

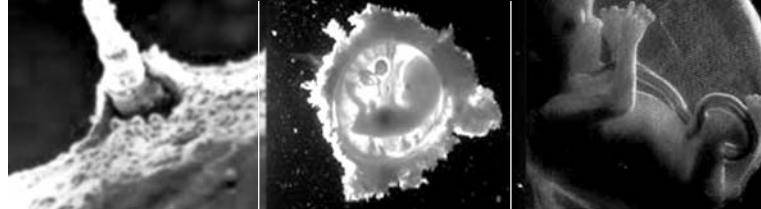
Volume 11
Número 2
Abril / Maio / Junho 2007
ISSN 1517-5693

JBRA

JORNAL BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA

ÓRGÃO DA
SOCIEDADE BRASILEIRA
DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA

Fotos: Lennart Nilsson "Images of Life"



JORNAL BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA

CORPO EDITORIAL NACIONAL

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

Consultor Editorial

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

Assistente Editorial

| | | |
|-----------------------------------|-----------|----|
| Christina de Albuquerque da Rocha | G&O Barra | RJ |
|-----------------------------------|-----------|----|

Editores Associados

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

Conselho editorial

| | | |
|-------------------------------|-----------------------|----|
| Adelino Amaral Silva | GENESIS | DF |
| Alejandro 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 | | SP |
| Humberto Ikuo Shibasaki | | 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 | PA |
| Luíz Fernando Dale | CENTRO DE MEDICINA DA REPRODUÇÃO | RJ |
| Marcos Sampaio | ORIGEN | MG |
| Mariangela Badalotti | FERTILITAT | RS |
| Marilza Vieira Rudge | UNESP Botucatu | SP |
| Mario Cavagna | Hospital Pérola Byington | SP |
| Newton Eduardo Busso | UNIFERT | SP |
| Paulo Franco Taitson | IRH | MG |
| Paulo Serafini | HUNTINGTON | SP |
| Paulo Spinola | CEPARH | BA |
| Renzo Antonini Filho | INSTITUTO DE SAÚDE DA MULHER | MG |
| Ricardo Melo Marinho | MATER DEI | MG |
| Roberta Wonchockier | PROJETO ALFA | SP |
| Roger Abdelmassih | Clinica e Centro de Reprodução Humana | SP |
| Rosana Maria dos Reis | Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto | SP |
| Sidney Glina | Hospital Israelita Albert Einstein | SP |
| Silvana Chedid | CEPERH | SP |

CORPO EDITORIAL INTERNACIONAL

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

I – Informações Gerais

O Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida (JBRA) é uma publicação oficial de comunicação da Sociedade Brasileira de Reprodução Assistida (SBRA – www.sbra.com.br), com periodicidade quadrimestral, e mais um suplemento com os trabalhos do Congresso Brasileiro da SBRA. Aceita trabalhos básicos e clínicos da área de Reprodução nas seguintes línguas: português, espanhol e inglês. As matérias para publicação devem ser inéditas, na forma de artigos originais, artigos de atualização, relatos de caso, opiniões. Os textos devem vir acompanhados de carta assinada pelos autores, e serão encaminhados para avaliação por membros do Conselho Editorial, a serem designados pelo Editor. Após esta avaliação, os trabalhos são reencaminhados aos autores para possíveis correções, retornando ao avaliador para então serem aprovados ou não à publicação.

Os trabalhos devem ser enviados para:

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

II – Apresentação dos Trabalhos

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

Primeira Página

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

Segunda Página

Abstracts (o resumo deve, obrigatoriamente, ser escrito na língua do texto e em inglês)
 Caso o artigo seja em inglês, fazer um resumo em português.
 Key words / Palavras-chave: ver <http://decs.bvs.br>

Terceira e demais páginas

Texto

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

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

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

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

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

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

III – Referências

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

1. Artigos em periódicos

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

2. Capítulos de Livros

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

3. Livros

Wolf D. P., Quigley M. M. (eds) – Human “in vitro” fertilization and embryo transfer. New York: Plenum Press, 1984.
 OBS: Não fazer citações das referências através de números. Exemplo: Na pesquisa o fator imunológico (1).

IV – Ilustrações

As tabelas, gráficos, figuras e fotografias devem ser enviadas em folhas separadas, numeradas em algarismos romanos e com legendas individualizadas, ao final do trabalho. As fotografias devem ser em preto e branco, sendo que as despesas com eventual reprodução de fotografias coloridas devem ser discutidas. Poderão também ser enviadas via internet.

DIRETORIA DA SBRA - 2007/2008

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

Departamento de Publicações

Editora: Maria do Carmo Borges de Souza
Assistente Editorial: Christina de Albuquerque da Rocha
e-mail: journalsbra@cmb.com.br

EDITORIAL**Super-ICSI**

João Batista Alcantara Oliveira _____ 6

ARTIGO ORIGINAL**Marcador da Resposta Folicular ao Hormônio Folículo Estimulante pelo Hormônio Anti-Mülleriano em Mulheres Ovulatórias**

Juliano Brum Scheffer, Daniel H. Méndez Lozano, René Frydman, Renato Fanchin _____ 9

Análise sobre a Resolução da ANVISA, RDC nº 33, que Aprova o Regulamento Técnico para o Funcionamento dos Bancos de Células e Tecidos Germinativos. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 20 de fevereiro de 2006.

Eduardo Pandolfi Passos; Dirceu Henrique Mendes Pereira; Álvaro Petracco; Claudia Petersen; Maria do Carmo Borges de Souza; Péricles Assad Hassun Filho; Carlos Gilberto Almodin; Eduardo Leme Alves da Motta _____ 14

Competência Reprodutiva dos Oócitos Obtidos Através do Flushing Folicular em Baixas Respondedoras

Juliano Brum Scheffer, Daniel H. Méndez Lozano, René Frydman, Renato Fanchin _____ 17

ARTIGO DE REVISÃO**Princípios da Criopreservação e uma Revisão da Criopreservação de Espermatozóides Humanos**

Paulo Franco Taitson; Luiza Alves Romano _____ 22

Fator Aloimune do Abortamento Espontâneo Recorrente: A Imunoterapia pode ser Útil?

Haytum del Carmen Orozco Amador, Maria do Carmo Borges de Souza, Ricardo M. de Oliveira _____ 27

ARTIGO DE OPINIÃO**SBRA, SBRH, PRONUCLEO e FEBRASGO buscam a ANVISA para iniciar revisão da RDC 33.**

Eduardo Pandolfi Passos; Dirceu Henrique Mendes Pereira; Álvaro Petracco; Cláudia Petersen; Maria do Carmo Borges de Souza _____ 35

EVENTOS

_____ 41

Super-ICSI

Em reprodução assistida, a seleção dos gametas visando melhores resultados clínicos é tarefa crucial para os embriologistas. Esta questão tem particular relevância quando considerações religiosas, éticas ou legais limitam o número de óvulos a serem fertilizados e, conseqüentemente, a formação de embriões supranumerários.

Hoje sabe-se que danos no DNA dos espermatozoides poderiam explicar falhas na obtenção de embriões pela técnica da ICSI. Além disso, produziram um aumento das taxas de abortamento precoce. Em janeiro de 2007, pesquisadores da Universidade de Tel-Aviv (Strassburger *et al*, 2007), demonstraram que a incidência de aberrações cromossômicas tem correlação positiva com a morfologia anormal do espermatozoide, ou seja, quanto mais severa a anormalidade morfológica maior a incidência de alterações genéticas nestes espermatozoides.

Habitualmente, a ICSI é realizada empregando microscópio que permite a visualização do espermatozoide com um aumento de 400 vezes. Recentemente, um sofisticado sistema de lentes de amplificação de imagens, com o qual se obtém aumento de 6.000 a 12000 vezes, possibilitou a avaliação detalhada de características dos espermatozoides (acrossoma, lâmina pós-acrossomal, peça intermediária, mitocôndrias, cauda e núcleo), aprimorando, desse modo, a seleção do espermatozoide a ser utilizado para a ICSI. Injeção intracitoplasmática de espermatozoide morfológicamente selecionado (*intracytoplasmic morphologically selected sperm injection - IMSI*) e ICSI com alta magnificação (*High-magnification ICSI*) são denominações para esta nova ICSI realizada com espermatozoides selecionados através do emprego de grandes aumentos no microscópio. Particularmente, preferimos a denominação de SUPER-ICSI, atribuída por Franco Jr, que acreditamos ser de mais fácil assimilação.

Os resultados com o emprego da SUPER-ICSI relatados na literatura mostram-se animadores. Bartoov *et al* (2003), em população de 66 casais com pelo menos duas falhas prévias (ausência de gravidez) em ciclos de ICSI, obtiveram taxa de gravidez de 66% com o emprego da SUPER-ICSI contra uma taxa de gravidez de 30% com a ICSI convencional ($p \leq 0.01$). Berkovitz *et al* (2005), relataram que quando a ICSI era realizada apenas com espermatozoides que apresentavam núcleos normais (avaliados pelo SUPER-ICSI) as taxas de implantação e gravidez eram mais altas e a taxa de abortamento mais baixa em comparação aos ciclos em que foram empregos espermatozoides com alguma alteração nuclear (25.0 ± 25.9 versus $5.9 \pm 12.9\%$, $p \leq 0.01$; 52.6 versus 18.4% , $p \leq 0.01$; 10.0 versus 57.1% , $p \leq 0.02$, respectivamente). Em estudo posterior (Berkovitz *et al* (2006a), com 80 casais, confirmaram taxas de gravidez mais elevadas e taxa de abortamento mais baixas quando o SUPER-ICSI era aplicada em comparação ao ICSI tradicional (60.0 versus 25.0% , e 14 versus 40% respectivamente, $p < 0.05$).

Em outro estudo, Berkovitz *et al* (2006b) referem taxas de gravidez mais baixa e de abortamento mais elevadas quando foram transferidos embriões provenientes de microinjeção com espermatozoides com núcleo com forma normal, mas apresentando vacúolos largos, em comparação a ciclos em que foram transferidos embriões provenientes de microinjeção com espermatozoides com núcleo de característica normais a avaliação morfológica do SUPER-ICSI (18 versus 50%, e 80 versus 7%, respectivamente, $p = 0.01$).

No Congresso da Sociedade Européia de Reprodução Humana (ESHRE) de 2004, Junca *et al* apresentaram estudo em que observaram taxas mais altas de fertilização e gravidez quando SUPER-ICSI era utilizado em comparação com os resultados de ICSI tradicional ($70\% \times 50.5\%$ e $60\% \times 0$ respectivamente $p < 0.01$) em casais com pelo menos 2 tentativas de ICSI sem sucesso ou com severa teratozoospermia. No ESHRE de 2007, Bach *et al*. vão apresentar resultado de estudo comparando o desenvolvimento de embriões provenientes do ICSI clássico com aqueles provenientes da técnica do SUPER-ICSI. Os dados revelam um número maior de embriões atingindo a fase de blastocisto e qualidade embrionária superior.

Nos últimos meses, temos utilizando a técnica em todos os procedimentos, com bons resultados ainda que apenas iniciais. De qualquer modo, a SUPER-ICSI enquadra-se dentro da filosofia de busca por melhores resultados, expressos no aperfeiçoamento da seleção dos gametas para a obtenção de embriões de melhor qualidade.

REFERÊNCIAS

- Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosovsky A, Yagoda A, Lederman H, Artzi S, Gross M, Barak Y Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection Fertil Steril; 80 1413-1419, 2003
- Berkovitz A, Eltes F, Yaari S, Katz N, Barr I, Fishman A, Bartoov B The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm Hum. Reprod., 20:185-190, 2005.
- Berkovitz A, Eltes F, Lederman H, Peer S, Ellenbogen A, Feldberg B, Bartoov B How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection Reprod BioMed Online, 12,634-638 2006a
- Berkovitz A, Eltes F, Ellenbogen A, Peer S, Feldberg D, Bartoov B Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome? Hum Reprod, 21: 1787 - 1790, 2006b
- Junca AM, Dumont-Hassan M, Couvret F, Cohen-Bacrie P, Le Meur A, Hazout A (2004) Hum. Reprod., 19(Suppl. 1):i54
- Strassburger D, Reichart M, Kaufman S, Kasterstein E, Komarovskiy D, Bern O, Friedler S, Schachter M, Ron-El R, Raziel A Morphology assessment and fluorescence in situ hybridization of the same spermatozoon using a computerized cell-scanning system Hum Reprod 22:201 - 209. 2007

João Batista Alcantara Oliveira

Centro de Reprodução Humana Professor Franco Jr

Marcador da Resposta Folicular ao Hormônio Folículo Estimulante pelo Hormônio Anti-Mülleriano em Mulheres Ovulatórias

Marker of Follicular Responsiveness to Follicle-Stimulating Hormone by Anti-Müllerian Hormone in Normo-Ovulating Women

Juliano Brum Scheffer, Daniel H. Méndez Lozano, René Frydman, Renato Fanchin

Center: Departments of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Medicine (J.B.S., R.F., D.H.M.L., R.F.), Clamart, France

Endereço para correspondência:

Address all correspondence and requests for reprints to: Juliano Scheffer, M.D., Department of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Medicine, Hôpital Antoine Béchère, 157, rue de la Porte de Trivaux, 92141, Clamart, France. Tel: 33 0 0145374465. Email: julianoscheffer@hotmail.com

ABSTRACT

During the luteal-follicular transition, FSH is required for survival and further growth of a fraction of ovarian follicles. Basic research data have suggested the relationship between serum AMH levels and antral follicle responsiveness to exogenous FSH.

OBJECTIVE

To assess the possible relationship between serum AMH levels and antral follicle responsiveness to exogenous FSH.

DESIGN: PROSPECTIVE STUDY.

Patients and Methods: We studied 116 IVF-ET candidates undergoing controlled ovarian hyperstimulation (COH) with GnRH agonist and FSH. After the achievement of pituitary suppression and before FSH administration (baseline), serum AMH levels were measured. The number of antral follicles was determined by ultrasound at baseline (small antral follicles; 3-10 mm) and on the day of hCG administration (dhCG; preovulatory follicles; ≥ 16 mm).

RESULTS

At baseline, median (ranges) serum AMH, E_2 , and P_4 levels were 3.53 (0.71-8.59) ng/mL, 31 (30-50) pg/mL, and 0.25 (0.1-

1.6) ng/mL, and median number of early antral follicles were 17 ± 0.25 . Serum AMH levels showed a positive correlation with preovulatory follicles on dhCG ($r=0.23$; $P < 0.01$), and oocytes obtained ($r=0.38$; $P < 0.0001$).

CONCLUSIONS

These data demonstrate a strong association between day 3 serum AMH level and IVF outcome. AMH may offer greater prognostic value than other currently available serum markers of assisted reproductive technology ART outcome.

Key words: Anti-Müllerian hormone / AMH / FSH / Controlled ovarian hyperstimulation.

RESUMO

Durante a transição da fase luteal a folicular, FSH é necessário para a sobrevivência e crescimento de uma fração de folículos ovarianos. Pesquisas têm sugerido a relação do nível sérico do AMH com a resposta folicular ao FSH.

OBJETIVO

Avaliar a possível relação entre o nível sérico do AMH e a resposta do folículo antral ao FSH exógeno.

DESENHO: ESTUDO PROSPECTIVO.

Pacientes e Métodos: Nós estudamos 116 candidatas a fertilização in vitro e transferência embrionária (FIV-TE)

Recebido em 06/02/07
Avaliado e aceito em 07/06/07

submetidas à estimulação ovariana controlada com agonista de GnRH e FSH. Depois de atingir a supressão da hipófise e antes da administração do FSH (*baseline*), o nível sérico do AMH foi avaliado. O número de folículos antrais foi determinado pelo ultrassom (pequenos folículos antrais; 3-10 mm) e no dia da administração do hCG (dhCG; folículos préovulatórios; ≥ 16 mm).

RESULTADOS

Baseline, o nível sérico mediano de AMH, E_2 , e P_4 foram 3.53 (0.71-8.59) ng/mL, 31 (30-50) pg/mL, e 0.25 (0.1-1.6) ng/mL, e o número mediano de folículos antrais precoce foi 17 ± 0.25 . O nível sérico do AMH mostrou uma correlação positiva com o número de folículos préovulatórios no dia do hCG ($r=0.23$; $P < 0.01$), e óocitos obtidos ($r=0.38$; $P < 0.0001$).

CONCLUSÃO

Esses dados demonstram a forte associação entre o nível sérico do AMH (d3) e as consequências da FIV-ET. AMH pode proporcionar um maior valor prognóstico do que outros marcadores séricos disponíveis atualmente das consequências do tratamento de reprodução assistida.

Palavras-chave: Hormônio anti-mülleriano / AMH / FSH / Estimulação ovariana controlada.

INTRODUCTION

In women undergoing treatment for infertility, the predictive value of serum hormone parameters such as FSH, E_2 , and inhibin B remains somewhat controversial, and disappointing. Chronological age still appears to be the most reliable predictive factor (Chuang et al., 2003).

A serum marker that could be indicative of the pool of nongrowing, FSH-independent follicles before cyclic recruitment might better predict the ovarian response to ovulation induction for ART than current available serum markers.

In adult women, the physiological role of anti-Müllerian hormone (AMH), a peptide that exclusively is produced by the granulosa cells of ovarian follicles (Vigier et al., 1984), remains ill established. Basic research experiments suggest the involvement of AMH in the control of the primordial to primary follicle growth in mice (Durlinger et al., 2002). Moreover, growing evidence indicates that AMH is also implicated in the regulation of the responsiveness of early antral follicles to FSH. Indeed, Durlinger et al., 1999 have demonstrated that ovaries from 4-month-old, AMH-deficient mice contain more growing follicles as compared to those from wild-type matching controls. Later experiments conducted by the same investigators have shown that FSH administration increases the number of follicles and their pace of growth in AMH-deficient mice as compared with their wild-type littermates (Durlinger et al., 2001).

In these women, serum AMH levels measured on day 3 of the menstrual cycle have been positively associated to the strength of a subsequent ovarian response to controlled ovarian hyperstimulation (COH) (Seifer et al., 2002; Hazout et al., 2004; Fanchin et al., 2005). The quantitative relationship between AMH and ovarian response to COH may merely result from the positive correlation that exists between peripheral AMH levels and the number of early antral follicles on day 3 (De Vet et al., 2002; van Rooij et al., 2002; Pignyet al., 2003; Fanchin et al., 2003; 2005).

Hence, the aim of this study was to test the hypothesis that day 3 serum AMH may be a more useful prognostic marker of assisted reproductive technology ART outcome

MATERIAL AND METHODS

Subjects

We prospectively studied 116 infertile women, 21 to 41 years of age. All of them met the following inclusion criteria: 1) both ovaries present, deprived of morphological abnormalities, and adequately visualized in transvaginal ultrasound scans; 2) regular menstrual cycle lengths ranging between 25 and 35 days; 3) no current or past diseases affecting ovaries or gonadotropin or sex steroid secretion, clearance, or excretion; 4) no clinical signs of hyperandrogenism; 5) body mass indexes (BMI) ranging from 18-25 kg/m²; 6) number of early antral follicles (3-10 mm in diameter) < 24 ; 7) no endometriosis. Infertility was due to sperm abnormalities (54%), tubal abnormalities (29%), or was unexplained (17%). An informed consent was obtained from all women and this investigation received the approval of our internal Institutional Review Board.

