Cooke *et al.*, 2003; Rienzi *et al.*, 2003). Por

outro lado, o momento em que os oócitos são analisados também pode ser importante na visualização do fuso. Cohen *et al.* (2004) mostraram que a porcentagem de oócitos com um fuso é mais alta quando a avaliação era executada pelo menos 38h após da administração hCG do que quando a avaliação era feita mais precocemente (81.5% contra 61.6%, respectivamente). Montag *et al.* (2006) mostraram que durante a transição de metáfase I a metáfase II, o fuso desaparece completamente por aproximadamente 40-60 minutos. Este fato indica que a ausência do fuso, pelo menos em alguns oócitos MII humanos, é provavelmente mais um indicador da progressão fisiológica através das etapas da meiose do que uma perturbação celular. Assim, a taxa de fertilização mais baixa entre oócitos com a ausência de um fuso pode indicar simplesmente uma escolha incorreta do momento para a realização da ICSI

Ocasionalmente, os fusos ficam visíveis apenas depois da rotação do oócito, quando a orientação dos microtúbulos torna favorável a visualização. Assim, diferenças nesta técnica podem ser responsáveis pelo alto grau da ausência de fuso. Fazendo girar o oócitos com a micropipeta de ICSI em volta do eixo que une o centro do oócito ao primeiro corpúsculo polar, durante as tentativas na visualização de fuso, Cooke *et al.* (2003) e Rienzi *et al.* (2003) observaram fuso em até 92.7% e 91% dos oócitos examinados, respectivamente. Contudo, Cohen *et al.* (2004), Rama Raju *et al.* (2007) e Madaschi *et al.* (2008) relataram taxas mais baixas de visualização de fuso (76%, 78% and 62.8%, respectivamente) apesar da rotação dos oócitos. Por outro lado, alguns autores não mencionam a rotação dos oócitos para determinar a presença ou a ausência de fuso (Wang *et al.*, 2001a,b; Wang and Keefe, 2002; Moon *et al.*, 2003).

A taxa de fertilização mais baixa demonstrada em oócitos sem fuso pode ser atribuída à imaturidade celular. Contudo, um número considerável desses oócitos foram fertilizados - aproximadamente 61,5% (considerando todos os estudos incluídos nesta meta-análise). As explicações plausíveis para este número incluem a ocorrência de falhas técnicas durante a visualização de fuso (inexperiência do biólogo, o momento da avaliação) ou simplesmente a constatação de que a ausência de fuso não previne a fertilização em todos os casos. Contudo, é possível que a falta do fuso meiótico possa ter um efeito subsequente durante o desenvolvimento de embrião.

Para evitar dano no fuso durante o procedimento de ICSI, os embriologistas giram o oócito, posicionado a pipeta de acordo a a localização do corpúsculo polar. Contudo, o movimento do corpúsculo polar dentro do espaço perivitelinico (devido a possível deslocação física durante a denucação do oócito) e/ou a migração do fuso dentro oócito pode alterar a relação entre essas duas estruturas, levando ao risco da microinjeção prejudicar o fuso (Silva *et al.*, 1999; Hardarson *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001 a,b; Moon *et al.*, 2003; Rienzi *et al.*, 2003; Cohen *et al.*, 2004; Konc *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2006; Rama Raju *et al.*, 2007). Geralmente, quando há visualização do fuso meiótico, o espermatozóide é injetado no oócito tomando cuidado especial para não danificar esta estrutura. Rienzi

e al (2003) relataram uma taxa de fertilização normal significativamente mais baixa e uma taxa mais alta da fertilização anormal, com desenvolvimento mais frequente de três pronúcleos, em oócitos com o mais alto grau do desvio do primeiro corpo polar ($>90^\circ$). Fang et al. (2007) relataram taxa de fertilização significativamente mais alta em oócitos maturados *in vivo* com fusos abaixo ou adjacentes ao primeiro corpúsculo polar (ângulo de $0-5^\circ$) (93.3 %) do que em todos outros grupos de oócitos com o maior desvio em relação primeiro corpúsculo polar ($6-45^\circ$, $46-90^\circ$ e $>90^\circ$). Contudo, Moon e al (2003) e Rama Raju e al (2007) não mostraram os mesmos resultados. Além disso, Taylor e al (2006) concluíram que o ângulo do desvio do fuso em relação ao corpúsculo polar não é um indicador confiável da qualidade de embrião ou de aneuploidia subsequente.

