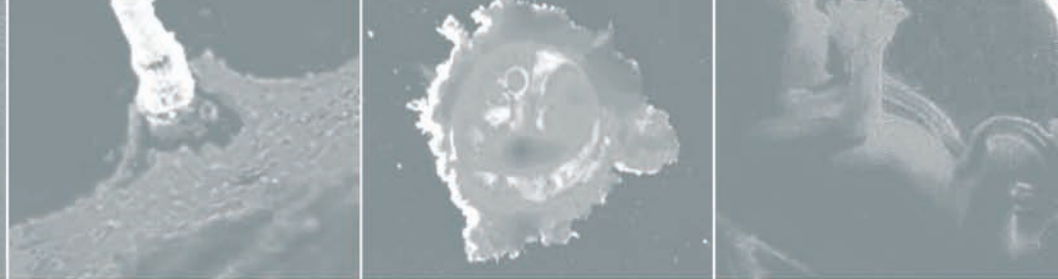


Volume 11  
Número 3  
Julho / Agosto / Setembro 2007  
ISSN 1517-5693

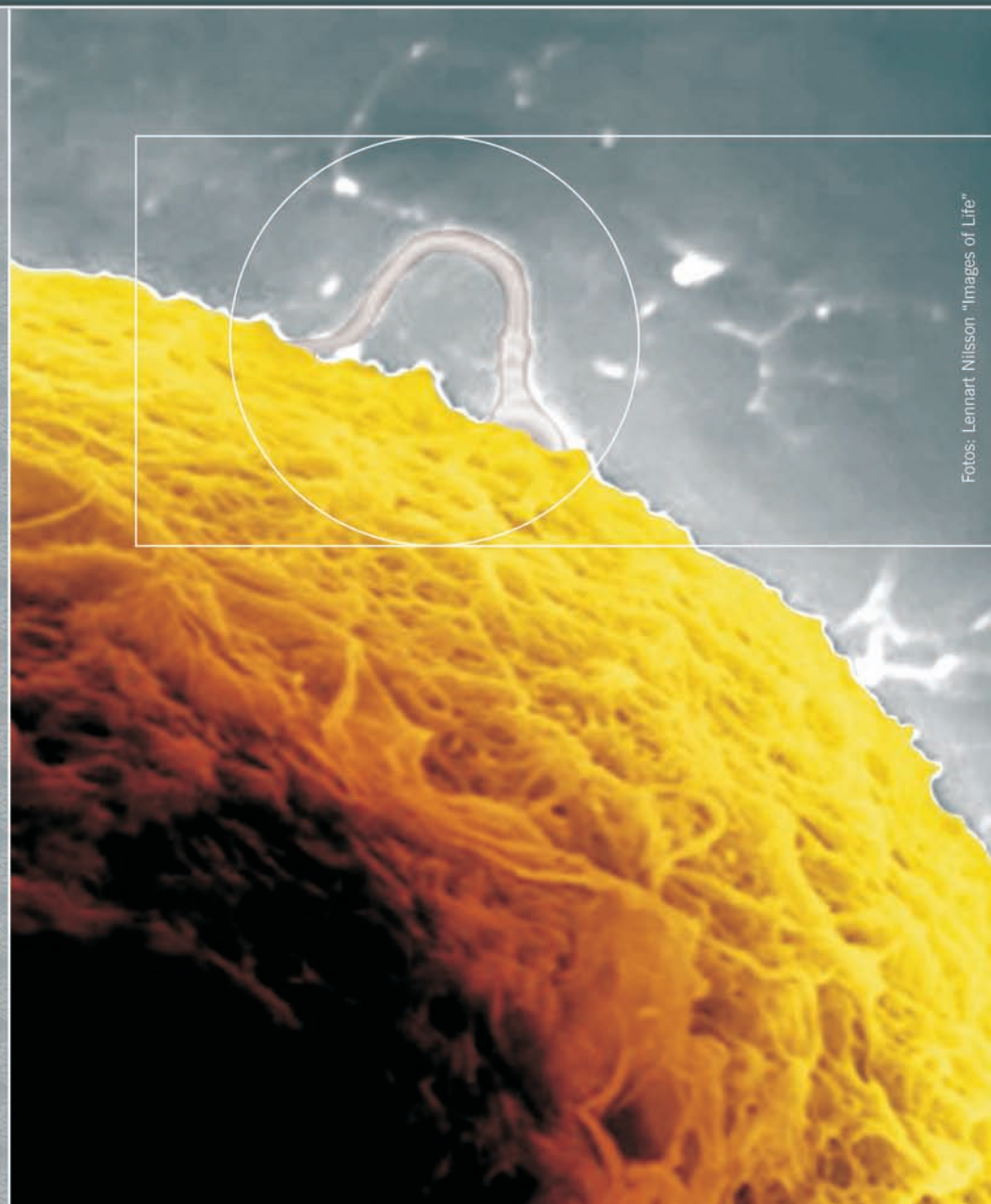


# JBRA

# JORNAL BRASILEIRO DE

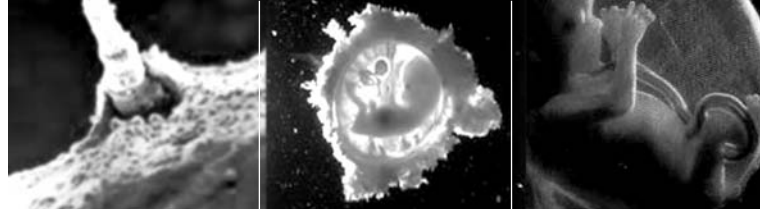
# REPRODUÇÃO

# A S S I S T I D A



Fotos: Lennart Nilsson "Images of Life"

ÓRGÃO DA  
SOCIEDADE BRASILEIRA  
DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA



# JBRA 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
Alessandro Schuffner	CONCEBER	PR
Alvaro Petracco	FERTILITAT	RS
Ana Cristina Allemand Mancebo	G&O BARRA	RJ
Aroldo Camargos	UFMG	MG
Bela Zausner	GENESE	BA
Bruno Scheffer	IBRA	MG
Carlos André Henriques	G&O BARRA	RJ
Claudia G. Petersen	CRH - Ribeirão Preto	SP
Condesmar Marcondes Filho	NÚCLEO REPRODUÇÃO	SP
Dirceu Mendes Pereira	PROFERT	SP
Eduardo Pandolfi Passos	SEGIR - UFRGS	RS
Elvio Tognotti		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](http://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](mailto: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](mailto: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](http://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](http://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](mailto:journalsbra@cmb.com.br)

## EDITORIAL

### Reprodução e Educação: temas cruzados, saberes interfuncionados

Danielle Grynszpan \_\_\_\_\_ 6

## ARTIGO ORIGINAL

### Reação Acrossômica Espontânea e Induzida por Cálcio Ionóforo em Espermatozoides Humanos: Papel do Tempo e Condições de Capacitação, Translocação da Fosfatidilserina na Membrana Plasmática e Fosforilação da Tirosina.

Alessandro Schuffner, Zhi-Yong Lin, Hakan E. Duran, Thiago Placido, Mahmood Morshedi, Daniel R. Franken and Sergio Oehninger \_ 9

### Redução dos Níveis de Dano no DNA Após Preparo do Sêmen pelo Método de Camada

AL Mauri, RLR Baruffi, CG Petersen, JBA Oliveira, L Vagnini, FC Massaro, A Pontes, JG Franco Jr \_\_\_\_\_ 14

### Doação de Embriões para Pesquisa: Interferência da Mídia na Decisão do Casal

Edson Borges Jr., Tatiana Carvalho S. Bonetti, Daniela Paes de Almeida F. Braga, Camila Madaschi, Assumpto Iaconelli Jr. 1\_ 17

## ARTIGO DE REVISÃO

### Vitrificação : Qual o Seu Lugar na Reprodução Assistida Humana?

Adriana Bos-Mikich, Nilo Frantz, Marcos Höher, Marcelo Ferreira \_\_\_\_\_ 22

### Seleção Embrionária: Qual o Melhor Método a ser Selecionado?

Adriana Bos-Mikich, Nilo Frantz, Marco Höher, Marcelo Ferreira \_\_\_\_\_ 27

### Endometrioma: Deveria ser Operado antes do Tratamento de Fertilização In Vitro (FIV)?

Juliano Augusto Brum Scheffer, Caterina Ferreti, René Frydman, Renato Fanchin \_\_\_\_\_ 27

## RELATO DE CASO

### Maturação In Vitro de Oócitos Obtidos de Pacientes com a Síndrome dos Ovários Policísticos em Ciclos sem Estimulação Ovariana Controlada: Resultados Iniciais.

Nilo Frantz, Adriana Bos-Mikich, Gerta Frantz, Marcos Höher, Marcelo Ferreira \_\_\_\_\_ 35

## ERRATA DO CONGRESSO

### CÓDIGO 12 - Preocupações Sobre Infertilidade nos Pacientes Antes de Realizarem Vasectomia na Clínica Privada

Fabio Firmbach Pasqualotto \_\_\_\_\_ 35

### CÓDIGO 15 - Sexagem Fetal a Partir de Plasma Materno

Flávia Cappello Donabela \_\_\_\_\_ 35

### CÓDIGO 17 - Limitar o Número de Oócitos Fertilizados In Vitro Pode Diminuir as Chances de Sucesso nos Casos de Fator Masculino Grave.

Sidney Verza Jr \_\_\_\_\_ 35

### CÓDIGO 22 - Avaliação do Fuso Meiótico de Oócitos Bovinos Submetidos a Pré-maturação In Vitro na Presença de Butirolactona I, um Inibidor de Retomada Prematura da Meiose.

Elisa Melo Ferreira \_\_\_\_\_ 35

### CÓDIGO 26 - A Eficácia de 2 Diferentes Protocolos de Estímulo em Ciclos com Antagonistas de GNRH em Pacientes Acima de 35 Anos.

Maria do Carmo Borges de Souza \_\_\_\_\_ 35

### CÓDIGO 27 - Influência das Células do Cumulus Expostas ao Hormônio Luteinizante (LH) Exógeno Durante a Estimulação Ovariana no Desenvolvimento de Embriões Humanos e Resultados da ICSI

Sandro Cassiano Esteves \_\_\_\_\_ 35

### CÓDIGO 28 - Estudo Comparativo por Período com Relação à Taxa de Gravidez por Aspiração Segundo a Categoria Diagnóstica e a Idade da Mulher Submetida às Técnicas de Reprodução Humana Assistida (RHA).

Marcio Augusto Buffolo \_\_\_\_\_ 35

### CÓDIGO 46 - Eficiência na Recuperação de Espermatozoides Móveis Utilizando dois Métodos de Processamento em Gradiente Descontínuo de Densidade

Vera Lucia Lângaro Amaral \_\_\_\_\_ 35

### CÓDIGO 58 - Maturação In Vitro (IVM) de Oócitos Obtidos de Pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos em Ciclos sem Estimulação Ovariana: Resultados Iniciais.

Nilo Frantz \_\_\_\_\_ 35

## CARTA AO LEITOR

Correção de Autoria de Artigos \_\_\_\_\_ 6

## EVENTOS

\_\_\_\_\_ 6

# Reprodução e Educação: Temas Cruzados, Saberes Interfecundados

## Education and Reproduction: Crossed Links

Temas ligados à reprodução envolvem múltiplos olhares. Abrangendo diversos aspectos, falar em reprodução implica no debate sobre questões ligadas ao amor e sexualidade, gravidez precoce e evasão escolar, geração de famílias nucleares e outras alternativas contemporâneas de cuidado à prole, possibilidades tecnocientíficas de contracepção ou de auxílio à concepção que, ainda, resvalam na clonagem terapêutica. A temática vem suscitando controvérsias, em diversos países e especialmente em determinados períodos, sobre a importância de se estabelecer um amplo debate sobre planejamento familiar bem como discutir sobre a liberdade reprodutiva dos cidadãos ou a pertinência de decisões judiciais sobre a criminalização de práticas usadas na interrupção da gravidez indesejada ou sobre o uso das tecnologias reprodutivas para fazer face a problemas que causam a infertilidade. Hoje o debate sobre questões ligadas à reprodução vem se imiscuindo até mesmo nas discussões sobre políticas públicas em estudos sobre redução da criminalidade – especialmente nos grandes centros urbanos – com afirmações que simplificam a solução de graves problemas ligados à violência por meio de ações como a mera distribuição de contraceptivos.

Sem deixar de conferir relevância à discussão sobre outras estratégias, Reprodução e Educação, a nosso ver, apresentam uma associação intensa porque tocam, ambas, em um ponto essencial: a perspectiva de vida, tanto no plano individual como no coletivo.

A dimensão educacional tem o sentido de valorização da idéia de responsabilidade, isto é, de invocar a possibilidade de cultivar a responsabilização individual e coletiva, em um quadro de autonomia que também implique em respeito à singularidade e aos direitos humanos. Introduzir a relevância de um trabalho educacional relacionado à Reprodução

significa enfatizar o delineamento de estratégias que levem a proporcionar a busca incessante pelo conhecimento, que consideramos base para a liberdade de escolha e tomada de decisões sábias que, por sua vez, possam contribuir para o bem-estar pessoal e a melhoria da qualidade de vida das populações.