Controlled ovarian hyperstimulation protocol

All women received a time-release gonadotropin releasing-hormone (GnRH) agonist, triptorelin (3 mg/day IM, Decapeptyl, Beaufour Ipsen Pharma, Paris, France) on cycle day 1. Three weeks later, complete pituitary desensitization was confirmed by the detection of low serum levels of E_2 and gonadotropins. Patients also underwent a conventional ultrasound examination to exclude ovarian cysts and to verify that endometrial thickness was < 5 mm. Recombinant FSH therapy (Gonal-F, Serono Pharmaceuticals, Boulogne, France) was then initiated at a dosage of 225 IU/day and continued until the day of hCG administration (Gonadotrophine Chorionique "Endo", Organon Pharmaceuticals, Saint-Denis, France, 10,000 IU, IM). After the 6th day of recombinant FSH therapy, daily FSH doses were adjusted according to the number of growing follicles. Administration of hCG was performed when at least four follicles exceeded 16 mm in diameter and E_2 levels per mature follicle (≥ 16 mm in diameter) were > 200 pg/mL. Women who did not meet these criteria had their cycles cancelled. Oocytes were retrieved 36 hours after hCG administration by transvaginal ultrasound-guided aspiration. All ETs were performed 2 days after oocyte retrieval using Frydman catheters (CCD Laboratories, Paris, France). Luteal phase was supported with micronized progesterone (P_4) (Estima, Effik Pharmaceuticals, Bièvres, France, 600 mg/day) administered daily by vaginal route starting on the evening of ET.

Hormonal and follicular measurements

For the purposes of the present study, we considered blood samples obtained on the day in which pituitary desensitization was confirmed (baseline) and on the day of hCG administration (dhCG). All blood samples were obtained by venipuncture and serum was separated and frozen in aliquots at -20 C for subsequent centralized analysis. At baseline, serum AMH levels were determined using a "second generation" enzyme-linked immunosorbent assay (reference A16507; Immunotech Beckman Coulter Laboratories, Villepinte, France). Intra- and interassay coefficients of variation were $< 6\%$ and $< 10\%$, respectively, lower detection limit at 0.13 ng/mL, and linearity up to 21 ng/mL for AMH. At baseline and dhCG, serum E_2 and P_4 levels were determined by an automated multi-analysis system using a chemiluminescence technique (Advia-Centaur, Bayer Diagnostics, Puteaux, France). For E_2 , lower detection limit was 15 pg/mL, linearity up to 1,000 pg/mL, and intra- and interassay coefficients of variation were 8% and 9%, respectively. For P_4 , lower detection limit was 0.1 ng/mL,

linearity up to 60 ng/mL, and intra- and interassay coefficients of variation were 8% and 9%, respectively.

At baseline and dhCG, ovarian ultrasound scans were performed using a 5.0-9.0 MHz multi-frequency transvaginal probe (Voluson 730 Expert, General Electric Medical Systems, Paris, France) to evaluate the number and sizes of ovarian antral follicles. We determined, at baseline, the number and mean diameters of all follicles measuring 3-10 mm for both ovaries and, on dhCG, the number and mean diameters of all follicles measuring from 12-22 mm. On dhCG, follicles measuring 16-22 mm in diameter were considered mature follicles (Dubey et al., 1995).

STATISTICS

Measures of central tendency and variability used were, respectively, the mean and standard error of the mean when data distribution was normal, and the median and the ranges when normality could not be ascertained. For menstrual cycle duration, we used the mode and the ranges. Relationship between two continuous variables was assessed by correlation when they were independent from each other and by simple regression when there was a dependency relationship. The Spearman's test was used to determine if coefficients of correlation (r) were significantly different from zero. A P value <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Hormonal and follicular relationships

At baseline, median (ranges) serum AMH, E_2 , and P_4 levels were 3.53 (0.71-8.59) ng/mL, 31 (30-50) pg/mL, and 0.25 (0.1-1.6) ng/mL, and median number of early antral follicles were 17 ± 0.25 . Serum AMH levels showed positive correlation with preovulatory follicles on dhCG ($r=0.23$; $P<0.01$), and oocytes obtained ($r=0.38$; $P<0.0001$). On dhCG, the mean number of matured follicles (16-22mm in diameter) was 8 ± 0.25 .

Overall population characteristics and COH results

Mean women's ages and menstrual cycle lengths were 33.0 ± 0.37 years 28.7 ± 0.17 days. Mean body mass index was 22.7 ± 0.37 kg/m². Controlled ovarian hyperstimulation lasted 12 ± 0.13 days and required $2,981 \pm 74$ IU of recombinant FSH. We observed a negative relationship between recombinant FSH requirement for COH and serum AMH levels at baseline ($r=-0.29$; $P<0.007$). In addition, serum AMH levels at baseline were comparable in patients whose infertility was due to sperm or tubal abnormalities, or it was unexplained. The mean number of total oocytes and transferred embryos were 11 ± 0.4 , and 2.2 ± 0.05 , respectively.

DISCUSSION

Previous studies have examined the value of AMH and other markers, using as endpoints oocyte number (Seifer et al., 2002; Van Rooij et al., 2002) or follicular count (Fanchin et al., 2003). Van Rooij et al., 2002 examined ongoing pregnancy in a subset of his patients as a secondary endpoint but did not find a significant association with any serum marker including FSH, E_2 , or inhibin B. All these studies concluded that AMH may be a more useful serum marker than any of the known serum markers for assessment of ovarian reserve.

In cultured rat granulosa cells, exogenous AMH inhibits aromatase synthesis (di Clemente et al., 1992, 1994) and

inhibits the proliferation of granulosa luteal cells (Seifer et al., 1993). AMH and its receptor mRNA are highly expressed in granulosa cells of mainly preantral and small antral follicles (Hirobe et al., 1992; Baarends et al., 1995). From previous mouse and rat studies (Durlinger et al., 1999), it became apparent that AMH plays an important role during both initial and cyclic recruitment of ovarian follicles (Weenen et al., 2004). AMH, produced by the pool of growing follicles, acts as a feedback signal by inhibiting the initial recruitment of primordial follicles (Durlinger et al., 2002). Moreover, AMH expression negatively correlates with future atresia of follicles that undergo selection, suggesting that AMH may be involved in the process of cyclic recruitment (Durlinger et al., 1999). In addition, FSH-dependent growth of mouse follicles in vitro is attenuated by the addition of AMH to the culture, indicating that AMH is one of the factors determining the sensitivity of ovarian follicles to FSH (Durlinger et al., 2001).

The mechanisms underlying this relationship remain unclear. They could involve an effect of AMH on FSH receptor expression. A reduction in the expression of the FSH receptor may change the sensitivity of a follicle to FSH, as it was demonstrated by studies in bovine (Bao et al., 1997). In line with this, several studies have shown that, in addition to FSH effects on the ovary, AMH can also inhibit the role of cAMP as a second messenger of FSH (Teixeira et al., 2001). This would suggest that the molecular target site of AMH action is downstream of the FSH receptor.

Assisted reproduction is expensive, time-consuming and stressful for patients. Evaluations of IVF/ICSI performance rarely consider cancelled cycles, which usually result from an inadequate ovarian response to the stimulation treatment. The cycle cancellations further increase the cost and duration of therapy. Therefore, a major challenge to the IVF teams is to predict prospective patients who will be low responders and to appropriately counsel women who are potential candidates for assisted reproduction. Traditional methodology used to assess ovarian reserve has consisted of baseline serum levels of hormones such as FSH, estradiol and inhibins, and chronological age. Also, a number of provocative tests have been devised to indirectly assess ovarian reserve and identify patients who might not be detected by basal hormone screening alone (Scott & Hofmann, 1995; Bukman & Heineman, 2001). However, neither basal hormone measurements nor such dynamic tests provide direct information concerning the responsiveness of the ovaries to exogenous gonadotropins used in ovarian stimulation for assisted reproductive treatment. Thus, despite the validity of all these tests, there still remain patients who respond poorly to stimulation despite having normal tests of ovarian reserve. Therefore, an early marker of ovarian responsiveness after the initiation of gonadotropin therapy would assist in deciding whether to proceed with an ongoing cycle. Ultimately, this will decrease the cost of continued monitoring and medication for patients in whom therapy will most likely fail. Assessment of the ovarian reserve is particularly important in the IVF clinic, where AMH may be useful as a predictor of poor response. However, in order to determine whether serum AMH level has prognostic value, additional prospective studies in a normal population are necessary to provide definite proof for this concept.

In conclusion, these data demonstrate a strong association between day 3 serum AMH level and IVF outcome. AMH may offer greater prognostic value than other currently available serum markers of assisted reproductive technology ART outcome.

REFERENCES

- Bao B., Garverick H.A., Smith G.W., Smith M.F., Salfen B.E., Youngquist R.S. - Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biol. Reprod.*, 56: 1158-1168, 1997.
- Baarends W.M., Uilenbroek J.T., Kramer P., Hoogerbrugge J.W., van Leeuwen E.C., Themmen A.P., Grootegoed J.A. - Anti-mullerian hormone and anti-mullerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology*, 136: 4951-4962, 1995.
- Bukman A., Heineman M.J. - Ovarian reserve testing and the use of prognostic models in patients with subfertility. *Hum. Reprod. Update*, 7: 581-590, 2001.
- Chuang C.C., Chen C.D., Chao K.H., Chen S.U., Ho H.S., Yang Y.S. - Age is a better predictor of pregnancy potential than basal FSH levels in women undergoing IVF. *Fertil. Steril.*, 79: 63- 68, 2003.
- De Vet A., Laven J.S., de Jong F.H., Themmen A.P., Fauser B.C. - Antimullerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil. Steril.*, 77: 357-362, 2002.
- di Clemente N., Ghaffari S., Pepinsky R.B., Pieau C., Josso N., Cate R.L., Vigier B. - A quantitative and interspecific test for biological activity of anti-mullerian hormone: the fetal ovary aromatase assay. *Development*, 114: 721-727, 1992.
- di Clemente N., Wilson C., Faure E., Boussin L., Carmillo P., Tizard R., Picard J.Y., Vigier B., Josso N., Cate R. - Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Mullerian hormone. *Mol. Endocrinol.*, 8: 1006-1020, 1994.
- Dubey A.K., Wang H.A., Duffy P., Penzias A.S. - The correlation between follicular measurements, oocyte morphology, and fertilization rates in an in vitro fertilization program *Fertil. Steril.*, 64: 787-790, 1995.
- Durlinger A.L., Gruijters M.J., Kramer P., Karels B., Ingraham H.A., Nachtigal M.W., Uilenbroek J.T., Grootegoed J.A., Themmen A.P. - Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*, 143: 1076-1084, 2002.
- Durlinger A.L., Kramer P., Karels B., de Jong F.H., Uilenbroek J.T., Grootegoed J.A., Themmen A.P. - Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*, 140: 5789-5796, 1999.
- Durlinger A.L., Gruijters M.J., Kramer P., Karels B., Kumar T.R., Matzuk M.M., Rose U.M., de Jong F.H., Uilenbroek J.T., Grootegoed J.A., Themmen A.P. - Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*, 142: 4891-4899, 2001.
- Fanchin R., de Ziegler D., Taieb J., Olivennes F., Castracane V.D., Frydman R. - Human chorionic gonadotropin administration does not increase plasma androgen levels in patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil. Steril.*, 73: 275-279, 2000.
- Fanchin R., Schonauer L.M., Righini C., Frydman N., Frydman R., Taieb J. - Serum anti-Mullerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation. *Hum. Reprod.*, 18: 328-333, 2003.
- Fanchin R., Schonauer L.M., Righini C., Guibourdenche J., Frydman R., Taieb J. - Serum anti-Mullerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum. Reprod.*, 18: 323-327, 2003.
- Fanchin R., Taieb J., Mendez Lozano D., Ducot B., Frydman R., Bouyer J. - High reproducibility of serum anti-Mullerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assessment of ovarian follicular status. *Hum. Reprod.*, 20: 923-927, 2005.
- Fanchin R., Louafi N., Mendez Lozano D.H., Achour-Frydman N., Frydman R., Taieb J. - Per-follicle measurements indicate that anti-Müllerian hormone secretion is modulated by the extent of follicular development and luteinization and may qualitatively reflect the ovarian follicular status. *Fertil. Steril.*, 84: 167-173, 2005.
- Hazout A., Bouchard P., Seifer D.B., Aussage P., Junca A.M., Cohen-Bacrie P. - Serum antimullerian hormone/mullerian-inhibiting substance appears to be a more discriminatory marker of assisted reproductive technology outcome than follicle-stimulating hormone, inhibin B, or estradiol. *Fertil. Steril.*, 82: 1323-1329, 2004.
- Hirobe S., He W.W., Lee M.M., Donahoe P.K. - Anti-Mullerian hormone messenger ribonucleic acid expression in granulosa and Sertoli cells coincides with their mitotic activity. *Endocrinology*, 131: 854-862, 1992.
- Pigny P., Merlen E., Robert Y., Cortet-Rudelli C., Decanter C., Jonard S., Dewailly D. - Elevated serum level of anti-mullerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 88: 5957-5962, 2003.
- Scott R.T., Hofmann G.E. - Prognostic assessment of ovarian reserve. *Fertil. Steril*, 63: 01-11, 1995.
- Seifer D.B., MacLaughlin D.T., Penzias A.S., Behrman H.R., Asmundson L., Donahoe P.K., Haning R.V. Jr.,

- Flynn S.D. - Gonadotropin-releasing hormone agonist-induced differences in granulosa cell cycle kinetics are associated with alterations in follicular fluid mullerian-inhibiting substance and androgen content. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 76: 711-714, 1993.
- Seifer D.B., MacLaughlin D.T., Christian B.P., Feng B., Shelden R.M. - Early follicular serum mullerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles. *Fertil. Steril.*, 77: 468-471, 2002.
- Teixeira J., Maheswaran S., Donahoe P.K. - Mullerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocr. Rev.*, 22: 657-674, 2001.
- van Rooij I.A., Broekmans F.J., te Velde E.R., Fauser B.C., Bancsi L.F., de Jong F.H., Themmen A.P. - Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum. Reprod.*, 17: 3065-3071, 2002.
- Vigier B., Picard J.Y., Tran D., Legeai L., Josso N. - Production of anti-Müllerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. *Endocrinology.*, 114: 1315-1320, 1984.
- Weenen C., Laven J.S., Von Bergh A.R., Cranfield M., Groome N.P., Visser J.A., Kramer P., Fauser B.C., Themmen A.P. - Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol. Hum. Reprod.*, 10: 77-83, 2004.

Análise sobre a Resolução da ANVISA, RDC nº 33, que Aprova o Regulamento Técnico para o Funcionamento dos Bancos de Células e Tecidos Germinativos. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 20 de fevereiro de 2006.

“Peer review analysis on ANVISA Resolution – RDC 33 of 20th February 2006, that regulates germinative cells and bank tissues in Brazil.”

Eduardo Pandolfi Passos
Dirceu Henrique Mendes Pereira
Álvaro Petracco
Claudia Petersen

Maria do Carmo Borges de Souza
Péricles Assad Hassun Filho
Carlos Gilberto Almodin
Eduardo Leme Alves da Motta

ABSTRACT

This report represents a peer review on the ANVISA Resolution RDC 33, that regulates germinative cells and bank tissues in Brazil. It points to item 9.4.6 that can originate deleterious effects caused by air vibration over the micromanipulator during ICSI.

Key words: peer review, government regulation, politics.

RESUMO

Este parecer representa uma avaliação especializada sobre a RDC 33 da ANVISA, especificamente quanto ao item 9.4.6, onde a exigência de coifa sobre o micromanipulador durante a ICSI potencialmente pode acarretar efeitos deletérios sobre os embriões.

Palavras chave: comissão de avaliação, regulamentação governamental, políticas.

OBJETIVO

Este relatório tem como objetivo fazer uma análise crítica com respeito ao item 9.4.6 desta resolução que trata do ambiente destinado ao processamento e execução das técnicas que envolve a manipulação de gametas (óvulos e espermatozoides) e embriões no Laboratório de Fertilização *in vitro*.

Recebido em 31/05/07
 Avaliado e aceito 20/06/07

INTRODUÇÃO

Em uma unidade de Reprodução Assistida; pH, temperatura e osmolaridade ótimas no ambiente imediato aos oócitos e embriões (microambiente) estão entre os determinantes de qualidade mais importantes (qualidade: inclui os resultados de nascimentos). Este manuscrito trata especificamente do sub item: **f.1** que relata a necessidade da colocação de uma cabine de segurança biológica Classe II Tipo A. A colocação desta cabine deve ser feita de tal forma que no seu interior contenha o equipamento para a execução do procedimento da Injeção Intracitoplasmática do Espermatozóide no Oócito (Intracytoplasmic sperm injection-ICSI).

Antes, porém, permita-nos descrever de forma sucinta o procedimento desta técnica para que os senhores tenham uma visão de como este procedimento é altamente delicado e complexo, exigindo equipamentos e profissionais com larga experiência, pois este processo não deve demandar mais que 1-2 minutos.

O local de trabalho para a execução da técnica de ICSI compreende um microscópio invertido acoplado com micromanipuladores (*workstation*) que permitem a aspiração de um único espermatozóide para dentro de uma micropipeta com diâmetro de 1/10 de um fio de cabelo. Esta micropipeta é inserida através da zona pelúcida alcançando o citoplasma do oócito, onde o espermatozóide é depositado. Por outro lado o oócito permanece imóvel pois este é seguro por outra micropipeta de diâmetro um pouco maior. Todo este processo é realizado em um microambiente controlado pois é realizado sob óleo, aumentando assim o controle da temperatura, como também servindo como uma barreira do ar.

A) Análise Crítica (Laboratório de Reprodução Assistida):

Para a realização da ICSI são fundamentais dois fatores:

- 1) **Controle da temperatura**, pois se houver um pequeno resfriamento no microambiente, que deve estar a 37°C, haverá um comprometimento do fuso meiótico e despolimerização do citoesqueleto do oócito, acarretando baixa taxa de fertilização, aumento das taxas de embriões aneuploides (número alterado de cromossomos) e consequentemente redução das taxas de gestação, aumento das falhas de FIV e de abortos. O aumento do volume de fluxo de ar criado pela cabine pode diminuir a temperatura do microambiente, mesmo contando com sofisticados sistemas de placas aquecidas.
- 2) **Controle da qualidade do ar**. Para que o procedimento fosse realizado dentro de um ambiente com fluxo laminar de ar, a cabine deveria realmente acrescentar vantagens. Entretanto, há uma série de limitações que atualmente impedem o uso deste equipamento, acarretando mais problemas do que soluções, dentre estas limitações destacam-se:
 - 2.1- **Vibração**: a vibração de tais cabinets impede que o procedimento da ICSI seja realizado com acurácia e a velocidade necessárias para que não haja comprometimento do oócito e do futuro embrião (descrito anteriormente). Atualmente as cabines classe I (mais modernas), ou mesmo os de classe II como por exemplo o K-Systems (Birkerød, Dinamarca) não permitem que o procedimento da ICSI seja realizado de forma eficiente, pois não é possível instalar uma plataforma anti-vibração.
 - 2.2- **Temperatura**: o aumento do volume de fluxo de ar criado pelo sistema pode diminuir a temperatura do microambiente (descrito anteriormente).
 - 2.3- **Interrupção do Fluxo laminar do ar**: tanto os braços do operador, quanto o próprio equipamento impedem a formação do fluxo laminar de ar.
- 3) **Compostos Orgânicos Voláteis (COV)**: adicionalmente, o que esta resolução ignora, e que a maioria dos embriologistas sabem – é a questão dos COV que contaminam o laboratório de FIV e as incubadoras. É bem estabelecido que estes compostos são a principal fonte de contaminação e possuem um efeito altamente negativo sobre os oócitos e embriões; o que esta resolução não especifica. Porém, atualmente, a maioria das clínicas possuem filtros HEPA e filtros específicos para filtrar os COV. Consequentemente, estes laboratórios já possuem alta qualidade do ar, inclusive superando a maioria das salas cirúrgicas dos hospitais.