Em conclusão, o resultado desta meta-análise indica que a presença do fuso meiótico em oócitos humanos pode prever uma taxa mais alta de fertilização. Esta observação tem a relevância clínica principalmente em países onde há um limite legal quanto ao número de oócitos que podem ser fertilizados. Estudos prospectivos adicionais analisando uma população ampla são necessários para a compreensão da importância da presença do fuso e suas características sobre os resultados clínicos e laboratoriais.

Endereço para correspondência:

José Gonçalves Franco Jr.
Centro de Reprodução Humana Prof. Franco Junior
Av. Prof. João Fiusa, 689 – CEP: 14025-310
Ribeirão Preto – São Paulo – Brasil
Tel/FAX: (16) 3911-1100
E-mail: crh@crh.com.br or franco@crh.com.br

Referencias Bibliográfica

Balaban B, Urman B Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reprod BioMed Online* 2006; 12: 608-15.

Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR Fertilization and early embryology: Influence of maternal age on meiotic spindle assembly oocytes from naturally cycling women *Hum. Reprod.* 1996; 11: 2217-22.

Borini A, Lagalla C, Cattoli M, Cattoli M, Sereni E, Sciajno R, Flamigni C, Coticchio G. Predictive factors for embryo implantation potential. *Reprod BioMed Online* 2005; 15: 653-68.

Chamayou S, Alecci C, Ragolia C, Storaci G, Maglia E, Russo E, Guglielmino A Meiotic spindle presence and oocyte morphology do not predict clinical ICSI outcomes: a study of 967 transferred embryos *Reprod BioMed Online* 2006; 13: 661-66

Cohen Y, Malcov M, Schwartz T, Mey-Raz N, Carmon A, Cohen T, Lessing JB, Amit A, Azem F Spindle imaging: a new marker for optimal timing of ICSI. *Hum Reprod* 2004; 19: 649-54.

Cooke S, Tyler JPP, Driscoll GL Meiotic spindle location and identification and its effect on embryonic cleavage plane and early development. *Hum Reprod* 2003; 18: 2397-405.

Coticchio G, Sereni E, Serrao L, Mazzone S, Iadarola I, Borini A. What criteria for the definition of oocyte quality? *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1034:132-44.

Ebner T, Moser M, Tews G Is oocyte morphology prognostic of embryo

potential after ICSI? *Reprod BioMed Online* 2006; 12: 517-12.

Eichenlaub-Ritter U, Shen Y, Tinneberg H-R Manipulation of the oocyte: possible damage to the spindle apparatus *Reprod BioMed Online* 2002; 5: 117-24

Fang C, Mandy T, Li T, Peng WL, Zhou CQ, Zhuang GL, Leong M. Visualization of meiotic spindle and subsequent embryonic development in in-vitro and in-vivo matured human oocytes. *J Assist Reprod Genet* 2007; 24: 547-51.

Hardarson, T., Lundin, K., Hamberger, L. The position of the metaphase II spindle cannot be predicted by the location of the first polar body in the human oocyte. *Hum Reprod*, 2000; 15: 1372-76

Higgins JP, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG 2003 Measuring inconsistency in meta-analyses. *Br Med J* 327, 557-560.

Konc J, Kanyo K, Cseh S Visualization and examination of the meiotic spindle in human oocytes with Polscope. *J Assist Reprod Genet* 2004; 21:349-53.

Madaschi C, de Souza Bonetti TC, de Almeida Ferreira Braga DP Pasqualotto FF, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Spindle imaging: a marker for embryo development and implantation. *Fertil Steril* 2008; 90: 194-98.

Montag M, Schimming T, van der Van H Spindle imaging in human oocytes: the impact of the meiotic cell cycle. *Reprod BioMed Online* 2006; 12: 442-46.

Moon JH, Hyun CS, Lee SW, Son W Y, Yoon S Hy, Lim JH. Visualization of the metaphase II meiotic spindle in living human oocytes using Polscope enables the prediction of embryonic development competence after ICSI. *Hum Reprod* 2003; 18: 817-20.