O caráter da prática educativa em ciência e tecnologia não pode prescindir de uma preocupação ética, mas não moralizante. Buscamos, em nosso trabalho, acentuar a compreensão de que a almejada apropriação do conhecimento em tecnociência implica também em aceitá-la como um processo dinâmico no qual se dão interações psico-sócio-políticas que ocorrem em um campo impregnado de valores influenciados historicamente, especialmente no que diz respeito à reprodução humana. Dessa forma, a despeito da ampliação significativa do campo dos possíveis que decorre do desenvolvimento da tecnociência, é preciso assinalar um limite crucial: o fato dela não ser o único referencial, na medida em que existem outros saberes de valor inestimável para as diferentes populações. Justamente é esta diversidade de saberes que, inter cruzados e interfecundados, pode apontar para a construção compartilhada de uma cultura científica social e contextualizada, não esquizofrênica e não monolítica. O dever do educador é propor utopias, acreditando que elas possam se realizar apesar dos obstáculos. E, como indica Jacquard (2006), é tempo de repensar sobre as bases de nossa racionalidade para não nos deixarmos destruir pela incapacidade de reconhecer tais obstáculos.

---

Danielle Grynspan

Setor Alfabetismo Científico – LABAIIR  
Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

# Reação Acrossômica Espontânea e Induzida por Cálcio Ionóforo em Espermatozóides Humanos: Papel do Tempo e Condições de Capacitação, Translocação da Fosfatidilserina na Membrana Plasmática e Fosforilação da Tirosina.

Spontaneous and Calcium Ionophore-induced Acrosome Reaction in Human Sperm: Roles of Capacitation Time and Conditions, Plasma Membrane Translocation of Phosphatidylserine and Protein Tyrosine Phosphorylation.

**Alessandro Schuffner<sup>1,3</sup>, Zhi-Yong Lin<sup>4</sup>, Hakan E. Duran<sup>4</sup>, Thiago Placido<sup>1</sup>, Mahmood Morshedi<sup>4</sup>, Daniel R. Franken<sup>2</sup> and Sergio Oehninger<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Conceber – Centro de Medicina Reprodutiva, Curitiba, Brasil

<sup>2</sup>Reproductive Biology Unit, Department of Obstetrics and Gynecology, University of Stellenbosch, Cape Town South Africa

<sup>3</sup>To whom correspondence should be addressed at: Conceber – Centro de Medicina Reprodutiva, Av. República Argentina, 210/17º andar, 80240-210, Curitiba, Brasil - E-mail: alessandro@clinicaconceber.com.br

<sup>4</sup>The Jones Institute for Reproductive Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, Eastern Virginia Medical School

## ABSTRACT

*The objective of these studies was to assess the relationships between capacitation time and conditions, plasma membrane translocation of phosphatidylserine (PS) and protein tyrosine phosphorylation, and the spontaneous and agonist-induced acrosome reaction of human spermatozoa. Purified populations of highly motile sperm were incubated in human tubal fluid (HTF) supplemented with varying doses of human serum albumin (HSA) and examined at 0, 3, 6, 12 and 24 hours. Acrosome reaction of live sperm was detected by fluorescein isothiocyanate-labelled Pisum Sativum Agglutinin/Hoechst; annexin V binding was used to monitor PS translocation; tyrosine phosphorylation was examined by immunoblotting. The percentage of live, acrosome reacted sperm and the percentage*

*of live sperm depicting PS translocation increased significantly over time, both under spontaneous- and calcium ionophore-treated conditions. Under spontaneous conditions there was a significant positive correlation between the percentage of live, acrosome reacted sperm and the percentage of live sperm with PS translocation. Tyrosine phosphorylation increased over time and with higher doses of HSA, and was associated with increased PS externalization. Taken together, these results suggest that the spontaneous acrosome reaction of human spermatozoa incubated under conditions that support capacitation is time dependent, is positively associated with changes in plasma membrane lipid distribution resulting in externalization of PS, and is accompanied by tyrosine phosphorylation. The responses to the agonistic effect of a calcium ionophore appear to result in different membrane dynamics.*

## RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar a relação entre a reação acrossômica espontânea e induzida dos espermatozóides

Recebido em 07/05/2007  
Avaliado e aceito 26/09/2007

humanos considerando o tempo e as condições, translocação da fosfatidilserina (FS) e a fosforilação da tirosina. Amostras processadas de sêmen com alta motilidade foram incubadas com *human tubal fluid* (HTF) suplementado com variações de doses de *human serum albumine* (HSA) e examinadas com 0, 3, 6, 12 e 24 horas. A reação acrossômica em espermatozoides vivos foi detectada por *fluorescein isothiocyanate-labelled Pisum Sativum Agglutinin/Hoechst*; anexina V foi usada para monitorar a translocação da FS; a fosforilação da tirosina foi examinada por *immunoblotting*. A porcentagem de vivos e a reação acrossômica dos espermatozoides representam o aumento da translocação da FS com maior rapidez, nas duas condições, espontânea e induzida. Em condições espontâneas houve uma positiva relação entre a porcentagem de vivos, a reação acrossômica e a porcentagem de vivos com translocação da PS. O aumento da fosforilação da tirosina com altas doses de HSA, foi associado com o aumento da liberação da FS. Associados, esses resultados sugerem que a reação acrossômica espontânea de espermatozoides humanos incubados em condições que propiciem a capacitação dependente do tempo, é ligada positivamente na distribuição de lipídios na membrana plasmática resultando na liberação da FS, acompanhado pela fosforilação da tirosina. A resposta para o efeito agonista do ionóforo de cálcio aparece nos resultados em diferentes dinâmicas da membrana.

**Key words:** acrosome reaction/capacitation/phosphatidylserine translocation/tyrosine phosphorylation

**Palavras-chaves:** reação acrossômica/capacitação/translocação da fosfatidilserina/fosforilação da tirosina

## INTRODUCTION

*Human spermatozoa must undergo the process of capacitation in order to respond to the physiologic stimuli that trigger the acrosome reaction, a prerequisite for successful fertilization. Such agonists include follicular fluid, the steroid progesterone and the zona pellucida* (Tesarik, 1985; Cross et al., 1988; Thomas and Meizel, 1989; Kopf, 1990; Blackmore et al., 1990, 1991; Lee et al., 1992; Yanagimachi, 1994; Franken et al., 1996; Florman et al., 1998).

*There is also a variety of pharmacological stimuli reported to trigger the acrosome reaction, either by driving extracellular calcium into the sperm cells (such as calcium ionophores) or by acting on intracellular second messengers involved in cascade reactions that couple the calcium entry with the activation of the effectors of the exocytotic response, such as pentoxifylline and others* (Zaneveld et al., 1991; Cummins et al., 1991; Tesarik et al., 1993; Nassar et al., 1998).

*Capacitation is a priming process that programmes the spermatozoa to arrive at the site of fertilization in a timely fashion and to rapidly undergo the acrosome reaction upon making contact with specific components of the zona pellucida* (de Lamirande et al., 1997; Aitken, 1997). During capacitation, sperm undergo a variety of metabolic, functional and membrane structure modifications, eventually preparing the cell for membrane fusion and acrosomal exocytosis. In vitro studies suggest that some of these changes include alterations in sperm energy metabolism, an increase in sperm membrane calcium permeability leading to a rise in intracellular calcium levels, an efflux of cholesterol from the plasma membrane to a protein acceptor decreasing the cholesterol-phospholipid ratio, and a rise in the intracellular pH (Langlais and Roberts, 1985; Yanagimachi, 1994; Visconti et al., 1998; Cross, 1998).

*Recent studies have established an association between capacitation and phosphorylation on tyrosine residues of various proteins in human spermatozoa* (Aitken et al., 1995; Carrera et al., 1996; Leclerc et al., 1996; Luconi et al., 1996; Visconti and Kopf, 1998; Osheroff et al., 1999). The increase in tyrosine phosphorylation has been related to an increase in cAMP generation (Visconti et al., 1995) and also to changes in the redox status of the cells (Aitken et al., 1995; Aitken, 1997, 2000).

*Addition of cholesterol and an actively maintained asymmetric transmembrane phospholipid distribution characterize the membrane of mature spermatozoa during epididymal storage. In spermatozoa, as in somatic cells, the two leaflets of the plasma membrane bilayer differ in composition* (Muller et al., 1994; Nolan et al., 1995; Gadella et al., 1999). The aminophospholipids phosphatidylserine (PS) and phosphatidylethanolamine are concentrated in the inner leaflet whereas the choline phospholipids sphingomyelin and phosphatidylcholine are preferentially distributed in the outer leaflet. In somatic cells, this asymmetric distribution is maintained by the action of a variety of enzymes, including flippases, floppases and scramblases (Beyers et al., 1998). An amino phospholipid translocase (also known as flippase) transfers PS from the outer to the inner lipid leaflet. Scramblases, on the other hand, transfer the various lipid species in both directions (Gadella and Harrison, 2000).

*It has been hypothesized that during capacitation, an efflux of cholesterol, phospholipid movement and enhanced calcium permeability, lead to an increase of intracellular calcium and a depletion of ATP concentration. These effects, in turn, might cause a decrease in translocase activity preparing the plasma membrane for the fusion events that characterize the acrosome reaction* (Nolan et al., 1995). The cholesterol-poor, lipid symmetric plasma membrane has a destabilized inner leaflet that facilitates membrane fusion upon receiving appropriate stimuli. As a result, conditions become therefore favorable for sperm to undergo the acrosomal exocytosis (Nolan and Hammerstedt, 1997).

*In the present studies we aimed to further characterize the process of acrosomal exocytosis in human spermatozoa. For this purpose, we obtained purified sperm populations of high motility from fertile men (donors) and examined the spontaneous and agonist-induced acrosome reaction and their relationships with various capacitation time and conditions, plasma membrane translocation of PS and protein tyrosine phosphorylation.*

## MATERIAL AND METHODS

### Patients inclusion criteria and study design

*These studies were performed under approval of the Institutional Review Board at Eastern Virginia Medical School. Ejaculates from fertile men participating in our artificial insemination donor program were studied. Semen specimens were collected after a 2-4 day sexual abstinence period. All men were healthy, had a normal physical examination and were non-smokers. All samples had less than 1 x 10<sup>6</sup> leukocytes/mL (peroxidase staining). In order to provide sufficient number of cells for all tests, ejaculates with a concentration of motile spermatozoa ≥ 30 x 10<sup>6</sup>/mL in the original sample were included in the study.*

### Sperm preparation, motion analysis and morphology assessment

*After liquefaction for 30 minutes at 37°C, a basic semen analysis was performed. Sperm concentration and motion parameters (i.e., the percentage progressive motility, the percentage rapid cells defined as >50 µm/s, the average path*

velocity or VAP, straight [VSL] and curvilinear [VCL] velocity, and linearity) were objectively evaluated using the HTM-IVOS semen analyzer (Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA, version GS 771) with fixed parameter settings (Oehninger et al., 1990; Oehninger, 1995, 2000). Sperm concentration and motility readings were manually monitored and corrections were made as appropriate. Sperm concentration and motility normality thresholds followed the World Health Organization criteria (WHO, 1999). Sperm morphology was examined according to strict criteria after Diff-Quik staining (Kruger et al., 1986). The semen analysis was immediately followed by separation of the motile sperm fraction by density gradient separation.

The sperm fractions with high motility were isolated using discontinuous Percoll (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) gradient separation (90% and 40% layers) and Human Tubal Fluid (HTF, Irvine Scientific, Santa Anna, CA) as diluent. Up to 2 mL of semen was carefully placed on Percoll layers, centrifuged at 380xg for 20 min and the pellet of the 90% layer was mixed with HTF and then centrifuged at 380xg for 10 min. The supernatant was discarded, the pellet was resuspended in 1 mL of capacitating medium and the sperm concentration was adjusted to  $2-10 \times 10^6$ /mL depending on the experiment (see below).

### Assessment of acrosome reaction of live spermatozoa

The proportion of acrosome-reacted spermatozoa from initial suspensions of  $2 \times 10^6$ /mL motile spermatozoa was determined with the fluorescent probe fluorescein isothiocyanate-labeled Pisum Sativum Agglutinin (FITC-PSA) (Sigma) as published earlier (Cross et al., 1986; Cummins et al., 1991; Mahony et al., 1991; Tesarik et al., 1993; Oehninger et al., 1993; Nassar et al., 1998). The supravital stain Hoechst 33258 (Sigma) was used to simultaneously assess sperm viability (Cross et al., 1986). Under capacitating conditions, the percentage of spermatozoa undergoing spontaneous acrosome reaction was evaluated. To assess the agonist-induced acrosome reaction, the calcium ionophore A23187 (Sigma) was added to the sperm suspension for 60 min at a final concentration of 5  $\mu$ M from a stock solution of 10 mM ionophore in DMSO.

At least 200 sperm per sample were evaluated in a blind fashion at a magnification of  $\times 1,000$  using an epifluorescent microscope equipped with phase-contrast optics (Eclipse 600, Nikon, Melville, NY, USA), and using a digital camera with a high pressure mercury lamp power supply (SPOT RT, software version 3.2, Diagnostic Instruments, Augusta, GA). The following staining patterns were evaluated as live, acrosome reacted spermatozoa: (i) distinct staining in the equatorial region occurring as an equatorial bar; (ii) no staining observed over the entire sperm surface; and (iii) patchy staining on the acrosomal region (Cross et al., 1986, 1988; Oehninger et al., 1993; Franken et al., 1996).

### Detection of Membrane PS Translocation

We used annexin V Cy3.18 (Annexin V-Cy3; Sigma) for detection of PS externalization with simultaneous assessment of cell viability as per manufacturer's instructions. This technique was described previously (Duru et al., 2000, 2001; Schuffner et al., 2001). Briefly, in order to differentiate between live cells with and without PS translocation and necrotic cells, we used 6-carboxyfluorescein diacetate (6-CFDA) in combination with Ann V-Cy3. By microscopy, Cy3 fluoresces more brightly than the FITC conjugate. The non-fluorescent 6-CFDA enters the cell and is converted to the green fluorescent compound 6-carboxyfluorescein (6-CF). This conversion is a function of esterases present only in living cells. Thus, no fluorescence is observed in necrotic cells.