CONCLUSÃO

O resfriamento e a pressão dos gases proveniente dos fluxos de ar da cabine tem o potencial de causar efeitos deletérios sobre os oócitos e embriões.

Além destes itens expostos, o fluxo laminar vertical proposto, teria também a finalidade de proteção aos operadores envolvidos na micromanipulação dos gametas/embriões. Contudo, é necessário salientar que tais células/embriões já não possuem mais material potencialmente contaminante, pois foram previamente processados (lavados e isolados dos fluidos corpóreos a

que pertenciam), encontra-se neste instante em meio de cultivo sintético e separados do meio externo por uma camada de óleo mineral estéril, como isolante. Assim, demonstra-se que além dos potenciais danos biológicos ao embrião mencionados, não existe proteção adicional aos operadores deste instrumento e ao microambiente das amostras.

B) Análise Crítica (referência bibliográfica e agências reguladoras):

Adicionalmente, realizamos uma ampla e detalhada pesquisa na literatura mundial, como também nos órgãos e agências reguladoras da Europa, Estados Unidos e do Reino Unido, que tratam especificamente das tecnologias envolvidas em Reprodução Assistida. Dentre as Principais Agências Reguladoras não encontramos de forma direta ou indireta a imposição da colocação de tais cabines nas estações de trabalho para a realização da técnica da ICSI:

1- The American Association of Tissue Banks:

Standards for Tissue Banking. The American Association of Tissue Banks, McLean, Virginia, 1996.

2- European Union Tissues and Cells Directive:

A critical assessment of the impact of the European Union Tissues and Cells Directive (2004) on laboratory practices in assisted Conception. Reproductive BioMedicine Online; vol. 11, n.2, 2005.

3- American Society for Reproductive Medicine (ASRM):

The American Society for Reproductive Medicine. Revised Minimum Standards for In Vitro Fertilization, Gamete Intrafallopian Transfer, and Related Procedures. Fertility and Sterility 1998; 70 (Suppl 2) :1S-5S.

4- Centers for Disease Control and Prevention (CDC):

Centers for Disease Control and Prevention. Reporting of Pregnancy Success Rates from Assisted Reproductive Technology Programs. 62 FR 45259, Aug. 26, 1997.

Centers for Disease Control and Prevention. Implementation of the Fertility Clinic Success Rate and Certification Act of 1992; Proposed Model Program for the Certification of Embryo Laboratories.

5- The College of American Pathologists:

The College of American Pathologists/American Society for Reproductive Medicine Reproductive Laboratory Accreditation Program. The College of American Pathologists, Northfield, Illinois, 1996.

6- The Human Fertilisation and Embryology Authority (HFEA):

The Human Fertilisation and Embryology Authority; 6th Edition; First; Copyright HFEA 2003.

7- Food and Drug Administration (FDA):

A nova resolução para bancos de tecidos (FDA-2004), não inclui nenhuma especificação com relação a qualidade do ar, porém item 195 relata que os centros devem ter um “controle” adequado do ambiente. Ou seja, deve ter o controle da temperatura, umidade, ventilação e filtração do ar com inspeção periódica para verificar se os sistemas são adequados e se funcionam apropriadamente. Uma vez que a regulamentação do

FDA é “process-based”, não é prospectivo, o banco de tecido tem que provar, via mensurações objetivas e com dados, se seus sistemas cobrem os objetivos e necessidades do laboratório.

Food and Drug Administration 2004 21 CFR Parts 16, 1270, and 1271. Current Good Tissue Practice for Human Cell, Tissue and Cellular and Tissue-Based Product Establishments; Inspection and Enforcement; Final Rule. Federal Register 69 (226), 68611-68688.

CONCLUSÃO

A implementação de tais equipamentos (cabine de segurança biológica Classe II Tipo A) não melhora as condições de segurança (objetivo desta normativa). Ao contrário, aumenta os riscos de produzir embriões alterados e consequentemente reduzir as taxas de gestação. Nós não recomendamos a instalação destas cabines nos equipamentos da ICSI (*workstation*).

O impacto desta Resolução, especificamente o sub-ítem f.1, como discutido anteriormente, só pode ser visto negativamente. As consequências na qualidade embrionária, no potencial de implantação e nas taxas de sucesso clínico, terão um efeito adverso. Certamente este não é o objetivo desta resolução, que busca :“Promover o nível mais alto de proteção para salvaguardar a Saúde Pública em relação a qualidade e segurança de tecidos e células”.

REFERÊNCIAS

- The American Association of Bioanalysts. Embryology and Andrology Review Course. American Association of Bioanalysts, St. Louis, Missouri, 1994.
- The American Association of Tissue Banks. Standards for Tissue Banking. The American Association of Tissue Banks, McLean, Virginia, 1996.
- The American Society for Reproductive Medicine. Revised Minimum Standards for In Vitro Fertilization, Gamete Intrafallopian Transfer, and Related Procedures. Fertility and Sterility 1998; 70 (Suppl 2) :1S-5S.
- European Union Tissues and Cells Directive. A critical assessment of the impact of the European Union Tissues and Cells Directive (2004) on laboratory practices in assisted Conception. Reproductive BioMedicine Online; vol. 11, n.2, 2005.
- Association of Clinical Embryologists. Accreditation Standards and Guidelines for IVF Laboratories. Association of Clinical Embryologists, London, England, 1996.
- California Health and Safety Code, Division 2, Chapter 4.1-Tissue Banks. State of California, Department of Health Services, Berkeley, California, 1992.
- Centers for Disease Control and Prevention. Reporting of Pregnancy Success Rates from Assisted Reproductive Technology Programs. 62 FR 45259, Aug. 26, 1997.
- Centers for Disease Control and Prevention. Implementation of the Fertility Clinic Success Rate and Certification Act of 1992; Proposed Model Program for the Certification of Embryo Laboratories. 63 FR 60178, Nov. 6, 1998.
- Code of Federal Regulations, Title 42, Chapter IV, Part 493--Laboratory Requirements.
- The College of American Pathologists/American Society for Reproductive Medicine Reproductive Laboratory Accreditation Program. The College of American Pathologists, Northfield, Illinois, 1996.
- The Fertility Clinic Success Rate and Certification Act of 1992 (Public Law 102-493).
- Guidance for Industry, Public Health Issues Posed by the Use of Nonhuman Primate Xenografts in Humans. Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research, April, 1999.
- Keel BA and BW Webster. CRC Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1990.
- Rules and Regulations of the State of New York, Part 52 of Title 10 (Health). Tissue Banks and Non-transplant Anatomic Banks. State of New York Department of Health, Albany, New York, 1992.
- Senate Report 102-452 on H.R. 4773. Fertility Clinic Success Rate and Certification Act of 1992. 102d Congress, 2d Session, 1992.
- Survey of Assisted Reproductive Technology Embryo Laboratory Procedures and Practices. www.phppo.cdc.gov/dls/pdf/art/ARTsurvey.pdf.
- Veck LL. The Gamete Laboratory: Design, Management and Techniques. pp. 798--820 in: Infertility: Evaluation and Treatment. Edited by WR Key, RJ Chang, RW Rebar and MR Soules. WB Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, 1995.
- A critical assessment of the impact of the European Union Tissues and Cells Directive (2004) on laboratory practices in assisted Conception. Reproductive BioMedicine Online; vol. 11, n.2, 2005.
- The Human Fertilisation and Embryology Authority Paxton House, 30 Artillery Lane, London E1 7LS, UK Tel: 020 7377 5077 Fax: 020 7377 1871; 6th Edition;First;Copyright © HFEA 2003
- Food and Drug Administration 2004 21 CFR Parts 16, 1270, and 1271. Current Good Tissue Practice for Human Cell, Tissue and Cellular and Tissue-Based Product Establishments; Inspection and Enforcement; Final Rule. Federal Register 69 (226), 68611-68688.

Competência Reprodutiva dos Oócitos Obtidos Através do *Flushing* Follicular em Baixas Respondedoras

Optimal Reproductive Competence of Oocytes Retrieved Through Follicular Flushing in Poor Responders Patients

Juliano Brum Scheffer, Daniel H. Méndez Lozano, René Frydman, Renato Fanchin

Center: Departments of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Medicine (J.B.S., R.F., D.H.M.L., R.F.), Clamart, France

Endereço para correspondência:

Address all correspondence and requests for reprints to: Juliano Scheffer, M.D., Department of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Medicine, Hôpital Antoine Bécclère, 157, rue de la Porte de Trivaux, 92141, Clamart, France. Tel: 33 0 0145374465. Email: julianoscheffer@hotmail.com.

ABSTRACT

Among the possible mild stimulation protocols, the natural cycle offers many advantages. Natural cycles have been proposed as an alternative to simplify in-vitro fertilization (IVF) treatment procedures, to reduce its costs, and to avoid the risks of ovarian hyperstimulation and multiple pregnancies. Improvements in laboratory techniques and methods of follicle aspiration have created a renewed interest in natural cycle IVF-ET and turned into a viable option. Objective: The objective of this study was to assess the reproductive competence of oocytes obtained by follicular flushing in poor responders patients. Design: Prospective comparative study. Patients and Methods: 165 infertile IVF-ET candidates. We studied 271 consecutive mono-follicular IVF-ET cycles. Oocyte pickup (OPU) was performed 34 hours after hCG administration, oocytes were allocated in two groups according to its retrieval method: oocytes obtained in the first follicular aspiration (group FA, n=127); and oocytes retrieved in the subsequent follicular flushing (group FF, n=102). Main outcome measure: Clinical pregnancy and embryo implantation rates. Results: Patients' characteristics, fertilization rates, and clinical pregnancy rates/oocyte were comparable in both of groups. In contrast, embryo morphology (41% vs. 59%, $P<0.01$) and implantation rates (20.4% vs. 34.8%, $P<0.04$) were better in the group

FF. Conclusions: An optimal reproductive competence was observed on oocytes retrieved by follicular flushing in poor responders patients.

Key Words: Follicular flushing, Oocyte quality, Embryo implantation, Poor responders.

RESUMO

Entre os protocolos possíveis de estimulação, o ciclo natural oferece muitas vantagens. Os ciclos naturais foram propostos como uma alternativa de simplificar o tratamento de fertilização in vitro (FIV), reduzir os custos, e evitar os riscos de hiperestimulação ovariana e de gravidezes múltiplas. As melhorias nas técnicas de laboratório e nos métodos de aspiração follicular criaram um interesse renovado no ciclo natural FIV-TE e tornou-se uma opção viável. Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar a competência reprodutiva dos oócitos obtidos através do flushing follicular em pacientes baixas respondedoras. Desenho: Estudo prospectivo comparativo. Pacientes e Métodos: 165 inférteis candidatas à FIV-TE. Nós estudamos 271 ciclos mono-follicular consecutivos de FIV-TE. A punção follicular (OPU) foi executado 34 horas após a administração do hCG, os oócitos foram alocados em dois grupos de acordo com o método de obtenção: oócitos obtidos na primeira aspiração follicular (grupo FA, n=127); e oócitos recuperados através do flushing follicular (grupo FF, n=102). Avaliação principal: Taxa de gravidez clínica e de implantação embrionária. Resultados: As características dos pacientes, a

Recebido em 03/02/2007
Avaliado e aceito em 02/06/07

taxa de fertilização e a taxa de gravidez clínica/oócito foram comparáveis em ambos os grupos. Em contraste, a morfologia do embrião (41% versus 59%, $P < 0.01$) e as taxas de implantação (20.4% versus 34.8%, $P < 0.04$) foram melhores no grupo FF. Conclusões: Competência reprodutiva eficaz foi observado nos oócitos recuperados através do flushing folicular em pacientes baixas respondedoras.

Palavras chaves: Flushing folicular, qualidade de oócitos, implantação embrionária, baixas respondedoras.

INTRODUCTION

Among the possible mild stimulation protocols, the natural cycle offers many advantages. Natural cycles have been proposed as an alternative to simplify in-vitro fertilization (IVF) treatment procedures, to reduce its costs, and to avoid the risks of ovarian hyperstimulation and multiple pregnancies (Foulot et al., 1989; Paulson et al., 1992; Aboulghar et al., 1995; Ubaldi et al., 2005). Improvements in laboratory techniques and methods of follicle aspiration have created a renewed interest in natural cycle IVF-ET and turned into a viable option.

Poor ovarian response is observed in 9-24% (Keay 1997) of patients undergoing ovarian stimulation. Many strategies of treatment were suggested to improve the historically poor outcome of this group. Several reports have recommended that performing natural cycle IVF on these patients might be a valid alternative to egg donation and COH, in terms of costs and outcome (Janssens et al., 1999; Bassil et al., 1999; Castelo Branco et al., 2005).

The quality of oocytes retrieved by follicular flushing has been questioned by controversial data on the controlled ovarian hyperstimulation (COH) protocols. In fact, this procedure has been considered as useless after the randomized studies that showed the same oocyte retrieval rate with or without flushing, and a longer anesthesia and more expensive procedure (Kingsland et al., 1991; Tan et al., 1992). Similarly, data from literature exhibits a reduced performance of oocytes obtained by follicular flushing (el Hussein et al., 1992) and, therefore this technique has been described like superfluous. Conversely, recent data showed an increase in the number of retrieved oocytes when follicular flushing was practiced in COH protocols with an achieved improvement in pregnancy rates and live birth rates (Bagtharia et al., 2005).

However, the interest of follicular flushing has not been studied on the mono-dominant IVF-ET cycles. This treatment is an alternative proposed for patients having a deficit on ovarian response to COH (Bassil et al., 1999; Morgia et al., 2004; Castelo Branco et al., 2005). This question becomes even more important because the prevalence of oocyte retrieval failure which has been reported from 15% to 40% (Daya et al., 1995; Bassil et al., 1999; Pelinck et al., 2002; Morgia et al., 2004).

Hence, in the study reported here, we evaluated the interest of follicular flushing on the IVF-ET by mono-dominant cycle and the reproductive potential of oocytes obtained by this procedure.

PATIENTS AND METHODS

Patients

We prospectively studied 165 infertile women with low ovarian reserve, 20-37 years of age, undergoing 271 consecutive mono-dominant follicle IVF-ET cycles from January 2005 to December 2006. The low ovarian reserve was defined by a previous ovarian stimulation failure and/or by a severe

alteration on ovarian reserve revealed on the hormonal basal levels and on a day 3 antral follicular count (AFC) by ultrasound. The previous cancellation on COH was indicated when less than 5 follicles reached the follicular maturation (≥ 16 mm) despite an appropriated ovarian stimulation. A second ovarian stimulation was proposed if the basal hormonal levels and the ultrasound for the AFC were normal despite the first insufficient response. The low ovarian reserve was defined by two or more of the following factors: antral follicular count < 10 on both ovaries, FSH ≥ 10 UI/L and < 15 UI/L and/or AMH < 2 ng/ml.

The inclusion criteria were as follows: (i) both ovaries present and deprived of morphological abnormalities; (ii) regular menstrual cycles between 24 and 35 days; (iii) no current or past diseases affecting the ovaries or gonadotrophin or sex steroid secretion, clearance or excretion; (iv) no clinical signs of hyperandrogenism; (v) no current hormone therapy; and (vi) adequate visualization of both ovaries in transvaginal ultrasound scans. The causes of infertility were male factor (45.9%), unexplained infertility (24%), tubal abnormalities (21.6%) and endometriosis (8.5%). An informed consent was obtained from all patients and this investigation received the approval of our internal Institutional Review Board.

IVF-ET protocol

On cycle day 3, all patients underwent blood samplings by venipuncture at approximately 9 AM for serum E_2 , progesterone (P_4), and LH measurements. Later in the

Table I. Patients' characteristics and cycle monitoring data in the FA and FF groups

| Parameter | FA (n=127) | FF (n=102) | P |
|---|----------------|----------------|-----------------|
| Age (years) ^a | 33.7 \pm 0.2 | 33.5 \pm 0.9 | NS ^b |
| BMI (kg/m ²) ^a | 23.0 \pm 0.4 | 22.3 \pm 0.3 | NS |
| Cycles (days) ^a | 28.1 \pm 0.1 | 28.2 \pm 0.2 | NS |
| Indications for IVF-ET: | | | |
| Sperm abnormalities (%) | 44.8 | 45.0 | NS |
| Unexplained infertility (%) | 21.2 | 28.4 | NS |
| Tubal abnormalities (%) | 25.9 | 20.5 | NS |
| Endometriosis (%) | 7.8 | 5.8 | NS |
| Antral follicle count on day 3 ^a | 10.1 \pm 0.4 | 10.7 \pm 0.7 | NS |
| Day of hCG (days) ^a | 12.1 \pm 0.2 | 12.3 \pm 0.2 | NS |
| Follicle size on the day of hCG (mm) ^a | 17.1 \pm 0.0 | 17.2 \pm 0.1 | NS |
| Endometrial thickness on the day of hCG (mm) ^a | 8.2 \pm 0.1 | 8.4 \pm 0.1 | NS |
| E_2 on the day of hCG (pg/mL) ^a | 237 \pm 13 | 237 \pm 21 | NS |
| P_4 on the day of hCG (ng/mL) ^a | 0.2 \pm 0.03 | 0.2 \pm 0.01 | NS |
| LH on the day of hCG (mIU/mL) ^a | 3.4 \pm 0.2 | 3.9 \pm 0.4 | NS |

^a Values are expressed in mean \pm SE

^b Not significant

morning, the number and the sizes of early antral follicles were assessed by ultrasound equipped with a tissue harmonic imaging system (Thomas and Rubin 1998). From cycle day 8 onward, the selection of the dominant follicle was monitored by ultrasound and by serum E_2 levels. When its mean diameter exceeded 12 mm, to prevent the risk of premature LH peak and to control further follicular maturation, GnRH antagonist 0.5 mg (cetorelix acetate; Cetrotide 0.25 mg, Serono Pharmaceuticals, Boulogne, France) and hMG 150 IU (Menopur, Ferring Pharmaceuticals, Gentilly, France) were administered subcutaneously daily until the day of hCG (Gonadotrophine Chorionique "Endo", Organon Pharmaceuticals, Saint-Denis, France) administration. Finally, women received a 5,000-IU hCG injection intramuscularly when the dominant follicle diameter exceeded 16 mm.

Follicular aspiration and follicular flushing

The oocyte was picked up approximately 34 hours after hCG administration. Under transvaginal ultrasound guidance, the follicular fluid from the single preovulatory follicle was aspirated using a 10-mL syringe. The aspiration needle was kept steady inside the follicle until the oocyte was found and isolated. These oocytes were entered in group FA.

In case of negative oocyte recovery, sequential follicular flushings were performed using 10-mL syringes filled with 3 mL of a balanced saline solution (Tyrode's salt solution, Eurobio Pharmaceuticals, Courtaboeuf, France) previously warmed at 37°C. These oocytes were entered in group FF.

Oocyte pickup failure was defined by a negative oocyte recovery after 4 consecutive follicular flushings. ICSI was used only in the presence of male factor (<300.000 progressive spermatozoons). Top quality embryo was defined on day 2 as those having no multinucleated blastomeres, four or five blastomeres, and less than 20% anucleated fragments (Van Royen et al., 1999). Embryo transfer was performed 2 days after oocyte pickup (OPU) using a classic Frydman catheter (CCD laboratories, Paris, France). The luteal phase was supported with micronized progesterone (Estima Gé, Effik Pharmaceuticals, Bièvres, France, 600 mg/day) administered daily by vaginal route starting on the evening of ET.