Rama Raju GA, Prakash GJ, Krishna KM, Madan K Meiotic spindle and zona pellucida characteristics as predictors of embryonic development: a preliminary study using polscope imaging *Reprod BioMed Online* 2007; 14: 166-74

Rienzi L, Ubaldi F, Martinez F, Iacobelli M, Minasi MG, Ferrero S, Tesarik J, Greco E Relationship between meiotic spindle location with regard to the polar body position and oocyte development potential after ICSI. *Hum Reprod* 2003; 18: 1289-93.

Shen Y, Staf T, Mehnert C, De Santis L, Cino I, Tinneberg H-R, Eichenlaub-Ritter U. Light retardance by human oocyte spindle is positively related to pronuclear score after ICSI. *Reprod BioMed Online* 2006; 12: 737-51.

Silva CS, Kapura K, Odenberg R, Keefe DL The first polar body does not predict accurately the location of the metaphase II meiotic spindle in mammalian oocytes. *Fertil Steril* 1999; 71: 719-21.

Taylor TH, Gitlin S, Wrigth G, Mitchell-Leef D, Kort HI, Nagy ZP The meiotic spindle of human oocytes as viewed under the oosight and its relationship to chromosomal aneuploidy of subsequent embryo *Hum Reprod* 2006; 21(Suppl.1):i23

Varghese AC, Goldberg E, Agarwal A Current and future perspectives on intracytoplasmic sperm injection: a critical commentary. *Reprod BioMed Online* 2007; 15: 719-27.

Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Keefe DL Developmental ability of human oocytes with or without birefringent spindles imaged by polscope before insemination. *Hum Reprod* 2001a; 16:1464-68.

Wang W, Meng L, Hackett RJ, Odenbourg R, Keefe DL The spindle observation and its relationship with fertilization after intracytoplasmic sperm injection in living human oocytes. *Fertil Steril* 2001b; 75: 348-53

Wang W H, Meng L, Hackett RJ, Odenbourg R, Keefe DL Rigorous thermal control during intracytoplasmic sperm injection stabilizes the meiotic spindle and improves fertilization and pregnancy rates. *Fertil Steril* 2002; 77: 1274-77.

Wang, W.H., Keefe, D.L. Prediction of chromosome misalignment among in vitro matured human oocytes by spindle imaging with the PolScope. *Fertil Steril*, 2002; 78:1077-81

A summary for members of ASRM

Um resumo para os membros da ASRM

I am sure all of us have followed with interest and concern the unfolding story of the Suleman octuplets in California. I wanted to take a moment to share with you some of what ASRM and SART have been doing in response.

Our Public Affairs office began taking calls (after business hours on the East Coast) the evening the birth of the octuplets was announced on Wednesday, January 28. In these early days of the story we focused on reminding the media that while the successful delivery of the octuplets was novel, such a high order multiple birth should not be considered a desirable medical outcome.

On Friday January 30th an interview with the children's grandmother made it appear that IVF treatment had indeed been involved. That morning we released a statement from ASRM President Dale McClure MD. That statement emphasized that we did not have the facts in this case, but that in recent years ASRM and SART had been working very hard, and with a fair amount of success, to reduce the number of high order multiple births. (That statement, and all our press releases are available at www.asrm.org.) By weeks end the Public Affairs Office had responded to well over 100 calls, and ASRM staff and leaders had done dozens of interviews.

Over the course of the next week, the volume of media calls remained very, very high. However, since no new information emerged, the media questions and coverage became increasingly speculative in nature. Because we did not feel it was responsible to engage in that speculation, we began to curtail our responsiveness. Meanwhile, SART sent a communication to its membership seeking any information anyone had on the situation.

As the Today show began to air its interview with the mother on February 6, she indicated all her children were the result

of IVF and all from the same physician, and subsequent media reports named the physician. On Monday February 9, ASRM President McClure issued another statement, again emphasizing the field's success in reducing the number of high order multiples, and indicating we were interested in looking into the matter. On Tuesday, February 10th I sent a letter to the California Medical Board stating our interest in this matter and our willingness to assist them in their inquiry. SART President Elizabeth Ginsburg, MD sent a letter to the physician named in media reports to ask for information about the treatment of this patient.