Three patterns of fluorescence are typically observed: 1. Live, normal cells that stain only with 6-CF (green, annexin V, live cells);

2. Live cells with translocation of membrane PS that stain with both 6-CF (green) and Ann V-Cy3 (red) (annexin V<sup>+</sup>, live cells); and 3. Dead cells that stain only with Ann V-Cy3 (red, necrotic).

A fifty  $\mu$ L aliquot of sperm suspension ( $10 \times 10^6$ /mL) was placed on a poly-L-lysine-coated slide and stained with the 6-CFDA/Ann V-Cy3 solution. After incubation in the dark for 10 min, the slide was covered with a 24x50 mm cover slip and immediately read blindly by two investigators at a magnification of 1,000x by epifluorescence microscopy as mentioned above (excitation filter: 450-490 nm, barrier filter: 515 nm). At least one hundred spermatozoa were counted per slide. The intra-observer and inter-observer variability for this technique in our laboratory are <7% and <5%, respectively (Duru et al., 2000, 2001).

### Electrophoresis and protein immunoblotting

Sperm proteins under different incubation conditions were prepared according to Osheroff et al., (1999). Briefly, after incubation, spermatozoa from the sperm fractions with high motility were centrifuged at 20,000 g for 2 min at room temperature and then washed with phosphate-buffered saline (PBS) at room temperature. The sperm pellet was then resuspended in sample buffer (Laemmli, 1970) without mercaptoethanol and boiled for 5 min. After centrifugation at 20,000  $\times$  g for 2 min, the supernatant was removed, 2-mercaptoethanol was added to a final concentration of 5%, the sample boiled for another 5 min, and then subjected to sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). SDS-PAGE was performed on 10% gels according to Laemmli (1970). Electrophoresis was carried out at 200 constant voltage and was continued until the tracking dye run out of the gel after loading each lane of the gel with a sperm lysate (originally containing  $1 \times 10^6$  spermatozoa).

After the samples were resolved by gels the sperm protein on the gel was electrically transferred to nitrocellulose membrane by using the Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell column (Bio-Rad, Hercules, CA). Membranes were blocked with blocking buffer (5% non-fat dry milk, 0.1% Tween-20 in PBS, pH 7.4) overnight at 4 °C with shaking. The primary antibody (a monoclonal anti-phosphotyrosine antibody, P3300 catalog number, Sigma) was diluted in the blocking buffer and incubated with the membranes for 1 hour at room temperature. The membrane was then washed with 0.4% Tween-20 in PBS for three times, each time 15 minutes. The membranes were then incubated with a secondary antibody (anti-mouse IgG) conjugated with Horse-Radish Peroxidase (Pierce, Rockford, IL) diluted in blocking buffer (1:3,000) for 1 hour at room temperature. After three time 15 min washes with PBS/0.3% Tween-20 and three time 5 min washes with PBS/0.1% Tween-20, the blot was developed using enhanced chemiluminescence detection with ECL kit (Amersham, NJ, USA) according to the manufacturer's instructions.

### EXPERIMENTAL DESIGN

**Experiment 1.** In the first experiment the purified fractions of spermatozoa high motility from 5 different donors were incubated under capacitating conditions in HTF supplemented with 0.3% HSA (Irvine) for up to 24 hours at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in water-saturated air in order to examine the time-dependency of the spontaneous and agonist-induced acrosome reaction and their relationship with PS translocation.

At 3, 6 and 24 hours, an aliquot of sperm suspension was removed and divided into two parts: (i) the first one was kept under the same capacitating conditions for 60 min and then analyzed for CASA, spontaneous acrosome reaction and annexin V binding assay results; (ii) the other one was treated with the calcium ionophore A23187 (5  $\mu$ M) for 60 min under similar capacitating conditions and then subjected to CASA, (induced-) acrosome reaction and annexin V binding assay testing.

**Experiment II.** In the second experiment, we examined the time dependency of protein tyrosine phosphorylation under different capacitating conditions. In experiment IIa, the purified motile fractions from 3 different donors were incubated for up to 24 hours at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in water-saturated air under 2 different capacitating conditions: (i) HTF supplemented with 0.3% HSA; and (ii) HTF supplemented with 3% HSA, in order to further assess the impact of two different doses of protein supplementation on tyrosine phosphorylation. At 3, 6, 9, 12 and 24 hours an aliquot of sperm suspension was removed, washed and lysed for preparation of SDS-PAGE and protein immunoblots.

In experiment IIb, we simultaneously assessed the time dependency of PS externalization and tyrosine phosphorylation using the same capacitating conditions described in experiment I. The purified motile fractions from 3 different donors were incubated in HTF supplemented with 0.3% HSA for up to 24 hours at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in water-saturated air. At 3, 6, 12 and 24 hours two aliquots of sperm suspension were removed; one was used for assessment of PS externalization by annexin V binding, and the other for protein tyrosine phosphorylation by immunoblotting.

## STATISTICAL ANALYSIS

The data were analyzed by using a linear mixed effects model for repeated measures. The analyses included examination of relationships between treatment groups (spontaneous conditions and after calcium ionophore), proportion of acrosome reacted live spermatozoa, proportion of sperm depicting PS translocation (annexin V positive, live spermatozoa or green-red cells, see above), and incubation time. Analysis of variance and Pearson's correlation coefficient were used as appropriate. Data were analyzed independently by a bio-statistician (see acknowledgement). All results are presented as mean±standard deviation. *P* values < 0.05 were considered significant.

## RESULTS

### Experiment I

Table 1 shows the changes in motion parameters and viability (mean±standard deviation) throughout the 24-hour incubation period. Motility, the percentage of rapid cells, VAP, VSL, VCL and linearity declined significantly over time (*p* < 0.001 for all). Values for calcium ionophore-treated conditions were significantly lower than for spontaneous conditions (*p* < 0.002 for all motion parameters), but the rate of decline over time was statistically the same (*p* > 0.1 for all). Viability declined significantly over time for both spontaneous and calcium ionophore conditions (*p* < 0.01) as can be observed by the increase in the percentage of dead sperm assessed by Hoechst staining.

Acrosome reaction results are shown in Figure 1. There was a time-dependent, significant increase in the percentage of live, acrosome reacted sperm throughout the 24 hour period (*p* < 0.002) for both spontaneous and calcium ionophore-treated conditions. Calcium ionophore responses were significantly higher than the spontaneous rates at any time point (*p* < 0.001).

Results of time-dependent changes of the annexin V binding assay for spontaneous (panel A) and calcium ionophore-treated conditions (panel B) are shown in Figure 2. The figure presents results of live sperm depicting PS translocation (PS translocation), live cells without PS translocation (live, normal) and dead (necrotic) cells. There was a significant increase of live spermatozoa showing PS translocation over time for both spontaneous and calcium ionophore-treated conditions (*p* < 0.001). However, there was no significant difference between spontaneous and calcium ionophore-treated results at any time point (*p* > 0.1).

Under spontaneous conditions, there was a significant positive correlation between the percentage of live, acrosome reacted sperm and the percentage of live sperm with PS translocation (*r* = 0.67, *p* < 0.005). However, such a correlation was not observed following calcium ionophore stimulation (*r* = 0.45, *p* = 0.05).

### Experiment II

Experiment IIa showed that there was a time- and HSA-dependency of protein tyrosine phosphorylation profiles of highly motile spermatozoa. A representative immunoblot (panel A: 0.3% HSA; panel B: 3% HSA) is shown in figure 3. As can be observed, a subset of phosphorylated proteins of *M<sub>r</sub>* (molecular mass ratio) ranging from 40,000 to 101,000 was observed at time 0 and throughout 24 hours of incubation. A time-dependent increase of phosphorylation was observed for most proteins, but particularly for the subset of proteins of *M<sub>r</sub>* 95-97,000, 80-83,000 and 50-55,000. In addition, 3% HSA resulted in increased protein tyrosine phosphorylation when compared to 0.3% HSA.

Experiment IIb showed similar temporal changes observed for PS externalization (over time increase in the percentage of live cells with PS translocation, *p* < 0.05) that was associated with increased protein tyrosine phosphorylation. Figure 4, panel A, depicts the results of annexin V binding assay (average results of the three studied donors), whereas panel B presents a representative immunoblot from one of the donors.

Table 1: Experiment 1: Time-dependent changes of motion parameters (CASA) and sperm viability (Hoechst staining) of human sperm incubated in HTF and 0.3% HSA under spontaneous conditions and following incubation with the calcium ionophore A23187

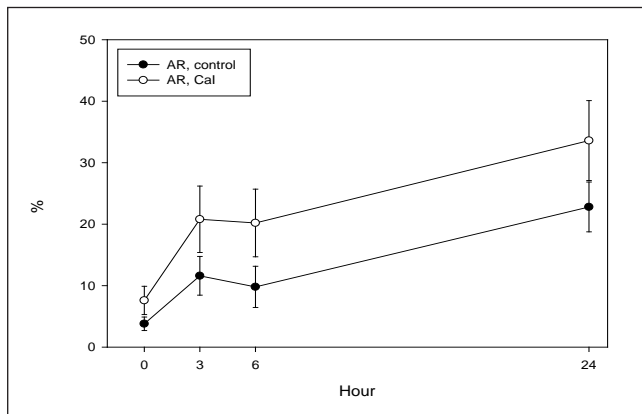
	Hour			
	0 <sup>a</sup>	3	6	24
Concentration (×10 <sup>6</sup> /ml)				
Spontaneous	20.0±0.0	19.2±0.8	18.8±1.3	16.4±3.6
Cal <sup>b</sup>	19.0±1.7	17.2±1.9	17.8±3.3	16.0±2.5
Motility (%) <sup>c</sup>				
Spontaneous	94.2±4.5	82.0±4.2	79.0±6.0	17.6±20.1
Cal	79.6±5.9	73.8±6.7	66.6±14.0	9.2±17.9
Rapid cells (%) <sup>c</sup>				
Spontaneous	91.2±2.8	76.6±3.4	73.4±7.1	12.6±16.3
Cal	76.0±6.8	62.0±7.1	56.6±17.5	6.0±11.8
VAP (μm/s) <sup>c</sup>				
Spontaneous	69.8±5.8	54.6±6.6	50.0±5.8	33.4±8.5
Cal	55.2±9.3	49.6±9.7	41.8±5.9	16.6±15.7
VSL (μm/s) <sup>c</sup>				
Spontaneous	60.0±5.1	47.0±7.2	42.4±7.1	26.0±9.0
Cal	51.8±10.2	41.8±10.4	34.6±7.2	13.0±12.0
VCL (μm/s) <sup>c</sup>				
Spontaneous	102.2±5.7	84.2±4.4	81.2±5.8	58.4±8.3
Cal	83.4±8.9	77.0±8.1	70.0±8.9	26.2±27.7
Linearity (%) <sup>c</sup>				
Spontaneous	60.2±4.0	54.4±6.1	51.6±7.4	42.8±9.3
Cal	54.0±7.6	50.6±8.3	48.6±5.2	20.0±20.4
Dead (%) <sup>d</sup>				
Spontaneous	5.0±2.7	5.0±2.1	8.0±3.5	14.0±6.1
Cal	5.0±2.7	7.4±3.2	10.8±5.8	12.6±6.5

<sup>a</sup> Time 0= following separation of the motile sperm fraction and resuspension.

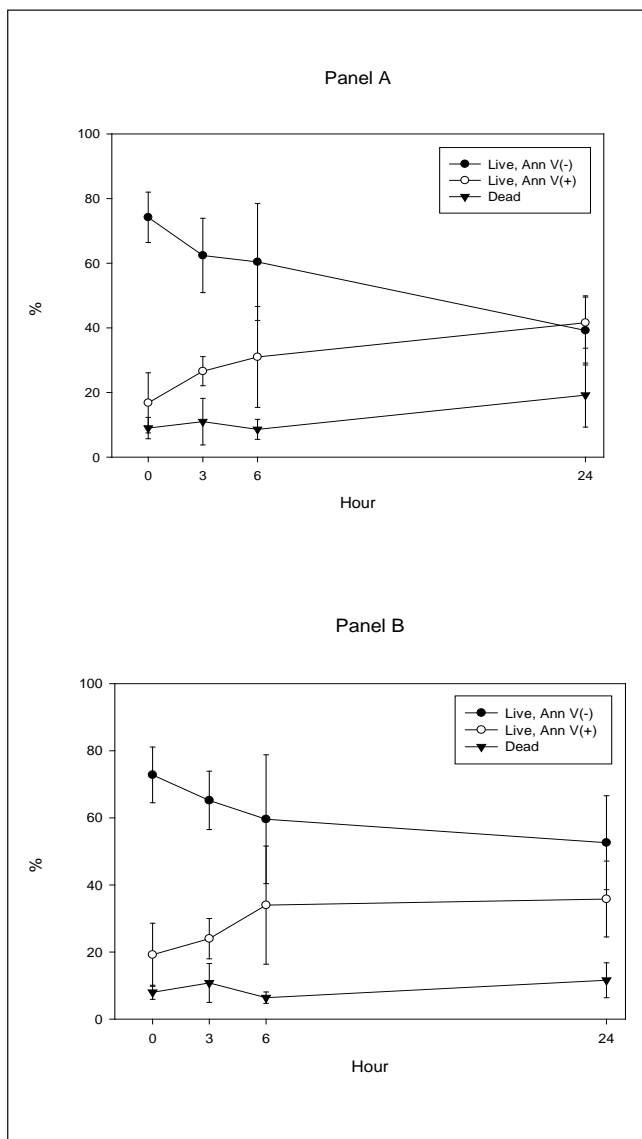
<sup>b</sup> Cal= calcium ionophore A23187.