Analysis of groups

FA and FF groups were analyzed by comparing the prevalence of oocytes with fractured zona pellucida (FZP), the fertilization rate, the prevalence of top quality embryos (A and B from the Van Royen et al. classification), and the implantation rate and clinical pregnancy rate per oocyte.

Hormonal measurements

Serum E_2 and P_4 levels were determined by an automated multi-analysis system using a chemiluminescence technique (Advia-Centaur, Bayer Diagnostics, Puteaux, France). For E_2 , lower detection limit was 15 pg/mL, linearity up to 1,000 pg/mL, and intra- and interassay coefficients of variation were 8% and 9%, respectively. For P_4 , lower detection limit was 0.1 ng/mL, linearity up to 60 ng/mL, and intra- and interassay coefficients of variation were 8% and 9%, respectively. Serum LH levels were measured by an immunometric technique using an Amerlite kit (Ortho Clinical Diagnostics, Strasbourg, France). Lower limit of detection was 0.1 mIU/mL and intra- and inter-assay CVs were 5 and 7%, respectively for LH.

Statistical analysis

Measures of central tendency and variability used were, respectively, the mean and standard error of the mean when

| Table II. Embryology and IVF-ET outcome data | | | |
|--|---------------|---------------|-----------------|
| Parameter | FA (n=127) | FF (n=102) | P |
| Prevalence of fractured zone pellucida oocytes (%) | 5.5 | 10.7 | NS ^a |
| Oocyte fertilization rate (%) | 81.6 | 82.4 | NS |
| Top quality embryos (%) | 41.2 | 59.7 | 0.01 |
| Clinical pregnancy rate/oocyte (%) | 14.1 | 22.5 | NS |
| Embryo implantation rate (%) | 20.4 | 34.8 | 0.04 |

^aNot significant

data distribution was normal, and the median and the ranges when normality could not be ascertained. Normality distribution of the data was assessed with the Kolmogorov Smirnov test. Unpaired data were compared with the unpaired Student's t-test or the Mann Whitney test, when appropriate. Relationship between two continuous variables was assessed by correlation when they were independent from each other and by simple regression when there was a dependency relationship. The Spearman's test was used to determine if coefficients of correlation (r) were significantly different from zero. The chi-square and Fisher's exact test were used to compare categorical variables. The present study was powered to detect anticipated differences of 25% in embryo implantation rates at >80% power at 0.05 significance level. A P value <0.05 indicated was considered statistically significant.

RESULTS

Patients' characteristics and cycle monitoring data

Overall, 271 IVF-ET cycles with follicular aspiration were studied. In 229 cycles the oocyte was recovered. In spite of flushing the oocyte recovery failure was present in 15.4% (42 oocyte retrieval failures). From the oocytes recovered 127 were retrieved from follicular fluid (Group FA, 55.4%) and 102 (Group FF, 44.5%) from follicular flushing (1-4). 80.3% in the 1st, 10.7% in the 2nd, 5.8% in the 3rd and 2.9% in the 4th.

Patients' characteristics and cycle monitoring data in the FA and FF groups are detailed in Table I. As shown, ages of patients, BMI values, menstrual cycle lengths, antral follicle counts on day 3 were comparable in both of groups. Etiologies of infertility were also similar in FA and FF groups. Moreover, the day of hCG administration, and preovulatory follicle size, endometrial thickness, and serum E_2 , P_4 , and LH levels of the day of hCG were not statistically different between two groups of oocytes.

Embryology and IVF-ET outcome data

Embryology data and IVF-ET outcome data are summarized in Table II. Both of groups of oocytes remained similar with regard to prevalence of FZP, fertilization rates and clinical pregnancy rates/oocyte (gestational sac observed at ultrasound scans at around 7 weeks of amenorrhea). Conversely, the prevalence of top quality embryos and the implantation rates (total number of gestational sacs x 100/total number of embryos transferred) were higher in the oocytes retrieved by follicular flushing (41.2% vs 59.7%, $P < 0.01$; and 20.4 vs 34.8, $P < 0.04$, respectively).

DISCUSSION

The present study aimed at evaluating the efficacy of follicular flushing in the mono-dominant IVF-ET cycle for poor responders patients and the reproductive competence of oocytes issued from this technique. For this, its design required the following methodological characteristics. First, we included IVF-ET consecutive cycles in two years to avoid bias. Second, the single follicle cycles allow us to properly track the oocyte reproductive competence. Third, in order to achieve a fine assessment of oocytes according to its origin, we accurately separated groups FA and FF since its retrieval.

Natural and semi natural cycle IVF-ET has many potential advantages: (i) the multiple pregnancy rate was close to zero, (ii) there is no risk of OHSS, (iii) per cycle, natural and semi natural cycle IVF-ET is physically less demanding than stimulated IVF-ET and probably less emotionally (Hojgaard et al., 2001) and (iv) per cycle, natural and semi natural cycle IVF-ET is cheaper than stimulated IVF-ET. One of the disadvantages of natural and semi natural cycle IVF-ET is a high cancellation rate because of premature LH surges or premature ovulation. Cancellation rates varying from 17–47% have been reported during IVF in unstimulated cycles (Paulson et al., 1992; Claman et al., 1993; Fahy et al., 1995). Our findings demonstrate that the oocyte recovery failure was present in 15.4%.

Poor response to COH is age-related, but it also occurs in young patients. It is generally accepted that poor responders have a reduced number of follicles remaining in the ovary, in both young and old patients. In our study, the use of IVF-ET with a semi natural-cycle protocol was a valuable alternative to COH in poor responders. In these patients, semi natural-cycle IVF is at least as effective as COH, especially in younger patients, with a better implantation rate. This alternative should be proposed to poor responders, because the semi natural cycle is cheaper than hyperstimulation and permits a more “friendly” approach to IVF with results comparable to those with COH, at least in these patients. Considering the poor IVF-ET prognosis (Wilcox et al., 1988; Toner et al., 1991; Medrum, 1993) in poor responders, approximately, 20% may be quite an acceptable rate.

The results of our investigation indicated that, in poor responders patients, the oocytes retrieved 34 post hCG by follicular flushing demonstrate a better morphological quality and implantation outcome of the corresponding embryo than those already present in follicular fluid. The mechanisms underlying this relationship may at least partly explain some of the beneficial effects of the interdependence of oocytes and cumulus cells. Co-cultures of oocytes and cumulus cells have been employed *in vitro* to restore support from the surrounding cumulus cells to the oocyte and/or to probe interactions between the two cell compartments. The cumulus cells are intimately connected with the oocyte through long microvilli that traverse through the zona to contact the oolemma to form gap junctions and desmosomes (Motta et al., 1994). The gap junctions help to mediate the transport of certain molecules that are necessary for oocyte metabolism (Brower and Schultz, 1982; Haghinat and Van Winkle, 1990). In addition to these effects, the granulosa cells also appear to exert some of their effects on the oocyte via paracrine signals (Albertini et al., 2001). The oocyte release phenomenon might be explained by a reduced contact between oocyte and granulosa cells (Albertini et al., 2001).

In conclusion, the practice of follicular flushing is required to improve the pregnancy rates in semi natural cycle IVF for poor responders patients. Moreover, oocytes obtained by follicular flushing in poor responders patients under an early

oocyte retrieval have a high reproductive competence as observed on the embryo implantation rates, but more studies, randomized controlled trial, comparing flushing and no flushing in natural and semi natural cycle IVF-ET is warranted to confirm our results. Cumulus-oocyte dependence in patients with a low ovarian reserve should be the matter of additional investigation.

REFERENCES

- Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GA, Amin YM, Sattar MA, Ramzy AM. In vitro fertilization in a spontaneous cycle: a successful simple protocol. *J Obstet Gynaecol* 1995; 21: 337-40.
- Albertini DF, Combelles CMH, Benecchi E and Carabatsos MJ. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*. 2001; 121,647±653.
- Bagtharia S, Haloob AR. Is there a benefit from routine follicular flushing for oocyte retrieval? *J Obstet Gynaecol* 2005; 25: 374-76.
- Bassil S, Godin PA, Donnez J. Outcome of in-vitro fertilization through natural cycles in poor responders. *Hum Reprod* 1999; 14: 1262-65.
- Brower, P.T. and Schultz, R.M. Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes: Existence and possible nutritional role during oocyte growth. *Dev. Biol.*, 1982; 90, 144–153.
- Castelo Branco A, Achour-Frydman N, Kadoch J, Fanchin R, Tachdjian G, Frydman R. In vitro fertilization and embryo transfer in seminatural cycles for patients with ovarian aging. *Fertil Steril* 2005; 84: 875-80.
- Claman, P., Domingo, M., Garner, P. et al. Natural cycle in in-vitro fertilization-embryo transfer at the University of Ottawa: an inefficient therapy for tubal infertility. *Fertil. Steril.*, 1993; 60, 298–302.
- Daya S, Gunby J, Hughes EG, Collins JA, Sagle MA, YoungLai EV. Natural cycles for in-vitro fertilization: cost-effectiveness analysis and factors influencing outcome. *Hum Reprod* 1995; 10: 1719-24.
- el Hussein E, Balen AH, Tan SL. A prospective study comparing the outcome of oocytes retrieved in the aspirate with those retrieved in the flush during transvaginal ultrasound directed oocyte recovery for in-vitro fertilization. *Br J Obstet Gynaecol* 1992; 99: 841-44.
- Fahy, U., Cahill, D., Wardle P. et al. In-vitro fertilization in completely natural cycles. *Hum. Reprod.*, 1995; 10, 572–575.
- Foulot H, Ranoux C, Dubuisson JB, Rambaud D, Aubriot FX, Poirot C. In vitro fertilization without ovarian stimulation: a simplified protocol applied in 80 cycles. *Fertil Steril* 1989; 52: 617-21.
- Haghinat, N. and Van Winkle, L.J. Developmental change in follicular cell-enhanced amino acid uptake into mouse oocytes that depends on intact gap junctions and transport system Gly. *J. Exp. Zool.*, 1990; 253, 71–82.
- Hojgaard, A., Ingerslev, H.J. and Dinesen, J. Friendly IVF: patient opinions. *Hum Reprod* 2001; 16, 1391-1396.
- Janssens RM, Lambalk CB, Vermeiden JP, Schats R, Schoe-

- maker J. In-vitro fertilization in a spontaneous cycle: easy, cheap and realistic. *Hum Reprod* 2000; 15: 314-18.
- Kingsland CR, Taylor CT, Aziz N, Bickerton N. Is follicular flushing necessary for oocyte retrieval? A randomized trial. *Hum Reprod* 1991; 6: 382-83.
- Keay SD, Liversedge NH, Mathur RS, Jenkins JM. Assisted conception following poor ovarian response to gonadotrophin stimulation. *Br J Obstet Gynaecol* 1997; 104: 521-27.
- Medrum, D. Female reproductive aging – ovarian and uterine factors. *Fertil. Steril.*, 1993; 59, 1–5
- Motta PM, Makabe S, Naguro T and Correr S. Oocyte follicle cells association during development of human ovarian follicle. A study by high resolution scanning and transmission electron microscopy. *Arch Histol Cytol.*, 1994; 57,369–394.
- Morgia F, Sbracia M, Schimberni M, Giallonardo A, Piscitelli C, Giannini P et al. A controlled trial of natural cycle versus microdose gonadotropin-releasing hormone analog flare cycles in poor responders undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2004; 81: 1542-47.
- Paulson RJ, Sauer MV, Francis MM, Macaso TM, Lobo RA. In vitro fertilization in unstimulated cycles: the University of Southern California experience. *Fertil Steril* 1992; 57: 290-3.
- Pelinck MJ, Hoek A, Simons AH, Heineman MJ. Efficacy of natural cycle IVF: a review of the literature. *Hum Reprod Update* 2002; 8: 129-39.
- Tan SL, Waterstone J, Wren M, Parsons J. A prospective randomized study comparing aspiration only with aspiration and flushing for transvaginal ultrasound-directed oocyte recovery. *Fertil Steril* 1992; 58: 356-60.
- Thomas JD, Rubin DN. Tissue harmonic imaging: why does it work? *J Am Soc Echocardiogr* 1998; 11: 803-08.
- Toner, J., Philiput, C., Jones, G. et al. Basal follicle stimulating hormone concentration is a better predictor of in vitro fertilization performance than age. *Fertil. Steril.*, 1991; 55, 784–791
- Ubaldi FM, Rienzi L, Ferrero S et al. Management of poor responders in IVF. *Reprod Biomed Online* 2005; 10: 235-46.
- Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerssche M, Ryckaert G et al. Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod* 1999; 14: 2345-49.
- Wilcox, A., Weiberg, C., O'Connor, J. et al. Incidence of early loss of pregnancy. *N. Engl. J. Med.*, 1988; 319, 189–194.

Princípios da Criopreservação e uma Revisão da Criopreservação de Espermatozóides Humanos

Principles of Cryopreservation and a Review of Cryopreservation of Human Sperm

Paulo Franco Taitson
Luiza Alves Romano

Serviço onde foi realizado o trabalho: Grupo de Pesquisa Anatomia Funcional do Aparelho Urogenital PUC Minas/CNPq.

Endereço para correspondência:

Endereço: Prof. Dr. Paulo Franco Taitson
Grupo de Pesquisa Anatomia Funcional do Aparelho Urogenital
PUC Minas/CNPq.
Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais
Av. Dom José Gaspar, 500 (ICBS)
30.535-610 - Belo Horizonte - Minas Gerais.
Tel: (31) 3337-1960
e-mail: pftaitson@bol.com.br

RESUMO

O artigo oferece uma atualização do presente estágio da tecnologia, praticabilidade e limites da criopreservação de espermatozóides humanos. Desta forma, a criopreservação de sêmen representa uma prevenção, uma opção concomitante aos pacientes oncológicos que necessitam de uma oportunidade de manter suas habilidades reprodutivas.

Palavras-chave: espermatozóides, criopreservação, infertilidade masculina.

ABSTRACT

This paper provides a review of the present state of technology, practicability, and limits of cryopreservation of human spermatozoa. Thus cryopreservation of semen represents a preventive, concomitant therapeutic option in oncological patients that offers the chance to maintain reproductive abilities.

Key-words: spermatozoa, cryopreservation, male infertility.

Recebido em 02/01/07
Avaliado e aceito em 30/05/06

HISTÓRICO

As primeiras abordagens práticas de congelamento de sêmen remontam ao século XVIII, através de Spallanzani em 1776 (Nieschlag & Behre, 1997), com observações sobre a sobrevivência de espermatozóides em baixas temperaturas. Quatrefages, em 1853, já se preocupava com a preservação da viabilidade dos gametas de peixes, investigando métodos alternativos para tal procedimento. Mantegazza, em 1866, sugeriu que os espermatozóides poderiam ser congelados para utilização futura como bancos de sêmen (Sherman, 1986). Jahnel(1938) in Holtz (2000) mostrou a capacidade de armazenamento de espermatozóides à temperatura de - 79 °C. Shettles (1940) in Holtz (2000) indicou a existência de variações individuais perceptíveis após o descongelamento. Pesquisas de Parkes (1945) mostraram sucesso na criopreservação de grandes volumes de sêmen (Polge *et al.*, 1949).

É geralmente aceito, contudo, que Christopher Polge, Audrey Smith e Alan Parkes (Polge *et al.*, 1949) foram os primeiros cientistas a demonstrar a possibilidade de se utilizar, de modo reproduzível, tecnologia de criopreservação de sêmen, mostrando, inclusive, que o glicerol tem interessantes e peculiares propriedades como meio crioprotetor. Bunge & Sherman (1953) propuseram a técnica de gelo seco para o armazenamento de espermatozóides visando uso futuro. A

técnica do vapor de nitrogênio líquido introduzida por Sherman no início dos anos 60 ainda continua a ser largamente empregada (Verheyen *et al.*, 1993). Assim, o congelamento com velocidade lenta e controlada tornou-se o método de escolha para a criopreservação do sêmen permitindo efetiva e uniforme desidratação celular e evitando a formação de cristais intracelulares (Gilmore *et al.*, 2000).

Sherman, em 1964, identificou padrões de toxicidade para o dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotetor. Ackerman em 1968, citado por Sherman (1986) mostrou as repercussões do choque térmico no congelamento e descongelamento. Matheson (1969) in Waites *et al.* (1997) consolidou a palheta de plástico como recipiente adequado para criopreservação e conseqüente armazenamento de sêmen.

PARÂMETROS SEMINAIS RELEVANTES

Coleta de sêmen

Com abstinência sexual de 2 a 5 dias, o sêmen pode ser coletado mediante automanipulação do pênis. É a técnica mais utilizada. Devido à possibilidade de contaminação, a coleta de sêmen deve ser realizada após lavagem e higienização das mãos. Tudo isso, deverá ser observado para a aquisição de material adequado para determinação dos parâmetros seminais e criopreservação do sêmen. A coleta deve ser feita em frascos de material atóxico ou vidro graduado, todos estéreis. A prática do coito interrompido pode contaminar a amostra, bem como ocorrer perda de fração do ejaculado (Rowe *et al.*, 2000).

Volume de sêmen

O volume de sêmen é um dos parâmetros mais oscilantes no estudo da reprodução humana. A técnica de obtenção de espermatozoides, o estímulo ejaculatório são fatores determinantes do volume obtido. Coletas fracionadas consecutivas tendem a proporcionar redução do volume de sêmen.

Concentração espermática

A determinação do número de espermatozoides liberados é um dos principais parâmetros utilizados na avaliação de sua viabilidade e na capacidade de se interagir com um número expressivo de óvulos, sendo fator determinante na eficácia do processo reprodutivo. Por isto, a estimativa do número de espermatozoides/mL de sêmen é um passo importante no processo de criopreservação (Waites *et al.*, 1997).

Diversas metodologias de avaliação da concentração espermática foram relatadas ao longo dos anos pela literatura, ou seja, em câmara de Neubauer, espermátócrito ou por avaliação espectrofotométrica (Berkson, 1940; Freud & Carol, 1964; Ganon *et al.*, 1966; Dacie & Lewis, 1984). O método ideal deveria fornecer maior acuracidade da concentração espermática, além de rápida aferição e diluições menores. Por último, a câmara de Makler foi introduzida na estimativa da concentração espermática.

Câmara de Makler

Formada por dois discos de vidro, horizontais e transparentes apoiados um ao outro através de quatro pontos de alta resistência com uma camada de quartzo que evita desgaste, se constitui em uma câmara especialmente desenvolvida para aferição da concentração espermática. Apresenta uma tampa com um quadrado de 1 mm² subdividido em 100 quadrículas de 0,1 por 0,1 mm. A contagem de espermatozoides situados em 10 quadrículas da câmara equivale ao número de esper-

matozoides em unidade de milhões. Esta câmara apresenta profundidade de 10 µm, o que permite observação óptica em um único plano focal, devendo ser este o volume a ser colocado na lâmina para contagem (Makler, 1978; Makler, 1980).

Motilidade espermática

É aceitável que aferições objetivas da motilidade espermática estejam correlacionadas com a fertilidade (Amann, 1989). Porém, os espermatozoides férteis devem manter e expressar uma série de características, que incluem desde estrutura normal de seus componentes funcionais até estabilização de seu conteúdo de DNA, passando pela manutenção da viabilidade da membrana plasmática. A temperatura é um importante parâmetro na avaliação da motilidade, sendo capaz de alterar seu período. As baixas temperaturas podem prolongar a motilidade espermática, porém, reduzem a velocidade dos espermatozoides (Hammerstedt *et al.*, 1990).

A CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN

Recipientes para congelamento

Usualmente, encontram-se disponíveis no mercado, dois tipos de recipientes mais utilizados na criopreservação de sêmen: palhetas e criotubo. A escolha do recipiente recai, principalmente, em razão do volume de sêmen a ser preservado e da disponibilidade de espaço para armazenamento. Assim, a literatura é vasta e variável quanto à indicação de um ou de outro, ou mesmo de ambos (Anger *et al.*, 2003).

Crioprotetores

A escolha do meio de criopreservação para o sêmen deve ser dirigida para a melhoria da capacidade de manter a integração e função celular durante o processo de congelamento e descongelamento. A capacidade de fertilização do sêmen fresco é, em muitos casos, maior do que a do congelado. Tal condição pode ocorrer devido ao uso de meio de criopreservação inadequado o qual provoca danos celulares atribuíveis ao crioprotetor utilizado (Verheyen *et al.*, 1993).

De uma maneira geral, pode-se agrupar os crioprotetores em dois grupos, os permeáveis (que apresentam proteção intracelular) e os impermeáveis (que propiciam proteção externa à célula). O primeiro grupo é composto pelo glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), metanol, propanediol e etilenoglicol, entre os mais utilizados. Os crioprotetores impermeáveis de maior utilização são a gema de ovo de galinha, leite em pó, açúcares, água de côco e glicose (Conti *et al.*, 1995; Gilmore *et al.*, 1995; Hallak *et al.*, 1999).

O crioprotetor permeável deve proporcionar:

- diminuição da taxa de difusão da água da célula,
- diminuição da temperatura de nucleação homogênea,
- diminuição da taxa de crescimento de cristais de gelo e,
- abaixamento do ponto de congelamento.

É importante a utilização de meios crioprotetores que, em função de sua osmolaridade, penetrem na membrana espermática durante o congelamento e saiam dessa membrana durante o descongelamento, causando baixo dano celular. Assim, a eficácia dos agentes crioprotetores pode ser medida comparando-se os parâmetros pré- congelamento com os obtidos no pós-descongelamento, como a motilidade. Além disso, o espermatozoide pode perder sua habilidade de atingir capacitação máxima ou mesmo perder alguns mecanismos

complexos de ativação do ovócito durante o processo de fertilização (Gilmore *et al.*, 1995; Devireddy *et al.*, 2000).

Taxas e Processos de Resfriamento

A passagem de sêmen, adicionado de crioprotetores, da temperatura ambiente para a temperatura de congelamento (-196°C) deve ser lenta e programada (Watson *et al.*, 1992). Resfriamento (10-50 °C/ min) lento pode ser parcialmente responsável pelo aumento na população de espermatozoides capacitados e funcionalmente viáveis. Esta taxa pode ser obtida utilizando-se botijões contendo apenas vapor de nitrogênio líquido ("dry shipper", Taylor-Wharton), o que também facilita a realização dos procedimentos de criopreservação no campo. Os botijões são hermeticamente fechados e mantêm temperatura interior constante, durante algumas semanas, em torno de -180 a -190 °C. (Jonhson *et al.*, 1985).

Devireddy e colaboradores, em 2000 e Anger e colaboradores em 2003, citam duas formas possíveis de resfriamento de sêmen:

- (i) imersão direta das ampolas no nitrogênio;
- (ii) suspensão das ampolas por 4 a 5 minutos no vapor de nitrogênio antes da imersão;

Os principais estudos na área de criopreservação visam, principalmente, esclarecer os danos que a membrana do espermatozoide pode sofrer resultantes dos processos de resfriamento e descongelamento entre as temperaturas de -15 a -60°C. Desta forma, o problema da criopreservação não é a habilidade do espermatozoide permanecer viável à -196°C. Quando uma célula é resfriada tipicamente, o gelo forma-se no compartimento extracelular e a membrana age como uma barreira prevenindo o crescimento do cristal de gelo no interior da célula. Os sais são excluídos dos cristais de gelo em crescimento, levando à concentração de sais na água descongelada restante (Mazur, 1984). O aumento do gradiente osmótico através da membrana plasmática causa difusão do conteúdo celular para fora da célula ocorrendo desidratação de ambas as célula e membrana plasmática. Quando a cristalização do gelo continua no meio extracelular, as células ficam presas nos canais da solução descongelada entre os cristais de gelo. Se as taxas de congelamento são lentas o suficiente para permitir equilíbrio da água através da membrana, os canais descongelados (com células unidas) ainda existirão em temperaturas bem abaixo do ponto de congelamento da água (Parks & Graham, 1992).

Taxas rápidas de resfriamento formam gelo intracelular e isto pode também induzir ao dano e morte celular. Grande cristais de gelo intracelular são deletérios às células, ao passo que microcristais necessariamente não o são. A formação de cristais de gelo é uma função da taxa de resfriamento e descongelamento, o controle estrito e equalizado destas taxas podem minimizar os danos celulares causados pelo gelo intracelular (Mazur, 1984; Amann & Pickett, 1987). Durante o processo de criopreservação, podem ocorrer as seguintes alterações na célula espermática devido ao resfriamento:

1. Alterações morfológicas (Parks & Graham, 1992):

- a. Rompimento da membrana plasmática
- b. Danos mitocondriais

2. Alterações bioquímicas (Quinn, 1985):

- a. Perda da permeabilidade seletiva da membrana
- retenção de íons sódio e cálcio intracelulares

- perda de íons magnésio e potássio
- liberação de enzimas
- liberação de fosfolípidios
- b. Decréscimo da atividade respiratória e da glicólise
- redução dos níveis de ATP
- perda da motilidade
- c. Degeneração do DNA

3. A viabilidade das células após o congelamento é determinada pela:

- a. Taxa de resfriamento
- b. Temperatura final atingida
- c. Aditivos
- d. Maturação espermática

As taxas de congelamento são cruciais para a manutenção da viabilidade celular. Se a taxa for ótima e a membrana celular for permeável à água, ela torna-se progressivamente desidratada e é funcional após o descongelamento. Quando as taxas de congelamento não são ótimas, a perda de viabilidade das células está relacionada a vários eventos, como a diminuição do conteúdo de água intracelular, com conseqüente aumento das concentrações de solutos intracelulares e precipitação desses solutos, levando as alterações de pH (Watson, 1995).

Os seguintes fatores são importantes para a aplicação de taxa de congelamento adequada:

- viscosidade da solução intracelular (Mazur, 1984),
- área da superfície celular (Fahy, 1986),
- taxa de difusão da água através da membrana celular (Farrant, 1980),
- distância entre a célula e o primeiro cristal de gelo a se formar (Farrant, 1980),
- viscosidade da solução extracelular e ,
- permeabilidade do crioprotetor utilizado (Conti *et al.*, 1995).

As principais causas de crio-injúria são:

- a) choque frio, temperatura crítica entre 0 e -40°C,
- b) pH (Darszon *et al.*, 1999),
- c) gelo intracelular (Farrant, 1980),
- d) gelo extracelular (Farrant, 1980),
- e) toxicidade do crioprotetor (Holtz, 2000),
- f) efeito soluto (Gilmore *et al.*, 1995),
- g) efeito volume (Gilmore *et al.*, 1995).

Tempo de estocagem

Não existe grande volume de informação acerca do tempo de armazenamento do sêmen congelado. Em vertebrados, a expectativa de sobrevida teórica indica algo em torno de 4.000 anos (Trummer *et al.*, 1998). Em março de 2004, foi relatado o caso do nascimento de um bebê com sêmen congelado por 21 anos e encaminhado para a técnica de fertilização *in vitro*. Em 2005, foi observado que o sêmen de dois indivíduos foi congelado durante 21 e 28 anos e ambos encaminhados para inseminação intrauterina, resultando no nascimento de dois bebês (Horne *et al.*, 2004; Feldschuh *et al.*, 2005). Clarke e colaboradores em 2006 avaliaram seis amostras de sêmen após 28 anos de criopreservação em nitrogênio líquido. Os resultados mostraram que as

amostras mostraram recuperação de motilidade no pós descongelamento e capacidade de ligação com a zona pelúcida do óvulo e que quatro amostras também mostraram níveis normais de reação de acrossomal. Valorizou-se neste estudo, a necessidade de criopreservação seminal anterior a procedimentos quimioterápicos.

Em 2001, pesquisadores australianos estudaram por mais de 22 anos, 930 homens que buscaram congelamento seminal em um único hospital acadêmico dos quais 90% tiveram o sêmen criopreservado. 74% dos indivíduos sobreviveram à doença. 90% dos indivíduos começaram a utilizar o material dentro de 10 anos de armazenamento e nenhum depois de 15 anos. A concentração seminal mostrou-se reduzida nos indivíduos com etiologia de câncer testicular (Kelleher *et al.*, 2001).

Em outro estudo, em 2005, foram avaliadas 238 amostras individuais de sêmen que tinham sido colecionadas entre 1976 e 1989 a intervalos regulares. O material era proveniente de 34 pacientes, dos quais 18 tinham câncer. Para tal avaliação, a cada 3 anos uma amostra foi descongelada para análise. Durante o curso do período de armazenamento limitado a um máximo de 21 anos, todos os parâmetros apresentaram-se deteriorados em comparação ao sêmen fresco. A motilidade foi o parâmetro mais sensível com uma diminuição de cerca de 80%. A densidade espermática não reduziu significativamente. Os parâmetros dos critérios investigados não diminuíram linearmente ou proporcionalmente com a duração de armazenamento, mas bastante mais diretamente depois do congelamento inicial. Estas mudanças ficaram crescentemente menores como o tempo de armazenamento alongado. Assim, após vinte e um anos, amostras seminais congeladas mostram-se seguras em nitrogênio líquido e com características reproduzíveis (Bolten *et al.*, 2005).

Recente estudo demonstrou que somente 27% de homens que armazenam sêmen antes de tratamento de câncer utilizaram as amostras dentro de dez anos. Outro dado relevante consiste no fato que muitos dos pacientes que solicitam criopreservação de sêmen são jovens (idade média de 24 anos). Conseqüentemente é provável que seja aguardado o início de formação de sua família (Blackhall *et al.*, 2002).

Análise pós-descongelamento

Os espermatozoides são células sensíveis à alteração brusca de temperatura (Hammerstedt *et al.*, 1990). Fortes indícios revelam tendência do uso, no futuro, da técnica de vitrificação, baseada em congelamento e descongelamentos ultra-rápidos, durante os quais não há tempo suficiente para a formação de cristais (Brotherton, 1990). A motilidade espermática pós-descongelamento nos fornece uma idéia geral da habilidade de fertilização. A utilização do banho-maria a 30-40°C para descongelamento tem sido vastamente empregada. Para Cosson *et al.* (1999) quando NaCl é adicionado ao plasma seminal, a motilidade é induzida.

CONCLUSÃO

Passados 60 anos, a habilidade de se congelar espermatozoides tem causado profundo impacto na ciência reprodutiva. A melhoria da qualidade dos crioprotetores, a forma de acondicionamento do sêmen e o maquinário utilizado, propiciam melhora significativa na viabilidade dos espermatozoides após o descongelamento. Novos modelos de biologia molecular, bioquímica analítica, físico-química e biologia reprodutiva, são preditivos ao avanço da reprodução humana masculina.

REFERÊNCIAS

- Anger J. T., Gilbert B. R., Goldstein M. Cryopreservation of sperm: Indications, methods and results. *J. Urol.*, 170: 1079-1084, 2003.
- Amann R. P. Can the fertility potential of a seminal sample be predict accurately? *J. Androl.*, 10: 89-92, 1989.
- Amann R. P., Pickett B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Science*, 7: 145- 173, 1987.
- Berkson J. The error of estimate of the blood cell count as made with the hemocytometer. *Amer J. Physiol.*, 128: 309, 1940.
- Blackhall F. H., Atkinson A. D., Maaya M. B., Ryder W. D. J., Horne G., Brison D. R., Lieberman B. A., Radford J. A. Semen cryopreservation, utilization and reproductive outcome in men treated for Hodgkin's disease. *British Journal of Cancer*, 87: 381-384, 2002.
- Bolten M., Weissbach L., Kaden R. Cryopreserved human sperm deposits: usability after decades of storage. *Urologe* 44: 904-908, 2005.
- Brotherton J. Cryopreservation of human sperm. *Arch. Androl.*, 25: 181-195, 1990.
- Bunge R. G., Sherman J. K. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature*, 172: 767-768, 1953.
- Clarke G. N., Liu Y., Baker H. W. Recovery of human sperm motility and ability to interact with the human zona pellucida after more than 28 years of storage in liquid nitrogen. *Fertil. Steril.*, 86: 721-722, 2006.
- Conti F., Marti L. C., Feher V. B. B. *et al.* Água de côco como solução crioprotetora para criopreservação de espermatozoides humanos. *LAES & HAES*, 16: 88-90, 1995.
- Cosson J., Billard R., Cibert C., Dréanno C., Suquet M. Ionic factors regulating the motility of sperm. In: Gagnon C. The male gamete: From basic science to clinical applications. Vienna: Cache River Press, p. 161-186, 1999.
- Dacie J. V., Lewis S. M. Practical haematology. London: Churchill Livingstone, 1984.
- Darszon A., Labarca P., Nishigaki T., Espinosa F. Ions channels in sperm Physiology. *Physiological Reviews*, 79: 481-510, 1999.
- Devireddy R. V., Swanlund D.J., Roberts K. P., Pryor J. L., Bischof J. C.
- The effect of extracellular ice and cryoprotective agents on the water permeability parameters of human sperm plasma membrane during freezing. *Hum. Reprod.*, 15: 1125-1135, 2000.
- Fahy G. M. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology*, 23: 1-13, 1986.
- Farrant J. General observation on cell preservation. In: Ashwood-Smith S., Farrant J.
- Low temperature preservation in biology and medicine. London: Pitman Medical, p. 1-19, 1980.
- Feldschuh J., Brassel J., Durso N., Levine A. Successful sperm storage for 28 years. *Fertil. Steril.*, 84: 1017, 2005.

- Freund M., Carol B. Factors affecting haemocytometer counts of sperm concentration in human sperm. *J. Reprod. Fertil.*, 8: 149-155, 1964.
- Ganon T. E., Athens J. W., Boggs D. R., Cartwright G. E. An evaluation of the variance of leukocyte counts as performed with the hemocytometer, coulter and fisher instruments. *Am. J. Clin. Path.*, 46: 684-691, 1966.
- Gilmore J. A., McGann L. E., Liu J., Gao D. Y., Peter A. T., Klerhans F. W., Critser J. K. Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 53: 985-995, 1995.
- Gilmore J. A., Liu J., Woods E. J., Peter A. T., Critser J. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Hum. Reprod.*, 15: 335-343, 2000.
- Hallak J., Arap M. A., Borges E., Lucon A. M., Arap S., Agarwal, A. Identificação de um meio ideal de criopreservação para espermatozoides humanos. *J. Brasileiro Reprod. Assist.*, 3: 9-13, 1999.
- Hammerstedt R. H., Graham, J.K., Nolan, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl.*, 11: 73-88, 1990.
- Holtz W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53: 47-58, 2000.
- Horne G., Atkinson A. D., Pease E. H., Logue J. P., Brison D.R., Lieberman B. A. Live birth with sperm cryopreserved for 21 years prior to cancer treatment case report. *Hum. Reprod.*, 19: 1448-1449, 2004.
- Jonhson A. R., Lipshultz L. I., Smith R.G. Thermal shock (37°C) to spermatozoa stored at 4°C optimizes capacitation. *J. Urol.*, 133: 74-77, 1985.
- Kelleher S., Wishart S. M., Liu P. Y., erner L., Di Pierro I., Donway A. J., Xandelsman D. J. Long-term outcomes of elective human sperm cryostorage. *Hum. Reprod.*, 16: 2632-2639, 2001.
- Makler A. A new chamber for rapid sperm count and motility estimation. *Fertil. Steril.*, 30: 313-318, 1978.
- Makler A. The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation. *Fertil. Steril.*, 33: 337-338, 1980.
- Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implication. *Amer J. Physiol.*, 27: 125-142, 1984.
- Nieschlag E., Behre H. M. *Andrology – Male reproductive health and dysfunction*. Berlin: Springer, 1997.
- Parks J. E., Graham J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membrane. *Theriogenology*, 30: 209-222, 1992.
- Polge C., Smith A., Parkes A. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164: 166, 1949.
- Quatrafages A. D. Recherches sur la vitalité des spermatozoïdes de quelques poissons d, eau douce. *Ann. Sci. Nat.*, 19: 341-369, 1853.
- Quinn P. J. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. *Cryobiology*, 22: 128-146, 1985.
- Rowe D. J., Comhaire F. H., Hargreave T. B., Mahmoud A. H. A. *WHO manual for standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male*. Cambridge: CUP, 2000.
- Sherman J. K. Currents status of clinical cryobanking of human semen. In: Paulson J. D., Negro-Vilar A., Lucena E., Martini L. *Andrology, male fertility and sterility*. Orlando: Academic Press, p. 517-547, 1986.
- Trummer H., Tucker K., Young C., Kaula N., Meacham R. B. Effect of storage temperature on sperm cryopreservation. *Fertil. Steril.*, 70: 1162-1164, 1998.
- Verheyen G., Pletincx I., Steirteghem A. Effect of freezing method, thawing temperature and post-thaw dilution/washing on motility (CASA) and morphology characteristics of high-quality human sperm. *Hum. Reprod.*, 8: 1678-1684, 1993.
- Waites G. M. H., Frick J., Baker G. W. H. *Current Advances in Andrology*. Salzburg: Monduzzi Editore, 1997.
- Watson P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7: 871-891, 1995.
- Watson P. F., Critser J. K., Mazur, P. Sperm preservation: fundamental cryobiology and practical implications. In: Templeton A. A., Drife J.O. *Infertility*. New York: Springer, p. 101-114, 1992.

Sugestão para a Revista?

E-mail: **journalsbra@cmb.com.br**

Fator Aloimune do Abortamento Espontâneo Recorrente: A Imunoterapia pode ser Útil?

Principles of Cryopreservation and a Review of Cryopreservation of Human Sperm

Haytum del Carmen Orozco Amador^{1, 2}
Maria do Carmo Borges de Souza²
Ricardo M. de Oliveira³

Endereço para correspondência:
 Email: haytum@hotmail.com

1-Curso de Pós-Graduação, senso lato, em Reprodução Humana Assistida, Associação Instituto Sapientiae, São Paulo

2-Setor de Reprodução Humana do Instituto de Ginecologia da UFRJ

3- Ex-Professor da FMUSP e Boston University. Diretor da RDO Diagnóstico Médicos

RESUMO

Esta revisão abrange o fator aloimune no aborto espontâneo recorrente (AER). Baseia-se em busca da literatura especializada nos últimos 10 anos (1997-2006), nas bases de dados OVID - Medline, Science Direct e Lilacs, no Pubmed, na Bireme e Google.