Examining and learning from both successful and unsuccessful cases is a vital component of medical education and an important tool in improving clinical practice. We are seeking information so that all of us may better understand how to avoid additional extreme high order multiple births. Moreover, we have all worked too hard to improve care and reduce the number of high order multiples to allow one unfortunate outcome to taint the whole field. Both ASRM and SART have membership standards and disciplinary procedures and should the facts warrant, those procedures will be used.

It is important to note that we do not have all the facts. At present I would say we have very little information, and most of what we think we know has come from sometimes conflicting media reports. All of us need to be very cautious before coming to any conclusions. We will keep you informed as additional information becomes available.

Robert W. Rebar, M.D.

Executive Director

American Society for Reproductive Medicine

O impacto da adenomiose na infertilidade

The adenomyosis impact on infertility

Haydée Castro Neves dos Santos^{1 2}, Cláudio Crispi²

1-G&O Barra RJ Reprodução Humana

2- Instituto Fernandes Figueira-FIOCRUZ. Pós-graduação de Videoendoscopia Ginecológica.

RESUMO

A adenomiose é uma doença relacionada à presença de glândulas e estroma endometrial na musculatura uterina, em profundidade e extensão variáveis. Sua incidência é estimada em torno de 20% a 30%. O diagnóstico de adenomiose tem como padrão-ouro o estudo histopatológico do útero pós-histerectomia. Dentre os métodos não-invasivos, a ressonância nuclear magnética apresenta a melhor acurácia. Dismenorréia e menorragia são os principais sintomas relacionados à adenomiose. Há evidências que a adenomiose possa atuar como um fator gerador de infertilidade feminina, associada ou não à presença de endometriose. Os mecanismos atribuídos à adenomiose e relacionados à infertilidade são pouco esclarecidos. Segundo a literatura consultada, o principal fator envolvido é a interferência da disperistalse ou hiperperistalse uterina no transporte espermático. Fatores imunológicos e falha na implantação embrionária são citados, apesar de estudos recentes sugerirem que as taxas de implantação em ciclos de fertilização *in vitro* não são modificadas na presença de adenomiose.

Palavras-chave: adenomiose, infertilidade, endometriose, **fisiopatologia**.

ABSTRACT

Results: *Adenomyosis is a disease in which endometrial glands and stroma are present within the myometrium, with different degrees and extension. The incidence of adenomyosis is around 20 – 30%. The gold standard diagnosis is the histological examination of the uterus obtained by hysterectomy. Among the non-invasive methods, the magnetic resonance imaging has the best accuracy. The major symptoms of adenomyosis are dysmenorrhea and menorrhagia. There are also evidences that adenomyosis acts as a cause of infertility with or without endometriosis association. Adenomyosis infertility causing factors are still unknown. The major factor related in literature is the impaired sperm transport caused by uterine dysperistalsis or hyperperistalsis. Immunological factors and impaired embryo implantation are mentioned but recent studies suggest that the implantation rates in in vitro fertilization cycles are the same in adenomyosis patients.*

Key words: *adenomyosis; infertility; endometriosis; physiopathology*

Agradecimentos: docentes da Pós-Graduação, em especial à Dra Karen Panisset.

INTRODUÇÃO

A adenomiose é afecção ginecológica freqüente, de etiologia desconhecida, primariamente descrita por Rokitansky em 1860. É caracterizada pela presença de estroma e glândulas endometriais no miométrio que formam lesões localizadas ou difusas. O tecido endometrial ectópico induz a hipertrofia e hiperplasia do miométrio adjacente e interfere nos movimentos peristálticos uterinos. As manifestações clínicas parecem ser proporcionais à extensão da doença e à profundidade da invasão miometrial.

A incidência de adenomiose é estimada em torno de 20 a 30% em úteros provenientes de histerectomia e em torno de 1% na população feminina geral (Azzi&, 1989, Kim e Strawn, 2000). A incidência é maior na quarta e quinta décadas de vida. Multíparas são mais acometidas, apesar de haver um número crescente de estudos que citam a adenomiose como fator causador de infertilidade.