<sup>c</sup> For spontaneous- and Cal-treated conditions all motion parameters had a significant decline over time *p* < 0.001

<sup>d</sup> For spontaneous- and Cal-treated conditions viability had a significant decline over time (*p* < 0.01)



**Figure 1.** Experiment I: Time-dependency of the spontaneous (control) and calcium ionophore-induced (Cal) acrosome reaction of human sperm incubated in HTF and 0.3% HSA (results of 5 fertile donors).



**Figure 2.** Experiment I: Time dependency of annexin V binding assay results of human sperm incubated in HTF and 0.3% HSA. Panel (A): spontaneous conditions; panel (B): calcium ionophore-treated conditions (Ca I) (results of same 5 fertile donors shown in figure 1).

## DISCUSSION

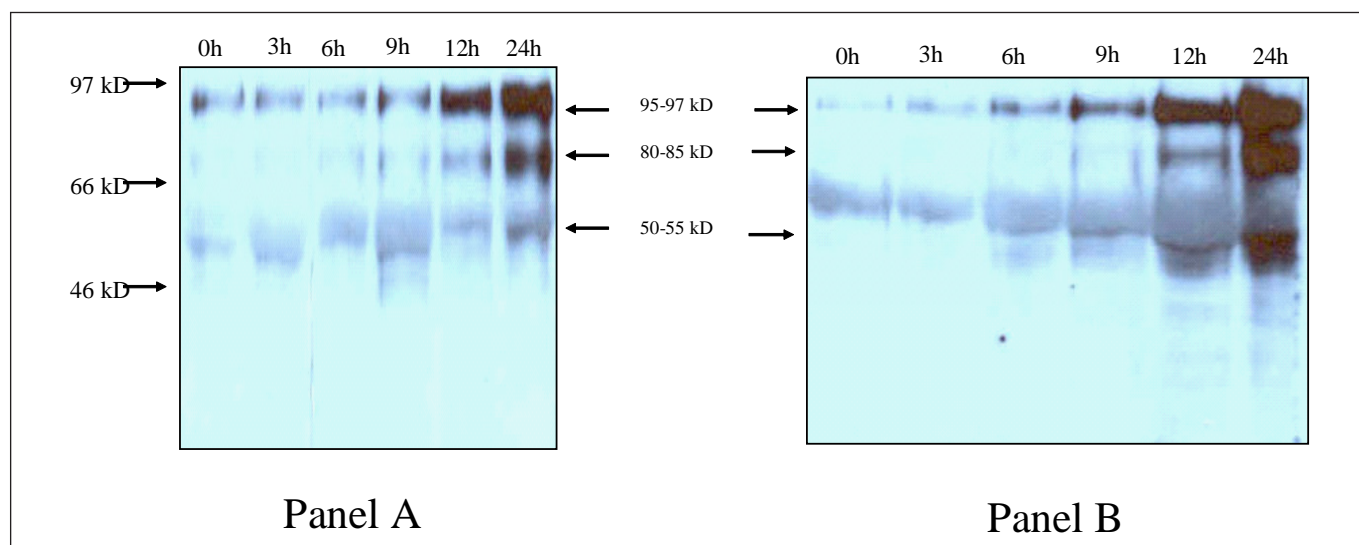
We hypothesized that the rate of spontaneous acrosome reaction of purified populations of highly motile spermatozoa from normal, fertile men is (i) time- and capacitation conditions-dependent, and (ii) associated with changes in membrane lipid symmetry. Our first experiment (experiment I) validated such hypothesis in that the non-stimulated acrosome reaction increased with time of incubation under capacitating conditions and acrosomal exocytosis was significantly and positively correlated with the degree of plasma membrane PS externalization. Furthermore, results of the second experiments (experiments IIa and IIb) confirmed that identical capacitation conditions resulted in a time-dependent enhancement of PS externalization and tyrosine phosphorylation of a subset of proteins, and furthermore, that such effect was HSA-dependent.

Capacitation conditions promote efflux of cholesterol from the sperm plasma membrane and destabilization of the phospholipid bilayer (Nolan and Hammerstedt, 1997; Gadella and Harrison, 2000). Here, capacitating conditions that lead to cholesterol efflux to a protein acceptor (i.e., HSA) were associated with increased annexin V binding indicating that live spermatozoa had increased membrane PS externalization. We speculate that such phenomena resulted in facilitation of membrane fusogenic effects and increased the rate of spontaneous acrosomal exocytosis.

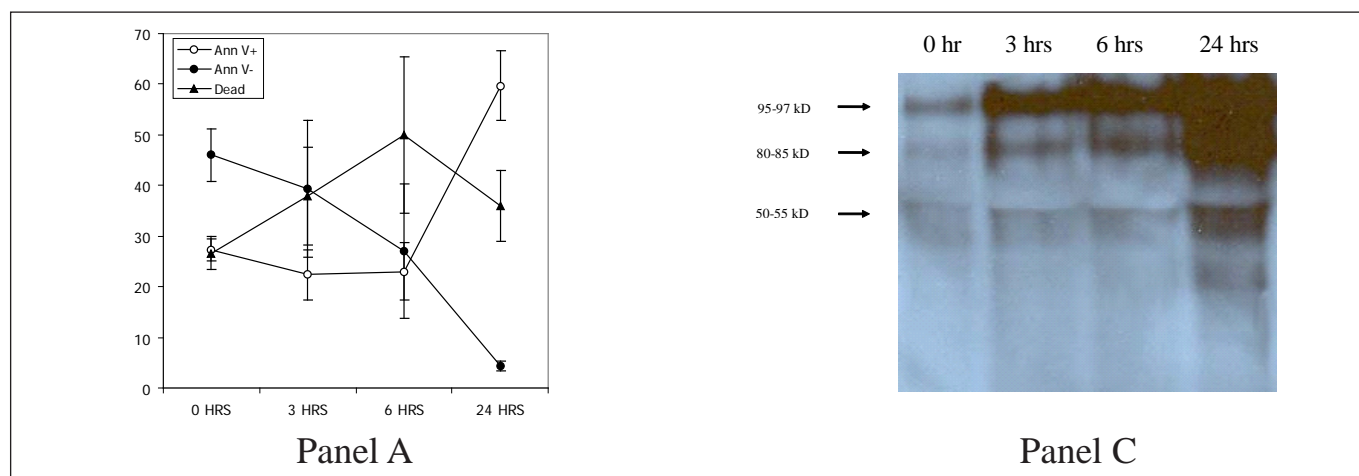
This loss of membrane phospholipid asymmetry may be due to changes in the activities of intracellular sperm flippases and/or scramblases (Gadella and Harrison, 2000). These authors have demonstrated that bicarbonate levels, a major determinant of capacitation (Boatman and Robbins, 1991; Visconti et al., 1995) alters greatly the steady-state distribution of aminophospholipids in boar sperm as examined by labeled phospholipid probes and flow cytometric analysis (Gadella and Harrison, 2000). Such methodology obviates a possible "overestimation" of outer leaflet phospholipid distribution as a consequence of the acrosome reaction resulting in exposition of previously sequestered membranes.

We and others have also demonstrated that under other "stress-induced" conditions (i.e., cryopreservation) ram and human spermatozoa also show evidence of increased PS externalization providing indirect evidence for modification of the activity of such regulatory enzymes (Muller et al., 1999; Glander and Schaller, 1999; James et al., 1999; Duru et al., 2001; Schuffner et al., 2001). The present results also extended a recent communication from our laboratory showing that prolonged incubation of human spermatozoa from fertile and infertile men at body temperature was associated with significant motility loss and membrane changes as revealed by PS translocation (Schuffner et al., 2002). Those observations as well as the results of the present studies show that although the temporal pattern of PS translocation is similar among fertile men and that there is inter-individual variability.

Our results also extended previous contributions that indicated that capacitation of human spermatozoa is associated with phosphorylation of multiple proteins at tyrosine residues (Aitken et al., 1995; Carrera et al., 1996; Leclerc et al., 1996; Emiliozzi and Fenichel, 1997; Tormes et al., 1998; Osheroff et al., 1999). Further, we have corroborated that the presence of a higher concentration of serum albumin in the culture medium results in enhanced tyrosine phosphorylation of such proteins. Osheroff et al., (1999) previously demonstrated that maximum phosphorylation of human sperm under capacitating conditions was also achieved with 3 mg/ml of bovine serum albumin and that this requirement for albumin correlated with the ability of sperm to undergo the acrosome reaction. Moreover, these authors elegantly showed that capacitation-dependent cholesterol release is associated with the activation of protein



**Figure 3.** Experiment IIa: Time course of protein tyrosine phosphorylation of human spermatozoa incubated under capacitating conditions with two different HSA doses. Panel (A): HTF and 0.3% HSA; panel (B) HTF and 3% HSA. Numbers on the left of the figure represent markers of molecular weight (results of a representative fertile donor).



**Figure 4.** Experiment IIb. Time course of simultaneously assessed (A) annexin V binding and (B) protein tyrosine phosphorylation by immunoblotting. Spermatozoa were incubated under capacitating conditions with HTF and 0.3% HSA (results of 3 fertile donors assessed for annexin V binding and a representative fertile donor for immunoblotting).

kinase A-tyrosine kinase second messenger systems resulting in protein tyrosine phosphorylation.

The ability of sperm to undergo acrosomal exocytosis in response to the agonistic effect of the calcium ionophore A23187 was also time-dependent under the capacitating conditions studied herein. However, the lack of a significant correlation with PS translocation suggests that the plasma membrane changes of the spontaneous and calcium ionophore-induced acrosome reaction may be different. These results need to be further validated by larger studies and of interest, should be compared to the effects of the physiological agonists of the acrosome reaction. Studies using either solubilized human zona pellucida and/or a biologically active recombinant human ZP3 may provide further insight into such mechanisms (Van Duin et al., 1994; Whitmarsh et al., 1996; Franken et al., 2000; Dong et al., 2001).

**Acknowledgement.** We acknowledge Paul Kolm, PhD, Biostatistician at Portsmouth Naval Hospital, Portsmouth, Virginia, USA, for providing independent statistical analysis.

## REFERENCES

1. Aitken RJ (2000) Possible redox regulation of sperm motility activation. *J Androl*, 21, 491-496.
2. Aitken RJ (1997) Molecular mechanisms regulating human sperm function. *Mol Hum Reprod*, 3, 169-173.
3. Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham DW, van Duin M (1995) Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa is involved in the control of human sperm function. *J Cell Sci*, 108, 2017-2025.
4. Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DW, Harmsma M, Zwaal RF (1998) Transmembrane phospholipid distribution in blood cells: control mechanisms and pathophysiological significance. *Biol Chem*, 379, 973-986.
5. Blackmore PF, Neulen J, Lattanzio F, Beebe SJ (1991) Cell surface receptors for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. *J Biol Chem*, 266, 18655-18659.
6. Blackmore PF, Beebe SJ, Danforth DR, Alexander N (1990) Progesterone and 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone. *J Biol Chem*, 265, 1376-1380.
7. Boatman DE, Robbins RS (1991) Bicarbonate: carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reactions. *Biol Reprod*, 44, 806-813.
8. Carrera A, Moos J, Ning XP, Gerton GL, Tesarik J, Kopf GS, Moss SB (1996) Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: Identification of A kinase