Resultados: AER é a perda de três ou mais gestações clínicas consecutivas, antes da 20ª semana de gravidez ou com produto fetal com menos de 500g. Pode afetar até 5% dos casais férteis. Cerca de 50-60% dos abortamentos espontâneos tem causas genéticas, mas os AER apresentam baixa incidência destas alterações. Aos AER tem sido creditada etiologia idiopática, de natureza auto ou aloimune em 50 a 60% dos casos. Os mecanismos envolvidos incluem a presença de anticorpos citotóxicos, ausência de anticorpos bloqueadores maternos, compartilhamento de antígenos HLA, hipertaividade das citocinas Th-1 e alterações na função e distribuição das células NK. Aloimunidade se refere às diferenças imunológicas entre indivíduos da mesma espécie. A hipótese é de

que a diferença antigênica materno-embriônica seria benéfica para o desenvolvimento do embrião. A histocompatibilidade materno-embriônica pode levar a defeitos na interação mãe-embrião, alterando a produção de fatores humorais e celulares maternos, vitais para o sucesso da gravidez. Conclusões: AER constitui 5% das ocorrências obstétricas. Embora a maioria dos estudos recentes mostrem resultados encorajadores da imunoterapia, persistem controvérsias. A imunoterapia é uma opção terapêutica de bons resultados se seguida de investigação e protocolo adequados para o tratamento. Permanece a necessidade de estudos multicêntricos bem desenhados para maiores esclarecimentos.

Palavras-chave- imunoterapia; aborto, habitual

ABSTRACT

This paper reviews the alloimmune factor of the recurrent spontaneous abortion (RSA). It is based on literature accomplished in publications of the last 10 years (1997-2006), researching the data of bases OVID - Medline, Science Direct and Lilacs and the search sites Pubmed, Bireme, Google. Results: The recurrent spontaneous abortion (RSA) is defined as the loss of 3 or more consecutive gestations, clinically detectable, before 20 weeks of pregnancy or less

Recebido em 14/04/07
 Aceito em 01/06/2007

than 500 grams of the weight of the fetal body. It could affect up to 5% of the fertile couples. Approximately 50-60% of the spontaneous abortions are due to genetic causes, however, abortions in women with RSA have a low incidence of genetic abnormalities. Some authors suggest that the cause of idiopathic RSA is autoimmune or alloimmune in 50-60% of the cases, and the involved mechanisms include presence of antibodies cytotoxic, absence of maternal blocking antibodies, increased sharing of antigens HLA, hyperactivity of cytokines Th-1 and disturbances in the function and distribution of the cells NK. The term alloimmunity refers to the immunological differences among individuals of the same species. The hypothesis is that the antigenic maternal-embryonic difference would be beneficial for the development of the embryo. The maternal-embryonic histological compatibility can take to defects in the interaction mother-embryo, impeding the production of humoral and cellular factors of vital maternal origin for the success of the pregnancy. Conclusions: RSA constitutes a 5% obstetric occurrence. Although most of the recent studies on immunotherapy show encouraging results, controversies exist on the subject. The immunotherapy constitutes a therapeutic option with good results if accomplished a complete investigation protocol and correct indication. Multicentric placebo-controlled studies are still necessary for larger explanations.

Key-words- immunotherapy; abortion, habitual

INTRODUÇÃO

De todas as gestações clinicamente diagnosticadas, aproximadamente 10-15% terminam em abortamento durante o primeiro trimestre (Warburton & Fraser, 1964), índice que aponta o abortamento como a complicação mais comum da gravidez humana.

O abortamento espontâneo recorrente (AER) é definido como a perda de 3 ou mais gestações consecutivas, clinicamente detectável antes das 20 semanas de gravidez ou menos de 500 gramas do peso do corpo fetal, podendo afetar até 5% dos casais férteis de acordo com Coulam (1993). Edmonds *et al.* (1982) mostram que pode ocorrer com aproximadamente uma entre 300 mulheres grávidas.

Os AER primários são aqueles em que todas as gestações foram perdidas e não existe antecedente de nenhum nascido vivo. Os AER secundários são aqueles que têm ao menos uma gravidez bem sucedida, independente do número de perdas (Pandey *et al.*, 2005).

A perda é classificada como: pré-embriônica - menos de 5 semanas; embriônica - entre 5-10 semanas; e fetal - mais de 10 semanas (Porter & Scott, 2005).

Estudos sugerem que o risco de uma perda subsequente da gravidez aumenta gradativamente, sendo de 24% após duas perdas, 30% após três e 40% após quatro abortos espontâneos consecutivos (Regan *et al.*, 1989).

As causas podem ser genéticas, endócrinas, anatômicas, imunológicas, microbiológicas, meio-ambientais e idiopáticas. Aproximadamente 50-60% dos abortos espontâneos ocorrem por causas genéticas. Abortos em mulheres com AER têm uma baixa incidência de anormalidades genéticas (de 2 a 4%), e aproximadamente em 50% dos casos a etiologia é desconhecida (Stephenson, 1996).

Dentre as causas imunológicas, os fatores autoimunes e aloimunes podem estar estreitamente relacionados à falha imunológica da gravidez, e frequentemente encontram-se associados (Eblen *et al.*, 2000).

Alguns autores sugerem que AER idiopático é de causa autoimune e/ou aloimune em 50-60% dos casos, e os mecanismos

envolvidos incluem presença de anticorpos citotóxicos, ausência de anticorpos bloqueadores maternos, compartilhamento aumentado de antígenos HLA, hiperatividade de citocinas Th-1 e distúrbios na função e distribuição das células NK (Porter & Scott, 2000; Pandey *et al.*, 2004).

O termo aloimunidade refere-se às diferenças imunológicas entre indivíduos da mesma espécie. Clarke e Kirby, em 1966, formularam a hipótese que a diferença antigênica materno-embriônica seria benéfica para o desenvolvimento do embrião. Desde então, a aloimunidade tem sido associada com AER. A histocompatibilidade materno-embriônica pode levar a defeitos na interação mãe-embrião, impedindo a produção de fatores humorais e celulares de origem materna vitais para o sucesso da gravidez.

Segundo Pandey *et al.* (2005), o relacionamento e reconhecimento imunológico da gravidez são fundamentais para a manutenção da mesma. O embrião apresenta antígenos e eles devem ser adequadamente reconhecidos pelo sistema imune materno. O reconhecimento inadequado destes antígenos ou compartilhamento aumentado de antígenos leucocitários humanos com o pai podem inibir a produção de anticorpos anti-HLA importantes para a manutenção da gravidez. Além disso, alterações na expressão de moléculas HLA-G, padrão de citocinas T helper 1 (Th-1) e citotoxicidade de células *natural killer* (NK) também podem induzir abortamento em mulheres com AER (Aldrich *et al.*, 2001).

Várias formas de tratamento, como terapia antitrombótica com aspirina e heparina (Cadavid *et al.*, 1999), terapia intravenosa com imunoglobulina (Graphou *et al.*, 2003), imunização com linfócitos paternos (Pandey & Agrawal, 2004) e a recentemente usada terapia com 1 alfa, 25 diidroxi-vitamina D3 (Bubanovic, 2004) têm sido postuladas como terapias eficazes para causa aloimune de AER. Seus efeitos são atribuídos à indução apropriada de fator humoral, deslocamento da resposta imune Th-1 à Th-2 e inibição significativa da atividade das células NK.

Em 1985 Mowbray *et al.* publicaram o primeiro estudo aleatório duplo-cego que comparou o efeito da imunização com linfócitos do parceiro e imunização com os próprios linfócitos, observando resposta favorável estatisticamente significativa a favor do grupo tratado com imunização com células do parceiro. Muitos estudos, desde então, mostram divergência de opiniões quanto à eficácia deste tratamento. Meta-análise de 1994, sobre a imunoterapia com linfócitos do parceiro, concluiu que esta terapêutica beneficia entre 8-10% das mulheres tratadas, porém, a falta nesse momento de testes diagnósticos eficazes impossibilitava a identificação dos pacientes que provavelmente se beneficiariam do tratamento, o que prejudicava avaliar sua verdadeira eficácia (Recurrent Miscarriage Immunotherapy Trialists Group 1994).

Permanece controverso o tratamento eficaz para as mulheres com AER de etiologia aloimune, devido aos diferentes métodos usados pelos investigadores como: concentração celular, tempo de intervalo entre as imunizações, via de imunização etc (Pandey & Agrawal, 2003). Assim, o objetivo deste trabalho é rever os achados sobre o fator aloimune do abortamento espontâneo de repetição registrados em meio científico, de forma a melhor estabelecer a eficácia no tratamento.

MÉTODO

Trata-se de uma revisão bibliográfica realizada em publicações dos últimos 10 anos (1997-2006), tendo como fonte da pesquisa as bases de dados OVID - Medline, Science Direct e Lilacs e os sites de busca Pubmed, Bireme, Google. Artigos relevantes dos anos 1964, 1966, 1981, 1982, 1985, 1989, 1992, 1993, 1994, 1995 e 1996 também foram incluídos.

REVISÃO DA LITERATURA

Aloimunidade e aborto de repetição

O complexo maior de histocompatibilidade (MHC) é um conjunto de genes localizado no braço curto do cromossomo 6 e codifica os antígenos HLA (antígeno leucocitário de histocompatibilidade). Estes antígenos são glicoproteínas das membranas celulares que controlam a resposta imune e atuam como antígeno de histocompatibilidade. Os antígenos HLA são formados por 4 grupos: antígenos HLA classe I, II, III e IV, sendo as principais a classe I e II. Moléculas HLA classe I podem ser clássicas (HLA-A, HLA-B e HLA-C) ou não-clássicas (HLA-G, HLA-E). Moléculas HLA classe II são: HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR. As células NK (natural killer) são células encontradas na circulação periférica e no útero e induzem a morte celular quando ativadas. O reconhecimento das moléculas HLA-G pelas células NK uterinas promove uma resposta imune favorável à gravidez, resposta imune Th2 (Rizzo, 2001).

O trofoblasto embrionário expressa antígenos do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) na sua superfície que, uma vez reconhecidos pelo sistema imune materno, desencadeia uma resposta aloimune necessária para aceitação imunológica da gravidez (Creus *et al.*, 1998, 2000). Na decidua, células trofoblásticas extravilosas MHC classe I positivas entram em contato direto com células imunes decíduais, o trofoblasto extraviloso tem antígenos MHC classe I, não clássico, não polimorfo, HLA-G e HLA-E, que o protegem das células T e células NK maternas. Se os mecanismos de proteção aloimune falham, ocorre o abortamento mediado por causas aloimunes (Takeshita, 2004). O antígeno HLA, provoca a produção de anticorpos anti-HLA e anticorpos anti-idiotípicos anti-HLA, identificados nas primeiras semanas de gestações que evoluem normalmente, sugerindo que anticorpos anti-idiotípicos participem na resposta aloimune materno fetal, acabando numa supressão do organismo materno em relação ao feto (Reed *et al.*, 1991). No entender de King *et al.* (1997), a ativação do sistema imune materno suprime principalmente a citotoxicidade das células NK.

Um grande número de células NK decíduais estão em contato direto com o trofoblasto e são consideradas de vital importância no sucesso da gravidez, pois estão envolvidas na produção de citocinas e outros importantes mediadores no controle da invasão e diferenciação trofoblástica, remodelação das artérias decíduais e crescimento placentário. Ao mesmo tempo, são também as principais células envolvidas na agressão do trofoblasto nos casos de abortamento aloimune. Possuem antígenos de superfície que as caracterizam: CD16 e CD56 e receptores de ativação (KAR – *Killer Activating Receptors*) e de inibição (KIR – *Killer Inhibitory Receptors*) do seu potencial citotóxico. Sua função é regulada por um balanço entre ativação e inibição de sinais fornecidos por seu receptor no reconhecimento de ligantes específicos, a maioria moléculas HLA (HLA-C, HLA-G, HLA-E) expressos no trofoblasto invasor (Varla-Leftherioti, 2005).

Mulheres que abortam geralmente têm uma quantidade limitada de receptores inibidores de células NK decíduais e, em muitas delas, faltam receptores inibidores específicos para as moléculas HLA embrionárias (Varla-Leftherioti *et al.*, 2003; Varla-Leftherioti, 2005).

Kwak *et al.* (1995) demonstraram que um número significativo de mulheres com AER imunológico apresenta um imunofenótipo com marcado aumento de níveis de células NK CD56+, CD56+/CD16+ e células B CD19+ no sangue periférico, por-

tanto baixos níveis destas células, principalmente de células NK CD56+ durante o início da gravidez estão associados com o sucesso da mesma. Dentre os mecanismos reguladores destas células estão a apoptose induzida pela progesterona, a proteína TJ6 induzida pela gravidez, citocinas secretadas pelos monócitos e trofoblasto e outros fatores presentes no soro da gestante.

Wegmann (1993) sugeriu que, durante a gravidez, as citocinas produzidas pelo Th-2 encontram-se em maior quantidade às produzidas pelo Th-1, favorecendo o sucesso da gravidez. Th-1 é um tipo de reação que provoca uma resposta inflamatória com aumento do interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral beta (TNF- β), interleucina 2 (IL-2) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que favorecem a toxicidade do trofoblasto e a falha da gravidez nas mulheres com AER (Lim *et al.*, 2000).

Na vigência de gravidez, o sistema imune materno deve reconhecer o HLA paterno como diferente e induzir a expressão de vários aloanticorpos (anticorpo citotóxico antipaterno [APCA], anticorpo anti-idiotípico [Ab2], anticorpo bloqueador da reação mista de linfócitos [MLR-Bf]), que revestem o embrião e o protegem da resposta imune citotóxica materna. Portanto, a ausência, ou expressão diminuída destes aloanticorpos, poderia causar AER (Ito *et al.*, 1999; Pandey *et al.*, 2005). Pandey e Agrawal (2003) avaliaram a prevalência de Ab2 nas mulheres com AER e nas mulheres com gravidez normal encontrando, Ab2 positivo em 30% das mulheres com gravidez normal e nenhum resultado positivo nas mulheres com AER, indicando a importância deste aloanticorpo na manutenção da gravidez.

King *et al.* (1997) demonstraram que, durante a gravidez, peptídeos HLA-G expressos no trofoblasto devem ser reconhecidos pelo receptor inibidor das células natural killer (KIR). Esta interação regula a função da célula NK, bloqueando sua citotoxicidade, suprime a atividade da célula T na produção de citocinas Th-1 (TNF- α , TNF- β , IFN- γ , IL-2), inibe a atividade da célula B na expressão de auto-anticorpos (APA- anticorpo anti-fosfolípide, ANA- anticorpo antinúcleo, ATA- anticorpo anti-tireoideano, AECA - anticorpo anti-endotelial), assim como estimula a função da célula B na produção de alo-anticorpos (APCA, Ab2, MLR-Bf) e a função da célula T na produção de citocinas Th-2 (IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-13, TGF- β). Entretanto, se peptídeos de HLA-G interagem com o receptor ativador das células NK (KAR) induzem a secreção de citocinas Th-1, autoanticorpos e citotoxicidade da célula NK, assim como a inibição da expressão de aloanticorpos e citocinas Th-2. Portanto a supressão da atividade da célula NK poderia ajudar na manutenção da gravidez. As células NK decíduais não são citolíticas, mas produzem alguns fatores como IFN- γ , que ativa os macrófagos decíduais para a produção de elevados níveis de óxido nítrico e TNF- α que danificam o embrião não pela lise direta das células trofoblásticas e sim pela apoptose e inibição da secreção do fator estimulador de colônia dos macrófagos e granulócitos (GM-CSF) do epitélio uterino (Wilson *et al.*, 1997).

DIAGNÓSTICO

a- MLR teste de supressão

Cultura mista de linfócitos com identificação de fator inibidor no soro materno contra linfócitos do parceiro (avalia a presença de anticorpos bloqueadores), tendo resultado alterado quando a capacidade do soro da paciente em inibir a resposta autóloga aos linfócitos do parceiro foi menor de 50%. (Barini *et al.*, 1998)

b- Crossmatch por microlinfocitotoxicidade

Prova cruzada com linfócitos paternos, avalia a presença de anticorpos linfocitários antipaternos ligados ao complemento. Alterado quando negativo (Barini *et al.*, 1998).

c- Crossmatch por citometria de fluxo

Prova cruzada com linfócitos paternos, avalia a presença de anticorpos linfocitários antipaternos ligados e não ligados ao complemento. Considerado pela literatura como o melhor método na área da reprodução (Matzner *et al.*, 1995). Resultado alterado quando negativo.

Matzner *et al.* (1995) compararam citometria de fluxo e microcitotoxicidade na avaliação da terapia aloimune em AER, observando vantagens da citometria de fluxo na determinação dos níveis maternos de anticorpos linfocitários antipaternos. A citometria de fluxo demonstrou ser mais sensível, fornecer resultados reprodutíveis e mensurar anticorpos maternos ligados e não ligados ao complemento, devendo ser a escolha para determinar a necessidade da imunoterapia e monitorar a eficácia do tratamento.

De igual forma, Matsubayashi *et al.* (2000) avaliaram a eficácia do crossmatch por citometria de fluxo como método diagnóstico e de monitoramento em pacientes com AER submetidas à aloimunização. Concluíram que citometria de fluxo previamente negativa e se positivando após imunoterapia é associada com resultados bem sucedidos de gravidez, portanto pode ser incluído nos testes de laboratório rotineiros para diagnosticar e monitorar AER.

Estes testes são a base para a imunoterapia com leucócitos paternos, que tem relatada uma taxa de sucesso de 68%, quando executada e monitorada corretamente, estatisticamente significante quando comparada com 54% no grupo controle (Pandey *et al.*, 2004).

OUTROS TESTES UTILIZADOS SÃO:

d- Análise quantitativa e funcional das células NK

Emmer *et al.* (2000) demonstraram que a atividade da célula NK periférica e das células CD56+, CD16+ está aumentada durante o início da gravidez em mulheres com ERA. Assim, a análise quantitativa e funcional das células NK poderia ser usada para monitorar o tratamento e o prognóstico da gravidez (Yamada *et al.*, 2001).

e- Relação Th-1/Th-2

Hayakawa *et al.* (2000) reportaram uma relação Th-1/Th-2 significativamente maior nas pacientes com AER, quando comparadas com o grupo controle, mostrando assim que poderia ser usada como diagnóstico de causa aloimune do AER.

TRATAMENTO

O mais amplamente usado é a imunoterapia com linfócitos paternos (imunoterapia ativa), e a terapia com imunoglobulina endovenosa (imunoterapia passiva).

A imunoterapia foi inicialmente referida por Beer *et al.* (1981), assim como por Taylor e Faulk (1981), como tratamento na prevenção do abortamento de repetição. Apesar de muitos anos de uso, sua eficácia permanece em dúvida e dezenas de estudos têm sido feitos para obter maiores esclarecimentos.

Kwak *et al.* (1996) resumiram teorias que explicam o efeito

da imunoterapia ativa e passiva na indução da tolerância em transplantes, doença autoimune e AER (Tabela).

Tabela . Imunoterapia Ativa e Passiva.

| Imunoterapia | Teoria |
|---|--|
| Imunoterapia Ativa (Transfusão de linfócitos) | -Produção de anticorpos antipaternos ou anticorpos bloqueadores -Modulação da atividade da célula NK -Modificação na produção de citocinas |
| Imunoterapia Passiva (Imunoglobulina endovenosa) | -Supressão de autoanticorpos -Neutralização de autoanticorpos -Modulação da atividade da célula NK -Modificação da produção de citocinas -Inibição da ativação do complemento -Modulação e bloqueio do receptor FC -Inibição de superantígenos -Modulação das moléculas de adesão nos linfócitos T -Indução da apoptose de linfócitos citotóxicos ativados |

Revisões Cochrane seguidas têm concluído que nenhuma das terapias é eficaz em toda a população tratada (Scott, 2003), porém os estudos incluídos foram pequenos e heterogêneos nos critérios de inclusão de pacientes e protocolos de tratamento. Outras meta-análises que avaliaram a eficácia em subgrupos específicos de pacientes têm relatado seu benefício (Christiansen *et al.*, 2004).