Um terço das pacientes é assintomática. Menorragia e dismenorréia acometem, respectivamente, 60 e 25% das pacientes portadoras de adenomiose. Sintomas como dispareunia e metrorragia são menos freqüentes. A incidência de casos de infertilidade feminina atribuída à adenomiose não é conhecida, uma vez que seu diagnóstico é extremamente difícil e freqüentemente está associado a outras doenças ginecológicas, em especial a endometriose. Kunz *et al* (2005) descrevem a presença de adenomiose em cerca de 90% das pacientes inférteis portadoras de endometriose, diagnosticadas por ressonância nuclear magnética (RNM).

Diagnóstico de adenomiose na paciente infértil

Acredita-se que o avançar da idade das mulheres interessadas em gestar levará os centros de infertilidade a diagnosticar um número cada vez maior de casos de adenomiose. Uma grande parcela das pacientes inférteis encontra-se acima da faixa de trinta anos de idade, quando a adenomiose é mais prevalente. Estas pacientes são submetidas

a uma propedêutica exaustiva, na qual a investigação direcionada de adenomiose não é usual, mas tornou-se mais freqüente com a evolução dos métodos de imagem.

O diagnóstico definitivo de adenomiose é a análise histopatológica do útero obtido por histerectomia. Nos casos de infertilidade em que há suspeita de adenomiose, o uso de métodos não-invasivos faz-se necessário. A ultra-sonografia transvaginal, a histerossalpingografia (HSG), a video-histeroscopia e a ressonância nuclear magnética (RNM) são exames complementares capazes de sugerir a presença de adenomiose, com acurácias bastante variáveis.

A ultra-sonografia transvaginal e a histerossalpingografia são métodos utilizados como rotina nos centros de infertilidade. Ocasionalmente, podem estabelecer o diagnóstico não-invasivo da adenomiose, porém com especificidade e sensibilidade insatisfatórias. A imagem característica à histerossalpingografia constitui o raro aspecto em "favo de mel", com múltiplas e pequenas saculações que penetram no miométrio.

A ultra-sonografia transvaginal apresenta sensibilidade que varia de 46 a 100% para o diagnóstico da adenomiose, segundo revisão da literatura realizada por Levgur (2007). Sua especificidade varia de 50 a 100% (Wéry *et al*, 2005). Diversas alterações à ultra-sonografia são descritas como sugestivas de adenomiose. Eco miometrial difusamente heterogêneo, forma uterina globosa e cistos miometriais são alguns dos achados mais relacionados à adenomiose. A distinção de adenomioma e fibroma uterino pela ultra-sonografia é extremamente difícil e constitui uma limitação do método. Os critérios diagnósticos de adenomiose à ultra-sonografia são variáveis, há significativa variação interobservador e a experiência do examinador é fundamental. Há, portanto, a tendência de complementar a investigação de adenomiose com outros métodos, em especial a ressonância nuclear magnética (RNM), antes de definir a conduta clínica ou cirúrgica.

A vídeo-histeroscopia também é utilizada com freqüência na propedêutica da infertilidade ou pré-ciclos de fertilização *in vitro* (FIV). É mandatória nas pacientes sintomáticas, com sangramento uterino anormal, pela importância de diagnosticar ou afastar outras causas de sangramento. As alterações perceptíveis à histeroscopia não são patognômicas mas podem sugerir o diagnóstico de adenomiose. São elas: superfície endometrial irregular, vascularização atípica, lesões císticas hemorrágicas e orifícios diverticulares. A biópsia endometrial, mesmo quando dirigida pela vídeo-histeroscopia, não define o diagnóstico de adenomiose, uma vez que suas alterações características encontram-se no miométrio e não na superfície endometrial. A biópsia miometrial pode ser obtida com ressectoscópio pela vídeo-histeroscopia cirúrgica, através de agulha transcervical ou obtida por vídeo-laparoscopia. Apresenta sensibilidade de apenas 8 a 18% (Molinas *et al*, 2006). Em pacientes com sinais sugestivos de adenomiose à ultra-sonografia transvaginal, a biópsia miometrial com ressectoscópio apresenta sensibilidade satisfatória de 82% (Pace, 2000). Apesar de constituir ferramenta diagnóstica promissora, a biópsia miometrial **pode?** causar dano miometrial indesejável às pacientes inférteis **e** parece não acrescentar sensibilidade

aos métodos não-invasivos, especialmente a ressonância nuclear magnética.