- anchor proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation. *Dev Biol*, 180, 284-296.
9. Cross NL (1998) Roles of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod*, 59, 7-11.
10. Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW (1988) Induction of the acrosome reaction by the human zona pellucida. *Biol Reprod*, 38, 235-244.
11. Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW (1986) Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Res*, 15, 213-226.
12. Cummins JM, Pember SM, Jequier AM, Yovich JL, Hartmann PE (1991) A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge. *J Androl*, 12, 98-103.
13. de Lamirande E, Leclerc P, Gagnon C (1997) Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod*, 3, 175-194.
14. Dong KW, Chi TF, Juan YW, Chen CW, Lin Z, Xiang XQ, Mahony M, Gibbons WE, Oehninger S (2001) Characterization of the biologic activities of a recombinant human zona pellucida protein 3 expressed in human ovarian teratocarcinoma (PA-1) cells. *Am J Obstet Gynecol*, 184, 835-844.
15. Duru NK, Morshedi MS, Schuffner A, Oehninger S (2001) Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation. *J Androl*, 22, 646-651.
16. Duru NK, Morshedi M, Schuffner A, Oehninger S (2001) Cryopreservation-thawing of fractionated spermatozoa and plasma membrane translocation of phosphatidylserine. *Fertil Steril*, 75, 263-268.
17. Florman HM, Arnoult C, Kazam IG, Li C, O'Toole CM (1998) A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. *Biol Reprod*, 59, 12-16.
18. Franken DR, Morales PJ, Habenicht UF (1996) Inhibition of G Protein in human sperm and its influence on acrosome reaction and zona pellucida binding. *Fertil Steril*, 66, 1009-1011.
19. Gadella BM, Harrison RA (2000) The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development*, 127 (11), 2407-2420.
20. Gadella BM, Miller NG, Colenbrander B, van Golde LM, Harrison RA (1999) Flow cytometric detection of transbilayer movement of fluorescent phospholipid analogues across the boar sperm plasma membrane: elimination of labeling artifacts. *Mol Reprod Dev*, 53, 108-125.
21. Gadella BM, Lopes-Cardozo M, van Golde LM, Colenbrander B, Gadella TW Jr (1995) Glycolipid migration from the apical to the equatorial subdomains of the sperm head plasma membrane precedes the acrosome reaction. Evidence for a primary capacitation event in boar spermatozoa. *J Cell Sci*, 108(3), 935-946.
22. Glander HJ, Schaller J (1999) Binding of annexin V to plasma membrane of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Mol Hum Reprod*, 5(2), 109-115.
23. James PS, Wolfe CA, Mackie A, Ladha S, Prentice A, Jones R (1999) Lipid dynamics in the plasma membrane of fresh and cryopreserved human spermatozoa. *Hum Reprod*, 14, 1827-1832.
24. Kopf GS (1990) Zona pellucida-mediated signal transduction in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl*, 42, 33-49.
25. Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, Smith K (1986) Sperm morphologic features as a prognostic factor in in-vitro fertilization. *Fertil Steril*, 46, 1118-1123.
26. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature USA*, 227, 680-685.
27. Langlais J, Roberts KD (1985) A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res*, 12, 183-224.
28. Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C (1996) Cyclic adenosine 3',5' monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biol Reprod*, 55, 684-692.
29. Lee MA, Check JH, Kopf GS (1992) Guanine nucleotide-binding regulatory protein in human sperm mediates acrosomal exocytosis induced by the human zona pellucida. *Mol Reprod*, 3(1), 78-86.
30. Luconi M, Krausz C, Forti G, Baldi E (1996) Extracellular calcium negatively modulates tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity during capacitation of human spermatozoa. *Biol Reprod*, 55(1), 207-216.
31. Mahony MC, Oehninger S, Clark GF, Acosta AA, Hodgen GD (1991) Fucoidin inhibits the zona pellucida-induced acrosome reaction in human spermatozoa. *Contraception*, 44(6), 657-65.
32. Muller K, Pomorski T, Muller P, Herrmann A (1999) Stability of transbilayer phospholipid asymmetry in viable ram sperm cells after cryotreatment. *J Cell Sci*, 112, 11-20.
33. Muller K, Pomorski T, Muller P, Zachowski A, Herrmann A (1994) Protein-dependent translocation of aminophospholipids an asymmetric transbilayer distribution of phospholipids in the plasma membrane of ram sperm cells. *Biochemistry*, 33(33), 9968-9974.
34. Nassar A, Mahony M, Blackmore P, Morshedi M, Ozgur K, Oehninger S (1998) Increase of intracellular calcium is not a cause of pentoxifylline-induced hyperactivated motility or scrosome reaction in human sperm. *Fertil Steril*, 69, 748-754.
35. Nolan JP, Hammerstedt RH (1997) Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm. *FASEB J*, 11(8), 670-682.
36. Nolan JP, Magargee SF, Posner RG, Hammerstedt RH (1995) Flow cytometric analysis of transmembrane phospholipid movement in bull sperm. *Biochemistry*, 34(12), 3907-3915.
37. Oehninger S (2000) Clinical and laboratory management of male infertility: An opinion on its current status. *J Androl*, 21, 814-821.
38. Oehninger, S. (1995) An update on the laboratory assessment of male fertility. *Hum Reprod*, 10, 38-45.
39. Oehninger S, Mahony MC, Swanson JR, Hodgen GD (1993) The specificity of human spermatozoa under hemizona assay conditions. *Mol Reprod Dev*, 35(1), 59-61.
40. Oehninger S, Acosta R, Morshedi M, Philput C, Swanson RJ, Acosta AA (1990) Relation between morphology and motion characteristics of human spermatozoa in semen and in the swim-up sperm fractions. *J Androl*, 11, 446-452.
41. Osheroff JE, Visconti PE, Valenzuela JP, Travis AJ, Alvarez J, Kopf GS (1999) Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. *Mol Hum Reprod*, 5(11), 1017-1026.
42. Schuffner A, Morshedi M, Oehninger S (2001) Cryopreservation of fractionated, highly motile human spermatozoa: Effect on membrane phosphatidylserine externalization and lipid peroxidation. *Hum Reprod*, 16, 2148-2153.
43. Schuffner A, Morshedi M, Vaamonde D, Duran EH, Oehninger S (2002) Effect of different incubation conditions on phosphatidylserine externalization and motion parameters of purified fractions of highly motile human spermatozoa. *J Androl*, 23, 194-201.
44. Tesarik J, Carreras A, Mendoza C (1993) Differential sensitivity of progesterone and zona pellucida-induced acrosome reactions to pertussis toxin. *Mol Reprod Dev*, 34, 183-189.
45. Tesarik J (1985) Comparison of acrosome reaction-inducing activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and ionophore A23187 in human sperm populations of proven fertilizing ability in vitro. *J Reprod Fertil*, 74, 383-388.
46. Thomas P, Meizel S (1989) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in human sperm stimulated with follicular fluid or progesterone is dependent upon Ca<sup>2+</sup> influx. *Biochem J*, 264, 539-546.
47. van Duin M, Polman JE, De Breet IT, van Ginneken K, Bunschoten H, Groenhuizen A, Brindle J, Aitken RJ (1994) Recombinant human zona pellucida protein ZP3 produced by Chinese hamster ovary cells induces the human sperm acrosome reaction and promotes sperm-egg fusion. *Biol Reprod*, 51(4), 607-617.
48. Visconti PE, Kopf GS (1998a) Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod*, 59(1), 1-6.
49. Visconti PE, Galantino-Homer H, Moore GD, Bailey JL, Ning X, Fornes M, Kopf GS (1998b) The molecular basis of sperm capacitation. *J Androl*, 19, 242-248.
50. Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS (1995) Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development*, 121, 1139-1150.
51. Whitmarsh AJ, Woolnough MJ, Moore HD, Hornby DP, Barratt CL (1996) Biological activity of recombinant human ZP3 produced in vitro: potential for a sperm function test. *Mol Hum Reprod*, 2, 911-919.
52. World Health Organization, (1999) WHO Laboratory manual for examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 2nd ed., Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, 14-17.
53. Yanagimachi R (1994) Mammalian fertilization. Knobil E, Neil JD (eds.), The physiology of reproduction, New York: Raven Press, Ltd, 189-317.
54. Zaneveld LJ, De Jonge CJ, Anderson RA, Mack SR (1991) Human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum Reprod*, 6, 1265-1274.

# Redução dos Níveis de Dano no DNA Após Preparo do Sêmen pelo Método de Camada

## Decrease of the DNA Damage Levels After Sperm Preparation by Layering Method

**AL Mauri<sup>1,2</sup>, RLR Baruffi<sup>1</sup>, CG Petersen<sup>1,2</sup>, JBA Oliveira<sup>1</sup>, L Vagnini<sup>1</sup>, FC Massaro<sup>1</sup>, A Pontes<sup>3</sup>, JG Franco Jr<sup>1,3,4</sup>**

<sup>1</sup> Centro de Reprodução Humana Prof. Franco Junior, Ribeirão Preto, SP, Brasil

<sup>2</sup> Pós-Graduando, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual de São Paulo-UNESP, Botucatu, SP, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina

de Botucatu – Universidade Estadual de São Paulo-UNESP, Botucatu, SP, Brasil

<sup>4</sup>Correspondência para:

José Gonçalves Franco Junior  
Centro de Reprodução Humana Prof. Franco Junior  
Av. Prof. João Fiusa, 689 - CEP 14025-310  
Ribeirão Preto – São Paulo – Brasil  
Tel/FAX: 55-16-3911.1100  
E-mail: crh@crh.com.br or franco@crh.com.br

### RESUMO

O objetivo deste estudo prospectivo foi determinar os níveis de fragmentação DNA antes e depois do preparo do sêmen pelo método de camada. Foram avaliadas amostras de sêmen de 78 pacientes submetidos à reprodução assistida. A análise da fragmentação do DNA foi realizada no esperma antes e após o preparo pelo método de camada, através do teste TUNEL (the terminal deoxyribonucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick-end labelling) utilizando o Kit *In Situ* Cell Death Detect, com *tetramethylrhodamine*-labelled dUTP. Para avaliação quantitativa, foram analisados 200 espermatozoides em áreas dos esfregaços selecionadas aleatoriamente e a porcentagem de espermatozoides TUNEL-positivos foi determinada. Se  $\geq 20\%$  da esperma selecionada eram TUNEL-positivo, o exame era considerado anormal. As porcentagens médias de fragmentação do DNA antes e após o preparo do sêmen foram  $17 \pm 8.3\%$  e  $7.8 \pm 6.5\%$  ( $p < 0.0001$ ), respectivamente. O exame foi considerado normal em 49 pacientes antes do preparo e em 73 pacientes depois do preparo ( $p < 0.0001$ ). Em conclusão, o preparo de esperma pelo método de camada para procedimentos de RA é eficaz para selecionar a esperma com uma redução significativa do dano do DNA.

**Palavras-chave:** Fragmentação do DNA, sêmen, método de camada, TUNEL, fertilização in vitro/ICSI

Recebido em 15/08/2007  
Avaliado e aceito em 24/09/2007

### ABSTRACT

*The aim of this prospective study was to determine the DNA fragmentation levels before and after sperm preparation by layering method. A total of 78 patients submitted to assisted reproduction technology (ART) for infertility treatment were evaluated. Ejaculated spermatozoa were obtained by masturbation on the day of ART procedure. The evaluation of DNA fragmentation was performed in the fresh semen and after preparation by a layering method, respectively. After washing with PBS, the sperm pellets were smears and then processed for the terminal deoxyribonucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick-end labelling (TUNEL) assay that was performed using a Cell Death Detection Kit with tetramethylrhodamine-labelled dUTP. For quantitative evaluation, 200 spermatozoa in randomly selected areas on microscope slides were evaluated and the percentage of TUNEL positive spermatozoa was determined. If  $\geq 20\%$  of selected sperm were TUNEL positive, the exam was considered abnormal. The mean percentage of DNA sperm fragmentation before sperm preparation was  $17 \pm 8.3\%$  and after  $7.8 \pm 6.5\%$  ( $p < 0.0001$ ). The exam was considered normal in 49 patients before preparation and in 73 patients after ( $p < 0.0001$ ). The sperm preparation with a layering method for the ART procedure is effective to select sperm with a significant decrease of the DNA damage.*

**Key Words:** DNA fragmentation, semen, layering method, TUNEL assay, fertilização in vitro /ICSI

## INTRODUCTION

The presence of DNA fragmented sperm in human ejaculate is well documented, especially in men with poor semen quality (Muratori et al., 2000). The higher occurrence in subfertile men has led to concerns about using assisted reproductive technology (ART) with these patients because the fertilizing ability of a DNA spermatozoon and the consequences of embryo development are not entirely known. Indeed, some ART protocols override the physiological sperm selection processes which could increase the risk that a DNA damaged sperm participates in fertilization (Muratori et al., 2003). Also some reports have indicated there is a greater risk of major birth defects in children conceived via in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) (Hansen et al., 2002).

One factor of extreme importance in ICSI is sperm integrity. Good quality sperm DNA is essential for the accurate transmission of genetic material to the next generation. Poor DNA may not necessarily prevent fertilization from occurring and genetically damaged human spermatozoa can still form normal pronuclei in oocytes after ICSI (Twigg et al., 1998).

Sperm washing is an integral part of ART but is important that the sperm processing technique is gentle yet enables recovery of a concentrated and highly functional sperm population. Many of the conventional centrifuge techniques used in cell separation are toxic to spermatozoa. Serial centrifugation of semen induces significant reactive oxygen species (ROS) release by spermatozoa and semen leukocytes, resulting in sperm dysfunction (Aitken and Clarkson, 1988; Appasamy et al., 2007).

In an attempt to prevent centrifuge damage and generation of ROS, other sperm preparation methods have been developed using density gradient media or direct swim-up (layering method) from the original sperm sample (Mortimer, 1991). The later is a recommended method for sperm preparation (World Health Organization, 1999).

Sakkas et al. (2000) related that when spermatozoa were prepared using the PureSperm technique a significant decrease in DNA damage was observed. However, the swim-up technique produced no significant reduction in DNA.

The objective of this study was to examine the effect of standard sperm processing by layering method on human DNA sperm integrity.

## MATERIAL AND METHODS

### Study participants

Semen samples (one per subject) were obtained from 78 men of an unselected group of couples attending the Center for Human Reproduction Prof. Franco Jr, for the ART program (IVF/ICSI) in 2006.

### Sample collection and preparation

Semen samples were collected in sterile containers on the day of IVF/ICSI by masturbation after a period of 2–5 days of sexual abstinence. The liquefied semen samples were divided into two aliquots for evaluation of DNA fragmentation, one for the layering method and other for direct sperm preparation.

-Layering method: Briefly, 2 ml of culture medium (modified HTF-10% Human Serum Albumin) was pipetted into a Falcon tube, then 1.0ml of neat sperm was deposited into the bottom of the tube. The tube was placed in an incubator at 37°C for 1h. After this, the supernatant was removed and divided in two aliquots: the first was used for IVF/ICSI; the other was centrifuged at 200g for 10min and the result pellet was sent for evaluation of sperm DNA fragmentation analysis.

-Direct sperm preparation: Liquefied fresh semen was centrifuged at 200g for 10 minutes at room temperature to separate spermatozoa from seminal plasma. The remaining sperm pellet was resuspended with 1ml of phosphate-buffered saline (PBS) and centrifuged at 200g for 10 minutes. The result pellet was sent to sperm DNA fragmentation analysis.