Estudo realizado por Christiansen *et al.* (2004) visou esclarecer o tipo de imunização mais apropriada em AER e concluiu que imunização com linfócitos tem melhores resultados nas pacientes com AER primário, e tratamento com imunoglobulina endovenosa (IgEV) nas que tiverem AER secundário ou óbito fetal intra-útero no segundo trimestre. Portanto, usando protocolos corretos de imunização nos subgrupos adequados de pacientes, a eficácia da terapia melhoraria consideravelmente. Seria também necessário monitorar as mudanças de parâmetros imunes que podem indicar o sucesso do tratamento e esclarecer ainda mais seu mecanismo de ação. Defendem o uso de linfócitos e imunoglobulina em doses maiores às comumente utilizadas e acham que esta modalidade explica em parte os bons resultados de gravidez em suas pacientes, tendo por base o estudo feito por Wood *et al.* (2001) que afirma que administrar endovenosamente doses elevadas de um antígeno, na ausência de outros sinais estimuladores, é a melhor forma de induzir a tolerância, e não o uso de doses menores intradérmica ou subcutaneamente.

a- Terapia com imunoglobulina endovenosa (IgEV):

Visa a neutralizar o efeito citotóxico da resposta imune materna contra o feto, provocando deslocamento da resposta imune Th-1 à Th-2 (Graphou *et al.*, 2003), supressão da atividade dos anticorpos antifosfolípidos, transferência passiva de anticorpos bloqueadores ou anti-idiotípicos, *down regulation* da função da célula B, modulação da resposta mediada por células, redução da atividade da célula T e inibição da ativação do complemento (Morikawa *et al.*, 2001; Graphou *et al.*, 2003).

De Carolis *et al.* (1997) vacinaram 72 mulheres grávidas com diagnóstico de AER, 49 autoimune (68%) e 23 aloimune (32%), destas, 63 tiveram gravidez a termo com recém nascido saudável

(43/49, 87.7% autoimune; 20/23, 87% aloimune) e 9 evoluíram com abortamento (6 autoimune, 3 aloimune), demonstrando que esta terapia pode melhorar significativamente o resultado da gravidez em pacientes com AER.

Kwak *et al.* (2000) avaliaram o uso pós-concepcional da IgEV no tratamento das mulheres com AER que apresentavam aumento dos níveis de células NK CD56+ na gravidez. Os autores concluíram que este tratamento melhora significativamente o resultado reprodutivo destas mulheres. Porém, tratamento pré-concepcional com imunização com linfócitos, anticoagulante e prednisona é necessário.

Patriarca *et al.* (2000) postularam que o uso da IgEV parece ser eficaz no AER de origem desconhecida e de causa aloimune.

No ano 2003, Graphou *et al.* analisaram o efeito da imunoglobulina intravenosa no equilíbrio da relação Th-1/Th-2 em mulheres com AER de causa aloimune e autoimune, administrada antes da gravidez, sem usar nenhum outro tipo de tratamento concomitante. Eles estimaram a relação Th-1/Th-2 antes do tratamento e, 5 dias após, observando que esta terapia melhorou a relação Th-1/Th2, a favor da resposta Th-2 em pacientes com abortamento de causa aloimune. Nos casos de causa autoimune, nem sempre se obteve esta resposta.

Batorfi *et al.* (2005) imunizaram 32 pacientes com diagnóstico de AER de causa imunológica e, em 72% dos casos (23/32), a terapia foi bem sucedida com gravidez a termo e recém nascido saudável. Dos 9 casos mal sucedidos, 6 tiveram diagnóstico posterior de outras causas que não imunológicas para os abortamentos, portanto o sucesso em pacientes com causa aloimune atingiu 88.5% (23/26). Concluíram que esta terapia é útil nas pacientes com AER de causa aloimune, porém o sucesso depende de um bom e completo protocolo de investigação, pois terapia em casos não esclarecidos pode reduzir sua eficácia.

b- Terapia com linfócitos

Alguns investigadores sugeriram que pode agir como imunostimulador para realçar a resposta imune materna e induzir a

formação de anticorpos humorais, reguladores imunológicos relacionados com o sucesso da gravidez, tais como APCA (anticorpo citotóxico antipaterno), Ab2 (anticorpo anti-idiotípico) e MLR-Bf (anticorpo bloqueador da reação mista de linfócitos), que mascarariam os antígenos HLA (antígeno leucocitário de histocompatibilidade) fetais, impedindo que sejam reconhecidos pelas células T maternas (Ito *et al.*, 1999; Agrawal *et al.*, 2000, 2002; Pandey *et al.*, 2004). Provoca também uma supressão específica e inespecífica da célula T, diminuição do nível materno de receptores para IL-2, deslocamento para resposta imune Th2 e supressão da atividade da célula NK (Hayakawa *et al.*, 2000; Lim *et al.*, 2000; Pandey *et al.*, 2004).

Check *et al.* (1997) relataram que a imunização com linfócitos causa incremento do fator bloqueador induzido pela progesterona (PIBF), que tem importante papel protetor na manutenção da gravidez por balancear a produção de citocinas.

O anticorpo idiótípico anti-receptor de célula T foi relatado no soro da gravidez normal (Ito *et al.*, 1999). Após imunização com linfócitos paternos, as células T maternas reconhecem os antígenos HLA paternos, expandindo-se e servindo como imunoestimuladores na produção de anticorpos idiótípicos anti-receptor de célula T. A hipótese é de que este anticorpo se ligaria especificamente no receptor da célula T e suprimiria a resposta imune materna contra o embrião (Ito *et al.*, 1999; Ramhorst *et al.*, 2000).

Têm sido proposta uma associação entre citocinas e AER. O tratamento com linfócitos paternos em pacientes com AER conduz a níveis séricos de interleucina 6 (IL-6) e receptor solúvel de interleucina 6 (sIL-6R) similares aos observados numa gravidez normal, sugerindo que IL-6 e sIL-6R tenham papel importante na modulação da resposta imune materna. A IL-6 regula a síntese de anticorpos no trofoblasto, chamados de anticorpos assimétricos anti-R80K, que bloqueiam o antígeno placentário R80K e suprimem a atividade da célula NK, prevenindo a perda fetal. (Zencclusen *et al.*, 2000 - Figura 1).

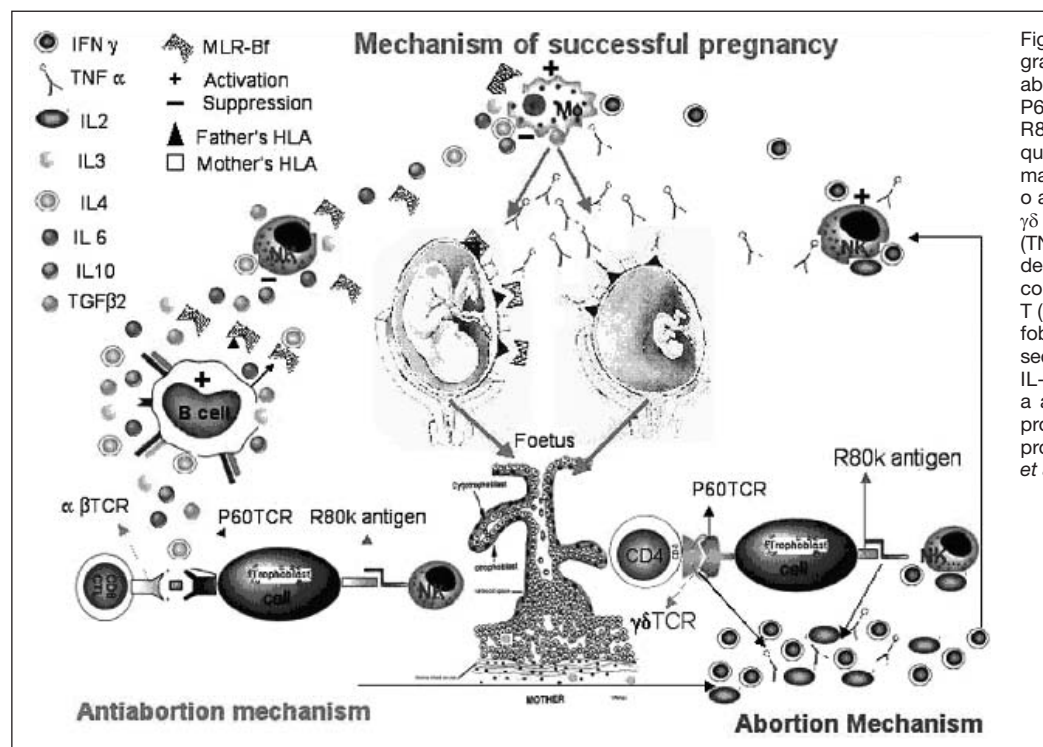


Figura 1. Mecanismos do sucesso da gravidez, mecanismos aborto e anti-aborto. O trofoblasto possui receptor P60 da célula T (P60 TCR) e antígeno R80K em sua superfície. P60TCR quando ligado com o receptor gama-delta da célula T ($\gamma\delta$ TCR) CD4, e o antígeno R80K é reconhecido pelo $\gamma\delta$ TCR da célula NK, citocinas Th-1 (TNF- α , IFN- γ , IL-2) são produzidas e destroem as células embrionárias. Do contrario, receptor alfa-beta da célula T ($\alpha\beta$ TCR) CD4+ e P60 TCR do trofoblasto, quando ligados favorecem a secreção de citocinas Th-2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) e MLR-Bf que inibem a atividade da célula NK e TNF α , produzindo macrófagos e células de proteção fetal (ZENCLUSSEN AC *et al.*, 2000)

O primeiro estudo controlado para avaliar a eficácia da terapia com linfócitos (Mowbray *et al.*, 1985), evidenciou resposta favorável nas mulheres que receberam imunização com linfócitos paternos (17/22), comparadas com aquelas que receberam seus próprios linfócitos (10/27). Posteriormente outros estudos têm sido feitos com resultados controversos.

Em 1993, Gatemby *et al.* estudaram o resultado reprodutivo nas pacientes com AER, que foram imunizadas com linfócitos paternos antes da gravidez, constatando taxa de recém nascido vivo de 68% no grupo de estudo e 47% no grupo controle (sem significância estatística). Concluíram que existe uma tendência ao benefício da imunoterapia com linfócitos paternos, mas reforçaram a necessidade de grandes estudos multicêntricos controlados.

A imunização, segundo Ramhorst *et al.* (2000), é efetiva para AER. Eles imunizaram 92 mulheres com concentrado de linfócitos e 37 não receberam a terapêutica, configurando o grupo controle, com taxa de gravidez de 58% no grupo de estudo e 46% no grupo controle.

A imunoterapia com linfócitos paternos em pacientes com AER é eficaz afirma Katano *et al.* (2000), mas a taxa de sucesso é deteriorada com o número de abortamentos precedentes.

A imunização com linfócitos paternos em mulheres que apresentam abortamento de repetição não melhora o resultado da gravidez, afirmam Christiansen (1996) e Ober *et al.* (1999). Ober *et al.* (1999) imunizaram 86 pacientes, com antecedente de no mínimo 3 abortamentos, com células mononucleares paternas, e 85 pacientes, com solução salina estéril como grupo controle, obtendo uma taxa de sucesso de 31/86 (36%) no grupo tratado e 41/85 (48%) no grupo controle. Analisando as pacientes grávidas, as taxas de sucesso foram melhores nas pacientes não imunizadas, 31/68 (46%) no grupo tratado e 41/63 (65%) no grupo controle. Concluíram, então, que a imunização com linfócitos paternos não melhora os resultados de gravidez em mulheres com AER, e, portanto não deve ser oferecida como tratamento do AER. Este estudo foi criticado por não excluir pacientes com alterações autoimunes e trombofilias. Ainda, a taxa obtida de recém nascidos vivos nos pacientes imunizados foi muito mais baixa do que a obtida em estudos similares anteriores (Christiansen *et al.*, 2004).

Pandey & Agrawal (2003) imunizaram com células mononucleares paternas 125 pacientes com AER, das quais 60 pacientes foram imunizadas antes da gravidez (grupo I) e 65 antes e durante a mesma (grupo II), tendo sido observada diferença estatística entre os dois grupos. Os resultados apresentaram 40 pacientes do grupo I que engravidaram, 28 que tiveram recém nascido normal/saudável e 12 que evoluíram com abortamento (taxa de sucesso 43%); no grupo II, 48 mulheres engravidaram, 39 tiveram recém nascido saudável e 9 abortamentos (taxa de sucesso 65%). A aloimunização realizada antes e durante a gravidez foi mais eficiente, quando comparada à imunização somente antes da mesma, não achando efeitos adversos do tratamento.

No mesmo ano 2003, Pandey *et al.* realizaram um novo estudo, imunizando 43 pacientes com AER aloimune com linfócitos paternos, obtendo taxa de sucesso de gravidez de 86%, ratificando a importância da imunoterapia com linfócitos paternos neste grupo de pacientes.

Dose e Via de administração

O efeito da imunoterapia é dose-dependente e o número de linfócitos usados é crítico para os resultados, isto é, menos de $60-150 \times 10^6$ células pode resultar em efeito sub-ótimo. Da

mesma forma, excessivos linfócitos ($>500 \times 10^6$) podem não ser benéficos (Smith *et al.*, 1992). Há sugestões de que as vias de administração intradérmica ou subcutânea sejam mais eficazes e que níveis mais baixos de proteção são obtidos pela via intramuscular.

Vários tipos de esquema têm sido utilizados:

Antes da gravidez (Gatemby *et al.*, 1993; Pandey & Agrawal, 2003), podendo ser benéfica para evitar abortamentos extremamente precoces, pois a mulher já estaria imunizada no momento da gestação. Porém, considerando a limitada duração da eficácia, estas pacientes devem recebê-la regularmente até engravidar (Pandey *et al.*, 2004).

Durante a gravidez (Aoki *et al.*, 1993), ajudando a manter a gestação, mas não evitaria abortamentos extremamente precoces.

Antes e durante a gravidez (Pandey e Agrawal 2003), obtendo resultados alentadores.

Efeitos Adversos: transmissão de doença infectocontagiosa (citomegalovírus, hepatite B, hepatite C, HIV), hipotensão, cefaléia, náuseas, trombocitopenia neonatal aloimune (Tanaka *et al.*, 2000), sangramento transvaginal (50%), retardo do crescimento intrauterino (7%).

c- Terapia com $I\alpha$, 25 diidroxi-vitamina D3 (VD3)

Bubanovic (2004) propôs VD3 como terapia imunomoduladora nas mulheres com AER, pois, sabidamente, VD3 e seus análogos são eficazes no tratamento de doenças imunes Th1 mediadas e AER é considerada uma delas. Foi utilizada uma dose de $5-10 \mu\text{g/Kg}$ de peso de VD3 com ou sem terapia imunossupressiva-anticoagulante. O mecanismo de ação ainda não é conhecido totalmente, mas parece regular a produção das citocinas Th-1 e favorecer o incremento das citocinas Th-2.

DISCUSSÃO

Esta revisão abrange a imunoterapia como tratamento do fator aloimune do AER, os estudos incluídos avaliam a imunoterapia ativa com concentrado de linfócitos, assim como a passiva com imunoglobulina endovenosa (IgEV).

Avaliar a eficácia da IgEV nos casos de abortamento imunológico é menos polêmico, já que pelos diversos efeitos que possui (vide tabela) a imunoglobulina poderia melhorar a causa alo e autoimune isolada e/ou associadas. Sem dúvida um importante limitante para seu uso é o elevado custo.

As dúvidas se concentram principalmente na eficácia da imunoterapia ativa. De uma forma constante, os estudos que avaliam no decorrer dos últimos anos têm sido na maioria falhos na metodologia. Erros e discrepâncias nos critérios que determinam o grupo de pacientes que realmente se beneficiariam desta terapêutica não resultam numa correta seleção do grupo de estudo e grupo controle.

Por vezes constatamos que pacientes com diagnóstico de fator aloimune isolado são imersos no mesmo grupo de pacientes com causa autoimune associada (Kwak *et al.*, 2000; Patriarca *et al.*, 2000; Graphou *et al.*, 2003). Em outros estudos não houve um protocolo diagnóstico completo visando identificar aquelas pacientes com causa autoimune associada, somente algumas trombofilias foram afastadas (como os de Mowbray *et al.*, 1985; Ober *et al.*, 1999; Ramhorst *et al.*, 2000). Estas pacientes deveriam ser agrupadas separadamente no momento de se instituir o tratamento complementar. Isto

aperfeiçoaria os resultados, visto que numa significativa proporção de pacientes estas duas etiologias se encontram associadas.

Dentre os critérios de inclusão, alguns estudos omitem o Crossmatch por citometria de fluxo como método diagnóstico e de monitoramento do tratamento (Ober *et al.*, 1999; Ramhorst *et al.*, 2000). A literatura desde 1995 referencia esta prática como a melhor conduta (Matzner *et al.*, 1995). Em outros estudos é usado o Crossmatch, porém, sem especificar a técnica utilizada (Mowbray *et al.*, 1985; Gatemby *et al.*, 1993)

A concentração de linfócitos utilizada, a quantidade do concentrado e a via de administração variam em cada estudo realizado, interferindo na obtenção de resultados mais simétricos e reprodutíveis.

Os estudos incluídos nesta revisão, avaliando a imunoterapia passiva, são unanimemente a favor do uso terapêutico no AER aloimune. Quanto à imunoterapia ativa, Ober *et al.* (1999) constituem o único grupo que contra-indica esta terapêutica, contra o restante de autores que em maior ou menor proporção indicam o tratamento.