Atualmente, a RNM é considerada o método não-invasivo de melhor acurácia no diagnóstico da adenomiose. As imagens ponderadas em T2 são especialmente eficazes na diferenciação dos tecidos. As imagens são reprodutíveis e não são tão dependentes do executor do método. As lesões adenomióticas têm baixa intensidade de sinal nas imagens ponderadas em T2. A medida espessada da zona juncional (ZJ), referente ao miométrio subendometrial, é o principal critério utilizado no diagnóstico de adenomiose. A espessura mínima ou "ponto de corte" da zona juncional considerada alterada é variável segundo revisão de Kissler *et al* (2007). Medidas iguais ou maiores que 12 mm correspondem a uma acurácia bastante elevada. Medidas entre 8 mm e 12 mm de espessura devem ser acompanhadas de lesões secundárias para diagnóstico de adenomiose com boa acurácia. Medidas da espessura da ZJ menores que 8 mm são consideradas normais. Lesões miometriais secundárias e adenomiomas também são critérios utilizados no diagnóstico de adenomiose pela RNM.

Adenomiose associada à endometriose

A associação de endometriose e infertilidade é amplamente estudada. A distorção da arquitetura pélvica, o fator tubo-peritoneal e a qualidade oocitária são alguns pontos de efeito da endometriose aparentemente capazes de interferir no resultado reprodutivo. Kunz *et al*. (2000), demonstraram a presença de adenomiose em cerca de 90% das pacientes inférteis portadoras de endometriose. Barrier *et al*. (2004), em estudo com babuínos, associaram a presença de adenomiose à infertilidade primária de longa data, mesmo quando excluídos os casos de endometriose concomitante. Estes dados sugerem um efeito próprio da adenomiose na fertilidade, muitas vezes presente e não diagnosticada nos casos de endometriose.

Mecanismos da infertilidade atribuída à adenomiose

Estudos recentes apontam um real impacto da adenomiose na infertilidade. Sua dimensão e os fatores envolvidos nesta relação não são esclarecidos. A adenomiose tem repercussões na função miometrial, imunológica e hormonal uterina. O estudo individual de cada função é extremamente difícil, assim como a dissociação da adenomiose e endometriose nas pacientes inférteis.

A adenomiose acomete especialmente o miométrio subendometrial e, por vezes, camadas mais profundas do miométrio. A interface endométrio-miometrial é a junção do endométrio basal e miométrio subendometrial, ambos originários dos ductos paramesonérficos. Sua integridade é considerada essencial no transporte espermático, implantação embrionária, implantação placentária e na menstruação.

A zona juncional miometrial ou miométrio subendometrial é composta de feixes longitudinais de fibras musculares lisas paralelas ao endométrio, com cerca de 5 mm de espessura. A expressão cíclica de receptores de estrogênio e progesterona é exclusiva desta porção do miométrio. A contratilidade do miométrio subendometrial pode

ser anterógrada ou retrógrada, conforme a fase do ciclo menstrual. Este movimento peristáltico teria papel fundamental na eliminação do fluxo na fase menstrual, no transporte espermático na fase pré-ovulatória, e no momento da implantação embrionária.

1) O transporte útero-tubário

Leyendecker *et al.* 1996, conduziram um estudo com pacientes inférteis portadoras e não-portadoras de endometriose. Os movimentos uterinos foram registrados em diferentes fases do ciclo por histerossalpingocintigrafia e por sonografia vaginal da peristalse uterina. O achado foi sugestivo de alterações significativas da peristalse uterina nas pacientes com endometriose. Estas alterações de motilidade foram denominadas disperistalse e hiperperistalse. O movimento uterino fisiológico descrito consiste em contrações fundo-cervicais na fase menstrual, a fim de eliminar os resíduos, e cérvico-fúndicas ritmadas na fase folicular tardia, dirigidas à tuba ipsilateral do folículo dominante. A disperistalse e a hiperperistalse poderiam estar relacionadas à infertilidade ao impedir o transporte passivo dos espermatozóides nesta fase.