## Determination of DNA fragmentation

DNA fragmentation in spermatozoa cells was measured using the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling (TUNEL) assay which was performed using a Cell Death Detection Kit with tetramethylrhodamine-labelled dUTP (Roche, Monza, Italy). TUNEL identifies single and double stranded DNA breaks by labelling the free 3'-OH termini with modified nucleotides in an enzymatic reaction with terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT). TdT polymerises free 3'-OH DNA ends in a template-independent manner, incorporating labelled nucleotides. The remaining sperm pellets (after layering method and after direct preparation) were smeared on microscope slides, air-dried, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS at 4°C for 25min, pH 7.4 and permeated with 0.1% Triton® X-100 (VETEC Química Fina Ltd, Duque de Caxias, Brazil) in 0.1% sodium citrate at 4°C for 2min. After washing with PBS, the smears were then processed for the TUNEL assay. The TdT-labelled nucleotide mix was added to each slide and incubated in the dark in a humidified atmosphere for 2h at 37°C. After stopping the enzyme reaction, slides were rinsed twice in PBS and then counterstained with Vectashield® Mounting Medium with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole 1.5µg/ml) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). For quantitative evaluation, at least 200 spermatozoa in randomly selected areas on microscope slides were evaluated using a fluorescent microscope. The percentage of TUNEL positive spermatozoa was determined. The number of cells per field stained with DAPI was first counted; in the same field the number of cells with red fluorescence (TUNEL positive) was expressed as a percentage of DNA fragmentation of the total sample (DNA fragmentation index / DFI). Controls were included in every experiment: for the negative control TdT was omitted in the nucleotide mix. Positive controls were generated by pre-incubating the fixed and permeabilized sperm cells using DNase I 1mg/ml (New England Biolabs, Inc, Ipswich, MA, USA) for 30min at 37°C. TUNEL labelling of the positive controls varied between 89–98% of cells. If ≥20% of selected sperm were TUNEL positive (DFI≥20), the exam was considered abnormal (Benchab et al., 2003). The same technician, who was blinded to the identity of the study subjects, performed all exams.

## STATISTICAL ANALYSIS

Data are reported as means±SD and were analysed using the InStat 3.0 program for MacIntosh (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The Mann–Whitney test and Chi-square Test were used where appropriate. The level of significance was set at p<0.05

## RESULTS

Mean male age was 37.3±5.9 years (range 23–55 years). The 78 samples in the study were classified according to World Health Organization (1999) as follows: normozoospermia, 46; oligozoospermia, 1; asthenozoospermia, 12; teratozoospermia, 12; oligoteratozoospermia, 1; asthenoteratozoospermia, 5; and oligostenoteratozoospermia, 1. Thirty one men had fathered at least a child (or a pregnancy which end in miscarriage), spontaneously or after fertility treatment prior this ART procedure.

Mean DNA sperm fragmentation index percentage before sperm preparation was  $17 \pm 8.3\%$  and after  $7.8 \pm 6.5\%$  ( $p < 0.0001$ , Mann-Whitney test). Figure 1 shows DNA fragmentation index distribution before and after sperm preparation by layering method.

The exam was considered normal in 49 patients before and in 73 patients after preparation ( $p < 0.0001$ , Chi-square Test; Table 1).

Table 1 – Sperm DNA fragmentation versus normality criteria

	Sperm DNA fragmentation	
	Abnormal test (DFI $\geq 20\%$ )	Normal test (DFI $< 20\%$ )
Before sperm preparation	29	49
After sperm preparation	5	73

$p < 0.0001$  (Chi-square test)

## DISCUSSION

Traditional semen analysis is based on the estimation of sperm concentration, motility and morphology and providing these tests are performed with diligence and adherence to strict guidelines (World Health Organization, 1999), useful prognostic information can be obtained (Tomlinson et al., 1999). However, with an upsurge in the use of assisted reproduction technologies and especially ICSI, the requirements of the diagnostic semen analysis are constantly changing. As assisted reproduction techniques become more diverse, we remove many of the natural selection barriers set in place to ensure that the best spermatozoa are used for fertilization. Semen analysis therefore needs to develop to the point where we can provide patients not only with some idea of prognosis in terms of natural conception, but also whether assisted reproduction treatment will have a successful outcome both in terms of fertilization and in producing a healthy conceptus (Tomlinson et al. 2001).

Defects in sperm genomic material may take the form of condensation or nuclear defects, or sperm chromosomal aneuploidies (Perreault et al., 2003). The causes of these defects have been attributed to disease, drug use, high fever, elevated testicular temperature, air pollution, cigarette smoking, and advanced age. The molecular mechanisms of DNA damage in these diversified conditions is under intense investigation (Agarwal and Allamaneni, 2005). The most important mechanisms under consideration for sperm DNA damage are

abnormal chromatin packaging, ROS (Agarwal et al., 2003), and apoptosis (Sakkas et al., 1999). It is likely that multiple mechanisms are involved, based on the clinical diagnosis responsible for DNA damage.

Fragmentation of genomic DNA is one of the hallmarks of apoptosis—the most common form of eukaryotic cell death. Apoptosis, programmed cell death, occurs under normal physiological conditions and proceeds in two main phases. The first is a commitment phase followed by an execution phase which is characterized by a series of stereotypic changes including cell shrinkage, plasma membrane disruption, phosphatidylserine externalization, and condensation and fragmentation of chromatin (Wyllie et al., 1980). A characteristic feature of this process is activation of an endogenous endonuclease which generates numerous DNA strand breaks in chromatin (Wyllie et al., 1980; Santiso et al., 2007).

On the other hand, oxidative damage to sperm DNA does not impede pronucleus formation after microinjection in hamster eggs (Twigg et al., 1998). This observation is rather logical since it is generally assumed that the first development steps on maternal transcripts, thus the paternal expression would normally start at the 6–8 cell stage; it must be remembered that in the majority of cases embryo transfers are performed at day 2 and day 3, i.e. before the complete paternal effect can be expressed.

Benchai et al. (2003, 2007) indicate that the proportion of sperm with DNA fragmentation influences the fertilization rate for a threshold value above 10%, and an implantation rate of ICSI-derived embryos. Since no pregnancy was obtained when  $>20\%$  of selected sperm were TUNEL positive, this may have a good predictive value in cases of successive failures of implantation for apparently good quality embryos. For this reason, our cut off of normality was  $< 20\%$  of TUNEL positive.

There is now incontrovertible evidence that centrifugal pelleting of unselected human sperm populations causes irreversible damage to the spermatozoa; this can impair the fertilizing ability of the motile fraction subsequently prepared by swim-up migration. Alternative sperm preparation methods such as direct swim-up (layering method) from liquefied semen (with a subsequent centrifugal washing step) should be used to prepared spermatozoa that will assess or require sperm fertilizing ability (Mortimer 1991). For this reason we decided use the layering method, with a direct swim-up from liquefied semen, and subsequent centrifuged washing step in this study.

One of the confounding problems of relating semen parameters to overall ART outcome is that a certain population of spermatozoa is selected during the semen preparation procedure. It is likely that regardless of the initial sample, a degree of homogenization occurs after sperm preparation. Tomlinson et al. (2001) has shown that simple density gradient centrifugation can enrich the sample both with morphologically normal forms and spermatozoa with improved nuclear integrity. This “normalizing” effect of density gradient preparations may be the reason why pre-preparation sperm parameters had little prognostic value, in terms of fertilization and pregnancy using ART.

Our data demonstrated that of standard sperm processing by layering method is efficient, the mean percentage of DNA sperm fragmentation before sperm preparation was  $17 \pm 8.3\%$  and after  $7.8 \pm 6.5\%$  ( $p < 0.0001$ ) and the exam was considered normal in 49 patients before preparation and in 73 patients after ( $p < 0.0001$ ), for selecting sperm with nuclear integrity. However, now is necessary to compare which method is more efficient to select sperm with lower DNA fragmentation.

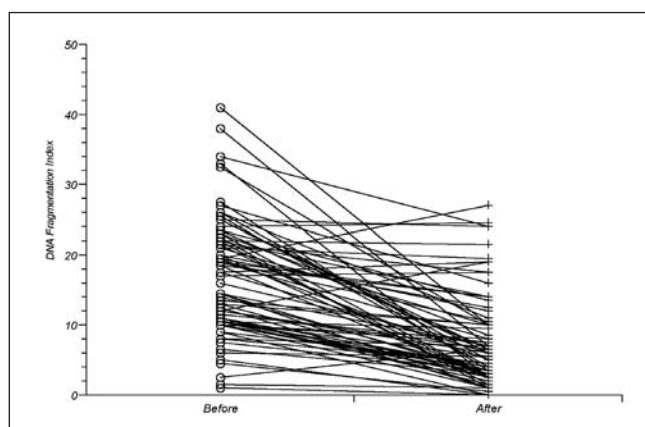


Figure 1 DNA fragmentation before and after sperm preparation by layering method

## REFERENCES

1. Agarwal A, Allamaneni SS - Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fertil Steril*, 84: 850-853, 2005.
2. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA - Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*, 79: 829-843, 2003.
3. Aitken RJ, Clarkson JS - Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl*, 9: 367-376, 1988.
4. Appasamy M, Muttukrishna S, Pizzey AR, Ozturk O, Groome NP, Serhal P, Jauniaux E. - Relationship between male reproductive hormones, sperm DNA damage and markers of oxidative stress in infertility. *Reprod Biomed Online*, 14:159-165,2007.
5. Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, Guerin JF. - Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod*, 18: 1023-1028, 2003.
6. Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C, Lejeune H, Salle B, Francois Guerin J. - Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril*, 87: 93-100, 2007.
7. Hansen M, Kurinczuk JJ, Bower C, Webb S. - The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *N Engl J Med*, 346: 725-730, 2002.
8. Mortimer D - Sperm preparation techniques and iatrogenic failures of in-vitro fertilization. *Hum Reprod*, 6: 173-176, 1991.
9. Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Pecchioli P, Moretti E, Gambera L, Baccetti B, Biagiotti R, Forti G, Maggi M. - Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl*: 21, 903-912, 2000.
10. Muratori M, Maggi M, Spinelli S, Filimberti E, Forti G, Baldi E. - Spontaneous DNA fragmentation in swim-up selected human spermatozoa during long term incubation. *J Androl*: 24, 253-262, 2003.
11. Perreault SD, Aitken RJ, Baker HW, Evenson DP, Huszar G, Irvine DS, Morris ID, Morris RA, Robbins WA, Sakkas D, Spano M, Wyrobek AJ. - Integrating new tests of sperm genetic integrity into semen analysis: breakout group discussion. *Adv Exp Med Biol*, 518: 253-268, 2003.
12. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. - Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod*, 4: 31-37, 1999.
13. Sakkas D, Manicardi GC, Tomlinson M, Mandrioli M, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. - Tomlinson M The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. *Hum Reprod*, 15: 1112-1116, 2000.
14. Santiso R, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Fernandez JL. - Evidence of modified nuclear protein matrix in human spermatozoa with fragmented deoxyribonucleic acid. *Fertil Steril*, 87: 191-194, 2007.
15. Tomlinson MJ, Kessopoulou, E, Barratt, CL - The diagnostic and prognostic value of traditional semen parameters. *J Androl*, 20: 588-593, 1999.
16. Tomlinson MJ, Moffatt, O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M, Sakkas D. - Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod*, 16: 2160-2165, 2001.
17. Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ - Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 13: 1864-1871, 1998.
18. World Health Organization (Ed) - WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.
19. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR - Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, 68: 251-260, 1980.

# Sugestão para a Revista?

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

# Doação de Embriões para Pesquisa: Interferência da Mídia na Decisão do Casal

Embryos Donation for Research: Media Impact on Infertile Couple Attitudes.

**Edson Borges Jr.** <sup>1, 2</sup>

**Tatiana Carvalho S. Bonetti** <sup>2</sup>

**Daniela Paes de Almeida F. Braga** <sup>2</sup>

**Camila Madaschi** <sup>1</sup>

**Assumpto Iaconelli Jr.** <sup>1</sup>

1 Fertility – Centro de Fertilização Assistida, São Paulo, SP

2. Associação Instituto Sapientiae – Centro de Estudos e Pesquisas, São Paulo, SP

Contato:

Edson Borges Junior

Fertility – Centro de Fertilização Assistida

Avenida Brigadeiro Luís Antonio, 4545 – Jardim Paulista

CEP 01402-001 – São Paulo – SP

Fone / Fax: (11) 3885 9858

www.fertility.com.br - E-mail: edson@fertility.com.br

## ABSTRACT

## INTRODUCTION

*The pre-embryos cryopreservation is an established procedure integrating human assisted reproduction treatment (ART). However, not all couples consent or wish the pre-embryos cryopreservation, which obligate them to get a decision about their destination. In Brazil, the “Lei de Biossegurança nº 11.105” consent the use of surplus pre-embryos, with specific characteristics, to stem-cell research. Although the guidance received in the assisted reproduction centers, the couples’s decisions are influenced by social, cultural, religion and ethical questions. The objective of this study was to evaluate the impact of media, specifically of “O Clone” soap*

*opera, which approach the human cloning and was shown in Brazil between 2001 and 2002, on couples’s decision about their surplus pre-embryos destination.*

## MATERIAL AND METHODS

*It was evaluated 1478 Informed Consents (IC), from 1205 couples, whose underwent ART between 1999 and 2004. Two study groups were established in according to the period of ART procedure, and the soap opera exhibition: group A when the treatments were realized before the entertainment exhibition, and group B after that.*

## RESULTS

*Approximately 50% of couples assented pre-embryo cryopreservation. However, among couples who disagreed the cryopreservation, 54.0% of those that underwent the ART before soap opera exhibition consented the embryo donation*

Recebido em 17/05/2007  
Avaliado e aceito em 15/09/2007

to research, while only 20.6% of that underwent ART after "The Clone", had this option ( $P < 0.001$ ). Among couples who accepted embryos cryopreservation, the same profile was observed when should getting to a decision: 37.1% and 21.4% ( $P < 0.001$ ) would donate the embryos for research after six months, and 27.5% and 22.3% ( $P = 0.080$ ) after three years of pre-embryos cryopreservation for groups A and B, respectively. The couples who underwent more than one cycle, 62% on group A, and only 20% on group B changed their attitude, firstly accepting the embryos donation for research, and from the second cycle on, no more agreed to this option.