Estudos multicêntricos, placebo controlados, metodologicamente corretos, continuam sendo necessários para maiores esclarecimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aldrich CI, Stephenson Md, Karrison T, Odem Rr, Branch Dw, Scott Jr, Schreiber Jr, Ober C. HLA-G genotypes and pregnancy outcome in couples with unexplained recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod* 2001; 7: 1167–72.
- Aoki K, Kajiura S, Matsumoto Y, Yagani Y. Clinical Evaluation of immunotherapy in early pregnancy with Irradiated paternal mononuclear cells for primary and recurrent aborters. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169: 649–53.
- Barini R, Couto E, Ribeiro St, Leiber Sr, Batista Sc, Pinto E Silva JI. avaliação do protocolo de investigação e tratamento de causa imunológica em mulheres com aborto recorrente. *RBGO* 1998; 20: 83–9.
- Batorfi J, Kotlan B, Padanyi A, Reti M, Gyodi E, Rajczy K, Miklos K, Nemeth J, Melicher F, Valyi-nagy I, Petranyi G, Fulop V. Intravenous immunoglobulin treatment of recurrent spontaneous abortion with immunopathological background. *Orvosi Hetilap* 2005; 146: 2297–302.
- Christiansen Ob, Nielsen Hs, Pedersen B. Active or passive immunization in unexplained recurrent miscarriage. *J Reprod Immunol*. 2004; 62: 41–52.
- Creus M, Gercel-taylor C, Shields Lb, Sanfilippo Js, Nakajima St, Taylor Dd. Alterations in humoral immune responses associated with recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2000; 73:305–13.
- De Carolis C, Vaquero E, Miriello D, Ruggiero G, Valensise H, Perricone R, Fontana L, Romanini C. Successful high dose intravenous immunoglobulins (IVIg) treatment in recurrent autoimmune or alloimmune spontaneous abortion. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 1997; 10: 125–31.
- Eblen Ac, Gercel-taylor C, Shields Lb, Sanfilippo Js, Nakajima St, Taylor Dd. Alterations in humoral immune responses associated with recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*. 2000; 73: 305–13.
- EMMER PM, NELEN WL, STEEGERS EA, HENDRIKS JC, VEERHOEK M, JOOSTEN I. Peripheral natural killer cytotoxicity and CD56(pos) CD16(pos) cells increase during early pregnancy in women with a history of recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* 2000; 15: 1163–69.
- GATEMBY PA, CAMERON K, SIMES RJ, ADELSTEIN S, BENNETT MJ, JANSEN RP, SHEARMAN RP, STEWART GJ, WHITTLE M, DORAN TJ. Treatment of recurrent spontaneous abortion by immunization with paternal lymphocytes: results of a controlled trial. *Am J Reprod Immunol*. 1993; 29: 88–94.
- GRAPHOU O, CHIOTI A, PANTAZI A, TSUKOURA C, KONTOPOULOU V, GUORGIAIDOU E, BALAFOUTAS C, KOUS-SOULAKOS S, MARGARITIS LH, VARLA-LEFTHERIOTI M. Effect of intravenous immunoglobulin treatment on the Th1/Th2 balance in women with recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol* 2003; 49: 21–9.
- HAYAKAWA S, KARASAKI-SUZUKI M, ITOH T, ISHII M, KANAEDA T, NAGAI N. TAKAHASHI-YAMAMOTO N, TOCHIGI M, CHISHIMA F, FUJI TK, OYAMA J, KITANAKA S, SATOH K. Effects of paternal lymphocyte immunization on peripheral Th-1/Th-2 balance and TCR V beta and V gamma repertoire usage of patients with recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol* 2000; 43: 107–15.
- ITO K, TANAKA T, TSUTSUMI N, OBATA F, KASHIWAGI N. Possible mechanisms of immunotherapy for maintaining pregnancy in recurrent spontaneous aborters: analysis of antiidiotypic antibodies directed against autologous T-cell receptors. *Hum Reprod* 1999; 14: 650–55.
- KING A, HIBY SE, VERMA S, BURROWS T, GARDNER L, LOKE YW. Uterine NK cells and trophoblast HLA class I molecules. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37: 459–62.
- KWAK J Y H, BEAMAN K D, GILMAN-SACHS A, RUIZ J E, SCHEWITZ D, BEER A E. Up-regulated expression of CD56+, CD56+/16+, and CD19+ cells in peripheral blood lymphocytes in pregnant women with recurrent pregnancy losses. *Am. J. Reprod. Immunol* 1995; 34: 93–9.
- Kwak JY, Kwak FM, Gilman-sachs A, Beaman KD, Cho DD, Beer AE. Immunoglobulin G infusion treatment for women with recurrent spontaneous abortions and elevated CD56+ natural killer cells. *Early Pregnancy [Electronic Resource]* 2000; 4: 154–64. Disponível em: <http://www.earlypregnancy.org/EPBM/EPBM%20IV/Vol.%20IV,%20Num%202/EPBM1288.htm>.
- LIM KJ, ODUKOYA OA, AJJAN RA, LI TC, WEETMAN AP, COOKE ID. The role of T-helper cytokines in human reproduction. *Fertil Steril* 2000; 73: 136–42.
- Matzner W, Chong P, Xu G, Ching W. A comparison of flow cytometry and microcytotoxicity for the evaluation of alloimmune therapy in patients with recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol* 1995; 33: 10–3.
- Mowbray Sf, Gibbons C, Lidell H, Reginald Pw, Underwood JI, Beard RW. Controlled trial of treatment of recurrent spontaneous abortion by immunization with paternal cells. *Lancet* i: 1985; 1: 941–43.
- Ober C, Karrison T, Odem Rr, Barnes Rb, Branch Dw, Ste-

- phenson MD, Baron B, Walker Ma, Scott Jr, Scheiber Jr. Mononuclear-cell immunization in prevention of recurrent miscarriages: a randomized trial. *Lancet* 1999; 354: 365-9.
- Pandey MK, Agrawal S. Is Allogenic Immunization Before and During Pregnancy More Effective?. The Internet Journal of Gynecology and Obstetrics. 2003. Volume 2 Number 1. Disponível em: <http://www.ispub.com/ostia/index.php?xmlFilePath=journals/ijgo/vol2n1/allogenic.xml>
- Pandey MK, Halder A, Agrawal S, Srivastava M, Agrawal SS, Agrawal Su. Immunotherapy In Recurrent Spontaneous Abortion: Randomized and Non-Randomized Trials. *The Internet Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2003; Volume 2 Number 1. Disponível em: <http://www.ispub.com/ostia/index.php?xmlFilePath=journals/ijgo/vol2n1/ras.xml>
- Pandey MK, Rani R, Agrawal S. An update in recurrent spontaneous abortion. *Archives of Gynecology & Obstetrics* 2005; 272: 95-108.
- Pandey MK, Thakur S, Agrawal S. Lymphocyte immunotherapy and its probable mechanism in the maintenance of pregnancy in women with recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet* 2004; 269: 161-72.
- Ramhorst R, Agriello E, Zittermann S, Pando M, Larriba J, Irigoyen M, Cortelezzi M, Auge L, Lombardi E, Etchepareborda JJ, Contreras OC, Fainboim L. Is the paternal mononuclear cells immunization a successful treatment for recurrent spontaneous abortion? *Am J Reprod Immunol*. 2000; 44: 129-35.
- Recurrent Miscarriage Immunotherapy Trialists Group: World-wide collaborative observational study and meta-analysis on allogenic leukocyte immunotherapy for recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 1994; 32: 55-72
- Regan L, Braude PR, Trembath PL. Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion. *British Medical Journal* 1989; 299: 541-45
- Takeshita T. Diagnosis and treatment of recurrent miscarriage associated with immunologic disorders: Is paternal lymphocyte immunization a relic of the past? Journal of Nippon Medical School 2004; 71: 308-13.
- Varla-leftherioti M. The significance of the women's repertoire of natural killer cell receptors in the maintenance of pregnancy. *Chemical Immunology & Allergy* 2005; 89: 84-95.
- Varla-leftherioti M, Spyropoulou-vlachou M, Niokou D, Keramitsoglou T, Darlamitsou A, Tsekoura C, Papadimitropoulos M, Lepage V, Balafoutas C, Stavropoulos-giokas C. Natural killer cell receptor's repertoire in couples with recurrent spontaneous abortions. *American Journal of Reproductive Immunology* 2003; 49: 183-91.
- Zenclussen AC, Kortebani G, Mazzolli A, Margni R, Malan Borel I. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor serum levels in recurrent spontaneous abortion women immunized with paternal white cells. *American Journal of Reproductive Immunology* 2000; 44: 22-9.

"Não recebo a revista."

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

Se há dúvidas, consulte o seu cadastro e fale conosco

www.sbra.com.br

SBRA, SBRH, PRONUCLEO e FEBRASGO buscam a ANVISA para iniciar revisão da RDC 33.

“The Brazilian societies that deals with Human Reproduction address ANVISA (National Health Surveillance Agency) to open the review of RDC 33.”

Ilmo. Sr. Dr. Renato Spindel

Gerente Geral
Gerência Geral de Sangue, outros Tecidos,
Células e Órgãos GGSTO
Agência Nacional de Vigilância Sanitária

A Sociedade Brasileira de Reprodução Assistida- SBRA, a Sociedade Brasileira de Reprodução Humana- SBRH, o Pronúcleo e a FEBRASGO reconhecem a iniciativa da ANVISA em regulamentar o trabalho dos centros envolvidos no processo de Reprodução Assistida. Ao mesmo tempo, agradecem a oportunidade de diálogo e de receber documento, elaborado por uma comissão de especialistas e pelos presidentes das sociedades supra citadas.

Esta linha de trabalho teve início em 1978 com o nascimento do primeiro bebê gerado fora do ambiente feminino. Desde então, grande número de pesquisadores, médicos, biólogos, farmacêuticos, enfermeiros e pessoal de apoio têm-se envolvido e estabelecido técnicas e protocolos que são aperfeiçoados constantemente, já que estamos trabalhando com sistemas que estão sempre sendo testados.

Nestes anos temos feito grandes progressos, facilmente constatados pela taxa de gestação que tínhamos no início dos anos 80, de 5 a 10%, e hoje ao redor de 40%. Organizamos-nos em sociedades em todo mundo. No Brasil, são representativas a SBRA e a SBRH, cujos sócios são todos também filiados à FEBRASGO. As principais clínicas brasileiras são filiadas à Rede Latino-americana, que congrega os centros da América Latina. A American Society of Reproductive Medicine (ASRM)

congrega os centros dos Estados Unidos, Havai e Canadá. A European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) reúne os centros da Europa e norte da África, sem falar das sociedades asiáticas e outras menores.

Nos dias atuais, as informações fluem com facilidade e todas as sociedades ou centros divulgam rotineiramente suas pesquisas e resultados. Assim como todos, nós aqui no Brasil também temos criado protocolos e normas que são, inclusive, apresentados em congressos internacionais.

Os primeiros especialistas em reprodução assistida fizeram sua formação obrigatoriamente no exterior e eram médicos, essencialmente. A figura dos embriologistas, que não existia, teve sua origem nos profissionais oriundos da biologia, da biomedicina, da farmácia ou da veterinária. Inicialmente aprenderam com a experiência dos clínicos e foram autodidatas. As sociedades brasileiras especializadas hoje buscam e estimulam a formação de profissionais clínicos e embriologistas, tendo inclusive incentivado a formação do PRONUCLEO, sociedade que abriga os profissionais de laboratório. A Rede Latino-americana, em seus projetos de acreditação e educação continuada, tem hoje um curso específico de capacitação teórica e prática para estes profissionais, clínicos ou de laboratório.

Palavras chave: referência e consulta, regulamentação governamental

Key words: *referral and consultation, government regulation*

Dessa forma, buscamos os mesmos objetivos que a ANVISA, ou seja:

- 1) Desempenhar nosso trabalho com profissionalismo e segurança para os pacientes, para os próprios profissionais que atuam e, lógico, para objetivo-fim buscado, o bebê.

Recebido em 31/05/07
Avaliado e aceito em 20/06/07

- 2) Agregar e desenvolver novas técnicas que ofereçam possibilidade de sucesso nos tratamentos.
- 3) Minimizar custos, tornando possível ao maior número de casais inférteis o aporte a este tipo de tratamento.

Cremos que a ANVISA vem se somar aos esforços que já vinham sendo buscados. Reconhecemos que a ANVISA tem buscado este diálogo antes de criar regulamentações, extremamente válido, mas algumas das regras estabelecidas na RDC 33, foco deste documento, precisam ser rediscutidas. A implementação de regras sem benefício comprovado cientificamente trará desgaste desnecessário ao nosso relacionamento e à prática profissional.

Os aspectos que achamos necessário serem rediscutidos primordialmente dizem respeito ao:

Fluxo laminar para micromanipulador

Há necessidade de evidência científica para implementar alterações que tragam segurança, benefício e, se possível, reduza custos para nossos pacientes. Como pesquisadores, vários de nós, além de especialistas, nos baseamos em evidências, após levantamento com critério rigoroso e de aceitabilidade internacional. Tanto a ANVISA como nossas Sociedades têm em seus quadros profissionais com capacidade de criar protocolos de pesquisa e certificar a real necessidade destas implementações.

Se estabelecermos uma parceria com profissionais de ambas as instituições, poderemos sugerir trabalhos científicos para geração de conhecimento. Caso contrário, não temos dúvidas de que as clínicas farão todas as alterações já incluídas na RDC

33. Não porque tenham absoluta convicção científica de que estas medidas melhorem taxas de gestação ou beneficiem mais os pacientes, mas por exercício legal.

Atualmente, sabemos exatamente os resultados que temos no ambiente que trabalhamos, através dos registros europeu, americano e da Rede latino-americana. Nossos resultados são similares aos de outros centros do hemisfério norte e nestes referidos centros não é utilizado o fluxo laminar para micromanipulador. Estes são os pontos que gostaríamos de avaliar.

Certos de que nossos argumentos, junto aos documentos em anexo, serão avaliados por V.S^a, antecipamos nossos agradecimentos e reiteramos nossa disponibilidade para o diálogo.

Curitiba, 31 de maio de 2007

Eduardo Pandolfi Passos

Presidente da Sociedade Brasileira de Reprodução Assistida- SBRA

Dirceu Henrique Mendes Pereira

Presidente da Sociedade Brasileira de Reprodução Humana- SBRH

Alvaro Petracco

Presidente da Comissão Nacional Especializada em Fertilização in vitro- FE-BRASGO

Cláudia Petersen

Presidente do Pronúcleo

Maria do Carmo Borges de Souza

Ex-Presidente da Sociedade Brasileira de Reprodução Assistida
Vice-Presidente da Rede Latino-Americana de Reprodução Assistida

Sugestão para a Revista?

E-mail: **jornalsbra@cmb.com.br**

2007

JUNHO

5th Annual Meeting

International Society for Stem Cell Research

June 17-20

Cairns, Queensland

Australia

JULHO

23rd Annual Meeting of the ESHRE

July 1-4

Lyon, France

British International Congress of Obstetrics and Gynaecology

July 4-6

ExCeL, London

AGOSTO

XXII Congresso Brasileiro

de Reprodução Humana - SBRA

23 a 25 de Agosto de 2007

Centro de Convenções de Brasília

www.aeceventos.com.br/sbra

SETEMBRO

CURSOS

VII Jornada de Psicologia em Reprodução

Humana Assistida

28 e 29 de Setembro

Anfiteatro do Hospital Prof. Edmundo Vasconcelos.

Rua Borges Lagoa, 1.450 - São Paulo

VAGAS LIMITADAS até 29/09/2007: R\$ 60,00, no local R\$ 80,00

Informações: (11) 3887-2628 / 3887-1222 / cursos@sapientiae.org.br

Continua >

**5th World Congress on
Ovulation Induction**
September 13-15
Rome, Italy

OUTUBRO

**17th World Congress on Ultrasound
in Obstetrics and Gynecology**
October 7-11
Florence, Italy

63rd Annual Meeting of the ASRM
October 13-17
Washington, DC
USA

MENOPUR® - Menotropina altamente purificada - (75 UI de FSH + 75 UI de LH) - USO ADULTO - **FORMA FARMACÊUTICA:** Caixas com 1 ou 5 ampolas de diluente de 1 ml e 1 ou 5 frasco-ampolas com 75 UI de menotropina altamente purificada (FSH + 75 UI de LH) para injeção SC ou IM após preparo de solução. **INDICAÇÃO:** Esterilidade em mulheres com insuficiência hipo ou normogonadotrófica, para estimulação do crescimento folicular. Esterilidade em homens com hipogonadismo hipogonadotrófico, em combinação com hCG (gonadotrofina coriônica humana) para estimular a espermatogênese. **CONTRA-INDICAÇÕES:** Não deve ser utilizado em caso de hipersensibilidade às gonadotrofinas ou à lactose, e nos seguintes quadros: Em mulheres: Gravidez, mal formação de órgãos sexuais incompatíveis com uma gravidez; aumento dos ovários ou cistos que não tenham sido causados por síndrome de ovários policísticos; sangramento ginecológico com causa desconhecida; tumores do útero, ovários e mama. Em homens: Câncer de próstata ou testículos. As seguintes condições devem ser tratadas apropriadamente antes do início de aplicação de MENOPUR®: disfunções da glândula tireóide e do córtex da glândula supra-renal; aumento do nível sérico da prolactina com diferentes causas (hiperprolactinemia); tumores na glândula pituitária ou no diencéfalo (hipotálamo). **POSOLÓGIA:** Na mulher: A dosagem de MENOPUR® para a indução do crescimento folicular em mulheres normo ou hipogonadotróficas depende da reação ovariana, e deve ser verificada através de exames ultra-sonográficos dos ovários e mensuração dos níveis de estradiol. Caso a dosagem de MENOPUR® for muito alta, podem ocorrer crescimentos foliculares uni e bilaterais múltiplos. Em geral, a terapia é iniciada com uma dosagem diária correspondente a 75-150 U.I. de FSH. Se os ovários não respondem, a dosagem pode ser gradativamente aumentada até surgirem evidências de aumento da secreção de estradiol e de crescimento folicular. O tratamento com a mesma dosagem de MENOPUR® é continuado até atingir-se um nível sérico de estradiol pré-ovulatório. Se o nível aumentar muito rapidamente, a dosagem deve ser reduzida. Para induzir a ovulação, 5.000 ou 10.000 U.I. de hCG (Gonadotrofina Coriônica Humana) são injetados intramuscularmente, 1 a 2 dias após a última administração de MENOPUR®. Observação: Após a administração de uma dose muito alta de MENOPUR®, a administração subsequente de hCG pode causar uma hiperestimulação involuntária dos ovários. No homem: Inicialmente, 1.000 - 3.000 U.I. de hCG (Gonadotrofina Coriônica Humana) são administrados 3 vezes por semana. Até atingir-se um nível sérico de testosterona normal. Então, 75-150 U.I. de MENOPUR® são administrados 3 vezes por semana, por alguns meses. **PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS:** O hCG (Gonadotrofina Coriônica Humana) não deve ser administrado para induzir a ovulação em mulheres cujos ovários foram involuntariamente hiperestimulados. **INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS:** A interação com outros medicamentos é desconhecida. **REAÇÕES ADVERSAS:** As seguintes reações podem ocorrer com a aplicação de gonadotrofinas recombinantes ou menotropinas em casos de síndrome de hiperestimulação ovariana grave: ascite, hidrotórax, oligúria, hipotensão e fenômenos tromboembólicos. Ocasionalmente, o tratamento é acompanhado por náusea e vômito. Em casos isolados, reações de hipersensibilidade e febre podem ocorrer. **EFEITOS COLATERAIS:** Os tratamentos com gonadotrofinas recombinantes ou menotropinas podem levar a uma hiperestimulação ovariana. Isto, contudo, torna-se geralmente clinicamente relevante apenas após a administração de hCG (Gonadotrofina Coriônica Humana) para induzir a ovulação. Levando à formação de grandes cistos ovarianos, que tendem a romper-se podendo também causar sangramento intra-abdominal. O tratamento deve ser imediatamente descontinuado quando os primeiros sinais de hiperestimulação forem detectados ultrasonograficamente e através de dores e distensão palpável no baixo abdômen. Com a gravidez, estes efeitos colaterais podem intensificar-se e continuar por um longo período de tempo, podendo tornar-se um risco de vida. A gravidez múltipla involuntária ocorre com maior frequência durante os tratamentos de reprodução assistida. **CONDUTA NA SUPERDOSAGEM:** a) Nenhuma terapia é necessária quando uma hiperestimulação leve está presente (Nível I), acompanhada por um ligeiro aumento dos ovários (tamanho dos ovários 5 - 7 cm), secreção de esteróides excessiva, e dor abdominal. Contudo, a paciente deve ser informada, e cuidadosamente observada; b) A supervisão clínica e o tratamento sintomático, e talvez uma reposição de volume intravenoso em caso de alta concentração de hemoglobina, são necessários caso haja a ocorrência de hiperestimulação moderada (Nível II) com presença de cistos ovarianos (tamanho do ovário 8 - 10 cm), acompanhada de sintomas abdominais, náusea e vômito, c) A hospitalização é imperativa quando ocorre a hiperestimulação séria (Nível III) com presença de grandes cistos ovarianos (tamanho do ovário maior que 10 cm), acompanhada de ascite, hidrotórax, abdômen distendido, dor abdominal, dispnéia, retenção de sais, aumento da concentração de hemoglobina e da viscosidade do sangue, agregação plaquetária com risco de tromboembolismos. **CUIDADOS DE ARMAGEMEM:** Manter o medicamento até 25°C. VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA - Laboratórios Ferring Ltda - SAC 0800 772 4656