A adenomiase foi associada a estes achados por diversos outros autores. Kissler *et al.* 2007 estudaram separadamente os casos de endometriose, adenomiase focal e difusa e um grupo controle. O transporte útero-tubário foi avaliado por histerossalpingocintigrafia com 99-Tc. O padrão fisiológico observado foi o direcionamento dos marcadores à tuba ipsilateral do folículo dominante ou o transporte bilateral, apresentados por 70-80% do grupo controle. O transporte contralateral – relacionado à hiperperistalse, e a falência do transporte – relacionado à disperistalse foram considerados patológicos. As pacientes com adenomiase focal e difusa apresentaram, respectivamente, um transporte útero-tubário patológico em 54% e 78,5% dos casos. As pacientes com endometriose apresentaram um padrão alterado em 33% dos casos.

Acredita-se que a degeneração do miométrio subendometrial e o maior número de receptores de estrogênio no tecido adenomiótico tenham algum papel nas alterações da peristalse uterina.

Menores taxas de gravidez espontânea, em ciclos programados e em inseminação intra-uterina foram observadas nas pacientes portadoras de adenomiase ou endometriose com parâmetros patológicos de peristalse uterina. (Kissler *et al.*, 2005). Estes estudos sugerem que a fertilização *in vitro* seria a melhor opção terapêutica para a infertilidade associada à adenomiase.

2) Implantação embrionária

Teoricamente, a implantação embrionária nas pacientes com adenomiase seria prejudicada pela peristalse uterina incoordenada. No entanto, estudos em ciclos de transferência de embriões não demonstraram diferenças nas taxas de gravidez das pacientes com diagnóstico ultrasonográfico de adenomiase (Camargo *et al.*, 2001).

3) Fatores químicos e imunológicos

Há evidências de uma maior expressão da enzima óxido nítrico sintetase endometrial nas pacientes com adeno-

miase. O óxido nítrico tem ação vasodilatadora e, em níveis elevados, parece afetar a função espermática e a implantação embrionária (Matalliotakis *et al.*, 2005).

Os parâmetros imunológicos endometriais parecem ser alterados na adenomiase e estimulam respostas atípicas. Uma produção persistente e aumentada de óxido nítrico por macrófagos ou células endometriais cria um ambiente endometrial hostil à fertilização e à implantação e pode ser associado também à incidência de abortamento precoce.

Considerações finais

Os centros de reprodução humana recebem um número crescente de pacientes com idade em torno de 30 a 40 anos, quando a adenomiase é mais freqüente. O diagnóstico não-invasivo da adenomiase evoluiu drasticamente com a RNM, o que contribuiu para estabelecer uma associação entre adenomiase e infertilidade cada vez mais clara. Os diversos mecanismos capazes de interferir na fertilidade das mulheres portadoras de adenomiase são relacionados ao transporte espermático útero-tubário, prejudicado pelos movimentos peristálticos uterinos patológicos, e aos fatores químicos e imunológicos que parecem ser alterados.

A investigação rotineira de adenomiase nas pacientes inférteis com RNM é proposta por alguns autores, mas seu real benefício não é bem esclarecido. Acredita-se que, nas pacientes inférteis com adenomiase, os ciclos de coito programado ou inseminação intra-uterina não seriam bem indicados, mesmo em vista de tubas patentes, uma vez que o transporte espermático útero-tubário é patológico. A fertilização *in vitro* seria, em tese, a melhor opção para este grupo de pacientes. Estas afirmações carecem de um maior número de estudos na medida em que impõem um relevante aumento de custo na propedêutica e tratamento da infertilidade.