## CONCLUSION:

Our results shown the importance of mass media in clarifying population about ethical, social and legal factors related to embryos and ART. A better approach to population understanding of ART will help Brazilian projects on embryo stem-cell research.

**Key Words:** embryo research, mass media, informed consent

## INTRODUÇÃO

O desenvolvimento tecnológico em reprodução humana assistida (RHA), proporciona altas taxas de sucesso nos tratamentos de casais inférteis, inclusive com a produção excedente de pré-embriões de boa qualidade em aproximadamente um terço dos casos (Bangsboll *et al.*, 2004). A criopreservação destes pré-embriões, é uma técnica integrante dos procedimentos de RHA, permitindo que se desenvolvam após o descongelamento, e sejam transferidos em um ciclo subsequente (Hammarberg & Tinney, 2006).

Entretanto, o fato de existirem pré-embriões excedentes, leva à obrigatoriedade dos órgãos regulatórios de cada país estipularem normas em relação ao tempo de estocagem e possíveis destinos (Brinsden *et al.*, 1995; Saunders *et al.*, 1995; Andersen *et al.*, 1996; Edwards & Beard, 1997); e ao mesmo tempo obriga os casais a uma decisão em relação a estes.

No Brasil, a resolução nº 1.358/92 do Conselho Federal de Medicina (CFM, 1992), constitui as normas éticas para a utilização das técnicas de reprodução assistida, no qual permite-se a criopreservação de pré-embriões e estabelece que os casais devem expressar sua vontade quanto ao destino dos mesmos. Recentemente, a Lei de Biossegurança nº 11.105 (Brasil, 2005) permite a utilização de pré-embriões humanos produzidos por fertilização *in vitro*, para fins de pesquisa e terapia com células-tronco embrionárias, desde que sejam inviáveis, ou congelados há mais de três anos, sempre com consentimento dos genitores. Para isso, alguns cuidados ético-legais são exigidos, tal como a assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Questões éticas em relação ao descarte ou doação de embriões excedentes ainda são muito discutidas. Não obstante de todo o conhecimento científico da equipe que trata do casal infértil, não cabe a ela a decisão sobre o destino dos gametas e pré-embriões. Neste caso, o papel da equipe se restringe à informação e auxílio na compreensão dos fatos, riscos e procedimentos, e o casal que se submete ao tratamento via reprodução assistida é soberano, apesar da grande prevalência de incerteza da decisão (Nachtigall *et al.*, 2005).

Apesar de toda a orientação nos centros de reprodução assistida, fatores sócio-culturais influenciam fortemente nas decisões dos casais, tais como a religião e a mídia. O judaísmo por exemplo, com certas restrições, permite o tratamento para infertilidade, já que tem a procriação como

primeiro mandamento, baseado no verso da Torah, "crescei e multiplicai-vos" (Schenker, 1997), assim como a maioria dos seguidores protestantes são a favor do tratamento para infertilidade (Schenker, 2005).

Por outro lado, em relação a igreja católica, predominante em nosso país, o Vaticano é muito claro em não aceitar a reprodução assistida. O argumento é que esta negligencia a vida humana e separa a procriação do ato sexual, como apontado na Encíclica *Evangelium Vitae*, onde o Pontífice declara: "Também as várias técnicas de reprodução artificial, que pareceriam estar ao serviço da vida e que, não raro, são praticadas com essa intenção, na realidade abrem a porta a novos atentados contra a vida". Elas são "moralmente inaceitáveis, porquanto separam a procriação do contexto integralmente humano do ato conjugal" (Ioannes Paulus PP.II, 1995).

Em virtude da complexidade do assunto, é obrigatório o consentimento livre e esclarecido dos pacientes que realizam tratamento de reprodução assistida, tanto para os procedimentos envolvidos no tratamento, quanto para o destino dos possíveis embriões excedentes. Os aspectos médicos envolvendo todas as circunstâncias da aplicação de uma técnica de reprodução assistida deverão estar detalhadamente expostos, assim como os resultados já obtidos na unidade de tratamento com a técnica proposta. As informações devem também atingir dados de caráter biológico, científico, jurídico, ético e econômico. O documento de consentimento informado deverá ser pautado em formulário especial e só estará completo com a concordância, por escrito, da paciente ou do casal (Oliveira & Borges Jr., 2000; Lo *et al.*, 2004; Menegon, 2004).

A veiculação de informações a respeito deste tema através de rádio, televisão, revistas e jornais é um fator que pode influenciar fortemente a decisão do casal em relação à doação ou descarte dos embriões excedentes. Um estudo sueco, demonstrou que uma discussão na mídia sobre a doação de embriões para pesquisa de células-tronco embrionárias, abordando sua importância e justificativas éticas, facilitou o entendimento do assunto pela população, e a partir de então 92% dos casais estudados concordaram em doar seus embriões para a pesquisa (Bjuresten & Hovatta, 2003).

No Brasil, entre os meses de outubro de 2001 e junho de 2002, a principal emissora de televisão do país, apresentou uma novela denominada "O clone", que suscitou vários debates sobre o polêmico assunto da clonagem de seres humanos. Em tal exibição, o cientista protagonizado na novela, criou secretamente em seu laboratório um clone humano que foi indevidamente transferido para o útero de uma paciente que realizava tratamento de reprodução assistida.

A técnica de clonagem utilizada pelo personagem, foi inspirada no procedimento que originou a ovelha *Dolly*, o primeiro clone originado de um ser vivo adulto (Wilmut *et al.*, 1997).

A exibição nacional da novela abordando o tema da clonagem humana, exibida durante nove meses, atingiu um dos maiores índices de audiência em telenovelas, com média de 47 pontos no órgão de avaliação de audiência, representando mais de 40 milhões de expectadores.

Tal audiência provocou um grande impacto na população em geral. Possivelmente criou dúvidas, e insegurança nos casais em doar seus embriões, ou até mesmo em mantê-los armazenados nos centros de reprodução humana assistida, acreditando que poderiam ser impropriamente utilizados.

Objetivamos neste estudo, avaliar o impacto da mídia, mais especificamente da novela "O Clone", exibida no Brasil entre os anos de 2001 e 2002, na decisão dos casais sobre o des-

tino dos embriões excedentes das técnicas de reprodução humana assistida. Os dados foram obtidos pela análise dos termos de consentimentos livre e esclarecidos dos casais submetidos à técnicas de reprodução humana assistida, anteriormente e após a exibição do programa.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado retrospectivamente, no Fertility - Centro de Fertilização Assistida, São Paulo - Brasil, a partir do levantamento de prontuários de casais submetidos a ciclos de fertilização assistida de alta complexidade, no período de 1999 a 2004, e subsequente análise dos Termos de Consentimento Livre e Esclarecidos (TCLE), preenchidos e assinados pelos mesmos.

Foram analisados 1478 TCLEs, provenientes de 1205 casais que realizaram um ou mais ciclos de reprodução humana assistida (RHA) de alta complexidade. Os TCLEs foram apresentados aos casais após atendimento clínico inicial, onde todas as dúvidas em relação ao tratamento, e suas possíveis consequências, haviam sido esclarecidas.

Os TCLEs expressaram-se sob a forma escrita, e eram compostos, necessariamente, de informações claras sobre todos os procedimentos a serem realizados. Os casais poderiam concordar, ou não, com os procedimentos de RHA, incluindo o congelamento de possíveis embriões excedentes, assim como o destino dos mesmos após seis meses e três anos de criopreservação.

Os períodos estipulados para a tomada de decisão em relação aos embriões criopreservados, seis meses e três anos, se devem ao fato dos casais que não obtiveram gestação no primeiro ciclo de tratamento, estarem aptos após seis meses, a descongelar os embriões e realizar uma nova tentativa de gestação. Por outro lado, para os casais que obtiveram a gestação no primeiro ciclo, três anos de congelamento é o tempo médio para que tentem uma segunda gestação, através do descongelamento dos embriões criopreservados.

Todos os casais preencheram e assinaram voluntariamente o TCLE antes do início de cada ciclo de RHA. Pacientes desprovidos de TCLEs datados e assinados foram impedidos de prosseguir o tratamento.

Dois grupos de estudo foram estabelecidos de acordo com o período em que o ciclo de RHA foi realizado, baseado na exibição da novela "O clone".

**Grupo A:** Foram incluídos 874 TCLEs provenientes de 721 casais que realizaram tratamento de RHA nos anos de 1999 à 2002, ou seja, antes da exibição da novela "O clone". Entre estes casais, 620 realizaram apenas um ciclo de tratamento de RHA e 101 casais (254 TCLEs) realizaram dois ou mais ciclos de RHA.

**Grupo B:** Foram incluídos 606 TCLEs fornecidos por 484 casais que foram submetidos às técnicas de RHA nos anos de 2003 e 2004, ou seja, após a exibição da novela "O clone". Dentre estes, 389 casais realizaram um único ciclo de tratamento e, 95 (217 TCLEs) casais realizaram dois ou mais ciclos de RHA.

Neste estudo, levaram-se em consideração as respostas dos casais em relação ao destino dos embriões excedentes das técnicas de RHA, contidas nos TCLEs:

1. "... Se o número de zigotos ou pré-embriões obtidos for maior do que o transferido habitualmente, (autorizamos / não autorizamos) \_\_\_\_\_ que os mesmos sejam congelados para posterior transferência ..."

2. "... Para os pré-embriões não transferidos e não congelados, autorizamos (destruição / doação a outro casal infértil / descarte após estudo) \_\_\_\_\_ dos mesmos ..."

3. "... Caso haja congelamento dos pré-embriões, não havendo interesse na manutenção do "Banco de Embriões", após o período integral de seis meses, os pré-embriões deverão ser (retirados por nós, ou qualquer dos cônjuges / destruídos / doados a outro casal infértil / descartados após estudo) \_\_\_\_\_ ..."

4. "... Neste momento, decidimos que os pré-embriões eventualmente congelados e não transferidos no prazo de três anos, tempo recomendado no documento básico para elaboração da Resolução 1.358/92 do Conselho Federal de Medicina, e máximo de permanência em nosso serviço, deverão ser (retirados por nós, ou qualquer dos cônjuges / destruídos / doados a outro casal infértil / descartados após estudo) \_\_\_\_\_ ..."

Os grupos foram comparados em relação ao padrão de respostas obtidas nas questões descritas anteriormente, e a análise estatística dos perfis foi realizada pelo teste *qui-quadrado*. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## RESULTADOS

Não houve diferença entre as idades das mulheres submetidas aos ciclos de RHA nos grupos A e B ( $34,8 \pm 5,8$  anos e  $35,0 \pm 4,9$  anos, respectivamente;  $P > 0,05$ ). Inicialmente, foi avaliada a questão referente ao destino dos embriões excedentes à fresco. Pudemos perceber que pouco mais de 50% dos TCLEs, em ambos os grupos (A: 484 - 55,4% e B: 359 - 59,2%;  $P = 0,140$ ) autorizavam o congelamento dos embriões excedentes. Por outro lado, quando questionamos sobre o destino que seria dado aos embriões que não fossem transferidos ou congelados, observamos que uma maior porcentagem de TCLEs no grupo A (54,0%), ou seja aqueles que realizaram ciclo antes da exibição da novela, doariam seus embriões para pesquisa, do que no grupo B (20,6%) ( $P < 0,001$ ), sugerindo que a possibilidade de má utilização dos embriões, exibido pela mídia, na novela "O clone", influenciou a decisão dos casais.

Os casais que autorizaram o congelamento dos embriões excedentes, foram questionados em relação ao destino dos mesmos após seis meses e três anos de criopreservação (Tabelas I e II, respectivamente). Um casal do grupo A não respondeu a estas questões e portanto, foram avaliados 483 TCLEs. No grupo B, alguns casais responderam duas opções para as questões referentes ao destino dos embriões após seis meses e três e anos de criopreservação, e portanto 370 e 364 respostas foram analisadas, respectivamente.

**Tabela I:** Perfil de respostas obtidas nos TCLEs em relação ao destino dos embriões excedentes criopreservados após seis meses ("... Caso haja congelamento dos pré-embriões, não havendo interesse na manutenção do "Banco de Embriões", após o período integral de seis meses, os pré-embriões deverão ser")

	GRUPO A (1999 - 2002)	GRUPO B (2003 - 2004)	P
Nº respostas avaliadas	483	370	
"retirados por nós, ou qualquer dos cônjuges"	20,7% (100)	25,9% (96)	0,071
"destruídos"	15,9% (77)	28,6% (106)	< 0,001
"doados a outro casal infértil"	26,3% (127)	24,1% (89)	0,456
"descartados após estudo"	37,1% (179)	21,4% (79)	<0,001

**Tabela II:** Perfil de respostas obtidas nos TCLEs em relação ao destino dos embriões excedentes criopreservados após três anos ("... Neste momento, decidimos que os pré-embriões eventualmente congelados e não transferidos no prazo de três anos, tempo recomendado no documento básico para elaboração da Resolução 1.358/92 do Conselho Federal de Medicina, e máximo de permanência em nosso serviço, deverão ser")

	GRUPO A (1999 - 2002)	GRUPO B (2003 - 2004)	P
Nº respostas avaliadas	483	364	-----
"retirados por nós, ou qualquer dos cônjuges"	19,8% (96)	23,4% (85)	0,222
"destruídos"	15,8% (76)	32,4% (118)	< 0,001
"doados a outro casal infértil"	36,9% (178)	22,00% (80)	< 0,001
"descartados após estudo"	27,5% (133)	22,3% (81)	0,080

Pudemos perceber que, após seis meses de criopreservação, as respostas mais frequentes no grupo A foram que os embriões deveriam ser "descartados após estudo" (37,1%) ou "doados a outro casal infértil" (26,3%), totalizando 63,4% das escolhas. Por outro lado, no grupo B, apenas 21,4% e 24,1% escolheram estes destino aos embriões excedentes, representando menos da metade das respostas (45,5%;  $P < 0,001$ ).