Endereço para correspondência:

Av das Américas 4666, sala 312/313. Barra da Tijuca.
CEP: 22649-900. Rio de Janeiro, RJ. Tel: 55-21-24309060.
e-mail: haydeecns@gmail.com; g&obarra@cmb.com.br

Referências Bibliográficas

- Azziz R. Adenomyosis: current perspectives. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1989; 16: 221-35.
- Barrier BF, Malinowski MJ, Dick EJ Jr *et al.* Adenomyosis in the baboon is associated with primary infertility. *Fertil Steril* 2004 Oct; 82 Suppl 3: 1091-4.
- Camargo F, Gaytan J, Caligara C *et al.* Impact of ultrasound diagnosis of adenomyosis on recipients of sibling oocytes. *Fertil Steril* 2001; 76:111.
- Deffieux X, Fernandez H. Physiopathologic, diagnostic and therapeutic evolution in the management of adenomyosis: review of the literature. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2004 Dec; 33(8): 703-12.
- Devlieger R, D'Hooghe T, Timmerman D. Uterine adenomyosis in the infertility clinic. *Hum Reprod Update* 2003 Mar-Apr; 9 (2): 139-47.
- Guo SW, Wang Y. Sources of heterogeneities in estimating the prevalence of endometriosis in infertile and previously fertile women. *Fertil Steril* 2006 Dec; 86(6): 1584-95.
- Kissler S, Hamscho N, Zangos S *et al.* Diminished pregnancy rates in endometriosis due to impaired uterotubal trans-

port assessed by histerosalpingocintigraphy. BJOG 2005 Oct; 112(10): 1391-6.

Kissler S, Zangos S, Wiegratz I *et al.* Utero-tubal sperm transport and its impairment in endometriosis and adenomyosis. Ann N Y Acad Sci 2007 Mar; 7; [Epub ahead of print].

Kunz G, Beil D, Huppert P *et al.* Adenomyosis in endometriosis – prevalence and impact on fertility. Evidence from magnetic resonance imaging. Hum Reprod 2005 Jun ; 20 (8) : 2309-16.

Levgur M, Abadi M, Tucker A. Adenomyosis: Symptoms, Histology, and Pregnancy Terminations. Obstet Gynecol 2000 May; 95(5): 688-91.

Leyendecker M. Diagnosis of adenomyosis: a review. J Reprod Med 2007; 52: 177.

Leyendecker G, Kunz G, Kissler S, Wildt L. Adenomyosis and reproduction. Best Pract Res Clin Obstet Gynecol 2006 Aug; 20(4): 523-46.

Leyendecker G, Kunz G, Wildt L, Deininger H. Uterine hyperperi-

stalsis and dysperistalsis as dysfunctions of the mechanism of rapid sperm transport in patients with endometriosis and infertility. Hum Reprod 1996; 11(7): 1542-51.

Mataliotakis IM, Katsikis IK, Panidis DK. Adenomyosis: what is the impact on fertility? Curr Opin Obstet Gynecol 2005 Jun; 17(3): 261-4.

Molinas C, Campo R. Office hysteroscopy and adenomyosis. Best Pract Res Clin Obstet Gynecol 2006 Aug; 20(4): 557-67.

Wang CJ, Yuen LT, Chang SD *et al.* Use of laparoscopic cytoreductive surgery to treat infertile women with localized adenomyosis. Fertil Steril 2006 Aug; 86(2): 462.e5-8.

Wéry O, Thille A, Gaspard U, van den Brule F. L'adenomyose: le point sur une pathologie méconnue. J Gynecol Obstet Biol Reprod 2005; 34(1): 633-48.

Zervomanolakis I, Ott HW, Hadziomerovic D *et al.* Physiology of upward transport in the human female genital tract. Ann N Y Acad Sci 2007 Apr; 1101: 1-20.

AGENDA DE EVENTOS PARA 2009

FEVEREIRO

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

MARÇO

11 a 14/03 - 2009 APGO/CREOG

ABRIL

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

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

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



Schering
Plough

Conheça a Red-Lara www.redlara.com

MAIO

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

JUNHO

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

Plenarium Organização de Eventos

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

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

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



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

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

AGOSTO

Agosto - Congresso Brasileiro de Reprodução Assistida (SBRA)

SETEMBRO

24 - 26/09 - American Urogynecologic Society

OUTUBRO

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

NOVEMBRO

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

SBRA

**SOCIEDADE BRASILEIRA DE
REPRODUÇÃO ASSISTIDA**

Venha para a SBRA!

Para ser sócio da SBRA:

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

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

Benefícios aos Associados:

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