O mesmo perfil pode ser observado quando questionados sobre o destino dos embriões após três anos de congelamento. No grupo A, a maioria dos casais optou por doar a outros casais ou para estudos, e no grupo B, preferencialmente escolheram retirar ou descartar os embriões (311/483 – 64,3% versus 161/364 – 44,2%;  $P < 0,001$ ).

Quando avaliamos especificamente a decisão dos casais em doar seus embriões para estudo, em ambos os momentos, após seis meses e três anos de criopreservação, foi observado um padrão de respostas similar àquelas referentes ao questionamento sobre o destino dos embriões a fresco. Houve uma redução na aceitação da doação dos embriões para pesquisa de 37,1% para 21,4% ( $P < 0,001$ ) após seis meses de criopreservação, e de 27,5% para 22,3% ( $P=0,080$ ) após três anos, para casais que realizaram tratamento antes, e depois da exibição da novela, respectivamente.

Um segundo ponto avaliado, foram às escolhas dos 196 casais que realizaram mais de um ciclo de tratamento de RHA (grupo A: 101 e grupo B: 95). Comparando as respostas fornecidas nos TCLEs preenchidos previamente ao primeiro ciclo de tratamento, em relação ao ciclo subsequente, encontramos que 69,4% destes casais mudaram de opinião, sendo 60/101 (59,4%) de casais no grupo A, 76/95 casais (80,0%) no grupo B ( $P = 0,002$ ).

Entre os casais que mudaram de opinião, 62% do grupo A e 20% do grupo B, aceitavam doar seus embriões para estudos no primeiro ciclo de RHA, mas passaram a não aceitar esta opção no ciclo subsequente ( $P < 0,001$ ).

## DISCUSSÃO

Recentemente, tem aumentado o interesse público em relação aos embriões criopreservados em clínicas de reprodução humana assistida. No Brasil, foi autorizada a utilização de embriões para pesquisa de células-tronco a partir do ano de 2005 (Brasil, 2005), o que provavelmente suscitou discussões sobre questões éticas e legais sobre o assunto.

Entretanto, é sabido que a decisão para dispor dos embriões excedentes é de inteira responsabilidade dos gestores, e emocionalmente muito complicada, envolvendo diversos estágios cognitivos. O conceito pessoal do casal em relação ao embrião, é o fator chave que contribuirá para a decisão

de destino dos embriões, e impõe-se que os valores morais sejam respeitados (Nachtigall *et al.*, 2005).

Para que os casais tenham consciência e autonomia, é crucial que as decisões venham acompanhadas de um suficiente grau de reflexão. Para tal, faz-se essencial os termos de consentimento livres e esclarecidos, acompanhados de explicações claras sobre o assunto, que representarão as decisões voluntárias, advindas desta reflexão, e isenta de emoção (Mahlstedt & Greenfeld, 1989).

Nossos resultados demonstram que até 2002 (grupo A) um maior número de casais concordava com a doação de embriões para pesquisa. No entanto, o perfil dos casais inférteis mudou drasticamente após a apresentação da novela "O Clone". No grupo B, em ambos os momentos (após seis meses e três anos de criopreservação), a maioria optou por retirar ou destruir os embriões, o que nos faz acreditar que a exibição da novela "O clone", causou insegurança nos casais, em doar os embriões, seja para pesquisa ou à outros casais.

Nossos resultados apóiam o estudo sueco que mostrou grande influência da mídia sobre a decisão de doação ou descarte de embriões (Bjresten & Hovatta, 2003). Entretanto, naquele estudo, a mídia sueca abordava a importância da pesquisa e suas justificativas éticas provocando um impacto positivo. No Brasil, a concretização da clonagem humana apresentada nesta novela teve um impacto negativo sobre a doação de embriões excedentes para estudo, já que abordou a utilização indevida e antiética dos mesmos.

Para os casais que repetiram ciclos de tratamento no grupo A, o segundo ciclo de tratamento pode ter acontecido durante a vigência da novela "O clone", tornando-os inseguros sobre a doação dos embriões, optando pelo descarte em um segundo momento. Já no grupo B não houve mudança de atitude, já que no primeiro ou segundo ciclos, já havia sido apresentado tal programa e portanto a opinião dos casais já estava formada, quando a maioria opta por descartar ou retirar seus embriões, ao doá-los.

Enfatizamos por fim, a importância e a influência da mídia na opinião da população, principalmente em relação a questões eticamente complicadas. A veiculação de informações e esclarecimentos éticos abordando a importância da pesquisa no Brasil, e no mundo, são necessários a fim de proporcionar o entendimento da população e possibilitar o crescimento técnico-científico brasileiro.

## RESUMO

### INTRODUÇÃO:

A criopreservação de pré-embriões excedentes faz parte dos procedimentos de reprodução humana assistida (RHA). Entretanto, nem todos os casais aceitam ou desejam a criopreservação, obrigando à uma decisão em relação ao destino dos mesmos. No Brasil, a Lei de Biossegurança nº 11.105 permite a utilização de pré-embriões humanos excedentes de técnicas fertilização *in vitro*, com determinadas características, para fins de pesquisa e terapia com células-tronco embrionárias. Mas apesar de toda a orientação nos centros de reprodução assistida, fatores sócio-culturais, como a religião e a mídia, influenciam fortemente nas decisões dos casais. Este estudo tem como objetivo avaliar o impacto da mídia, mais especificamente da novela "O Clone", exibida no Brasil entre os anos de 2001 e 2002, que abordou o tema da clonagem humana, na decisão dos casais sobre o destino dos embriões excedentes das técnicas de RHA.

## MATERIAL E MÉTODOS:

Foram analisados 1478 termos de consentimentos livres e esclarecido (TCLE), de 1205 casais, que realizaram um ou mais ciclos de RHA entre 1999 e 2004. Dois grupos de estudo foram estabelecidos de acordo com o período em que o ciclo de RHA foi realizado, e na exibição da novela "O Clone": grupo A quando o tratamento foi realizado antes da exibição do programa, e grupo B após a exibição do mesmo.

## RESULTADOS:

Aproximadamente 50% dos casais concordavam em criopreservar os pré-embriões excedentes. No entanto, para os casais que não autorizavam a criopreservação, 54,0% daqueles que realizaram tratamento antes da exibição da novela, doariam seus pré-embriões para estudos, enquanto apenas 20,6% dos que realizaram tratamento após a exibição de tal programa, teriam esta atitude. O mesmo perfil é observado entre os casais que congelaram os pré-embriões, e deveriam tomar uma decisão sobre seu destino: 37,1% e 21,4% ( $P < 0,001$ ) doariam seus embriões para estudo após seis meses, e 27,5 e 22,3% ( $P = 0,080$ ) após três anos de criopreservação, respectivamente para os grupos A e B, respectivamente. Para os casais que realizaram mais de um ciclo de tratamento, 62% do grupo A, e apenas 20% do grupo B, mudaram de opinião, quando aceitavam doar seus embriões para estudo no primeiro tratamento e passaram a não aceitar no ciclo subsequente.

## CONCLUSÕES:

Nossos resultados ressaltam a importância da mídia e do esclarecimento da população em relação às questões éticas, morais e legais dos embriões e técnicas de reprodução humana assistida. Tais esclarecimentos se fazem necessários para que haja melhor entendimento da população e possibilite o crescimento técnico-científico brasileiro, através da pesquisa de células-tronco embrionárias.

**Palavras-chave:** pesquisa com embriões, meio de comunicação de massa, consentimento informado

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andersen CY, Westergaard LG, Grinsted J, Petersen K and Andersen AN. - Debate concluded. Frozen pre-embryos in Denmark. Hum Reprod, 11: 703-5, 1996.
2. Bangsbo S, Pinborg A, Yding Andersen C and Nyboe Andersen A. - Patients' attitudes towards donation of surplus cryopreserved embryos for treatment or research. Hum Reprod, 19: 2415-9, 2004.
3. Bjuresten K and Hovatta O. - Donation of embryos for stem cell research—how many couples consent? Hum Reprod, 18: 1353-5, 2003.
4. Brasil (2005). Lei de Biossegurança, CTNBio - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Lei nº 11.105, DOU de 24 de março de 2005.
5. Brinsden PR, Avery SM, Marcus SF and MacNamee MC. - Frozen embryos: decision time in the UK. Hum Reprod, 10: 3083-4, 1995.
6. CFM (1992). Normas éticas para a utilização das técnicas de reprodução assistida, Conselho Federal de Medicina. CFM nº 1.358/92.
7. Edwards RG and Beard HK. - Destruction of cryopreserved embryos. UK law dictated the destruction of 3000 cryopreserved human embryos. Hum Reprod, 12: 3-5; discussions -6, 1997.
8. Hammarberg K and Tinney L. - Deciding the fate of supernumerary frozen embryos: a survey of couples' decisions and the factors influencing their choice. Fertil Steril, 86: 86-91, 2006.
9. II IPP (1995). Evangelium vitae aos Presbíteros e Diáconos aos Religiosos e Religiosas aos Fiéis leigos e a todas as Pessoas de Boa Vontade sobre o Valor e a Inviolabilidade da Vida Humana, Vaticano.
10. Lo B, Chou V, Cedars MI, Gates E, Taylor RN, Wagner RM, et al. - Informed consent in human oocyte, embryo, and embryonic stem cell research. Fertil Steril, 82: 559-63, 2004.
11. Mahlstedt PP and Greenfield DA. - Assisted reproductive technology with donor gametes: the need for patient preparation. Fertil Steril, 52: 908-14, 1989.
12. Menegon V. - Consentindo ambiguidades: uma análise documental dos termos de consentimento informado, utilizados em clínicas de reprodução humana assistida. Cad. Saúde Pública, 20: 845-54, 2004.
13. Nachtigall RD, Becker G, Friesse C, Butler A and MacDougall K. - Parents' conceptualization of their frozen embryos complicates the disposition decision. Fertil Steril, 84: 431-4, 2005.
14. Oliveira D and Borges Jr. E. - Reprodução assistida: Até onde podemos chegar? Compreendendo a ética e a lei. São Paulo: Gaia, 2000.
15. Saunders DM, Bowman MC, Grierson A and Garner F. - Frozen embryos: too cold to touch? The dilemma ten years on. Hum Reprod, 10: 3081-2, 1995.
16. Schenker JG. - Infertility evaluation and treatment according to Jewish law. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 71: 113-21, 1997.
17. Schenker JG. - Assisted reproductive practice: religious perspectives. Reprod Biomed Online, 10: 310-9, 2005.
18. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ and Campbell KH. - Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature, 385: 810-3, 1997.

# Sugestão para a Revista?

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

# Vitrificação: Qual o Seu Lugar na Reprodução Assistida Humana?

## Vitrification: Which is its Place in Human Assited Reproduction?

**<sup>1</sup>Adriana Bos-Mikich, <sup>2</sup>Nilo Frantz, <sup>2</sup>Marcos Höher, <sup>2</sup>Marcelo Ferreira**

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS

<sup>2</sup>Centro de Pesquisa e Reprodução Humana Nilo Frantz, Porto Alegre, RS

Correspondência: Profa. Dra. Adriana Bos-Mikich  
Departamento de Ciências Morfológicas  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Av. Sarmiento Leite 500  
Porto Alegre, RS  
CEP: 90.050-170  
Telefone: 051-33083599/ 33083146/ 051-93336767  
Fax: 051-33083146  
adriana.bosmikich@gmail.com

### RESUMO

Métodos clássicos de criopreservação de material biológico permitem a formação de cristais de gelo no interior das células, os quais são, na maioria das vezes, deletérios para a sobrevivência celular. Vitrificação, na qual alta velocidade de resfriamento é combinada com elevadas concentrações de crioprotetores, não permite a formação de cristais de gelo durante o resfriamento ou aquecimento. Diversos aprimoramentos da metodologia vêm sendo testados para a vitrificação bem sucedida de embriões e oócitos humanos, mas as taxas de sobrevivência e desenvolvimento embrionário pós-aquecimento têm se mostrado bastante variáveis entre diferentes laboratórios devido, provavelmente, à falta de consistência na metodologia empregada. Por outro lado, relatos cada vez mais frequentes de resultados bem sucedidos por parte de alguns grupos fornecem fortes evidências de que a vitrificação deverá ocupar um lugar de destaque na esfera da criobiologia humana.

**Palavras chave:** vitrificação, oócitos, embriões humanos

### SUMMARY

*Classic methods of cryopreservation of biological specimens allow the formation of ice crystals inside the cells, which most of the times are deleterious for cell survival. Vitrification, where the high rate of cooling is combined with high concentrations of cryoprotectants, does not allow the formation of ice crystals during cooling or warming. Several improvements on the methodology are being tested for the successful vitrification of human embryos and oocytes, but the survival rates and embryo development post-warming have been very variable among different laboratories due, most likely, to the lack of consistency in the methodology employed. On the other hand, successful reports each time more frequent from a few groups, give strong evidences that vitrification shall occupy a prominent place in human cryobiology.*

**Key words:** vitrification, human embryos, oocytes

### INTRODUÇÃO

Desde o sucesso do nascimento do primeiro embrião murino após criopreservação (Whittingham et al., 1972) passaram-se mais de 35 anos. Neste interim, as metodologias e aplicações das técnicas de criopreservação em biologia da reprodução

Recebido em 10/08/2007  
Avaliado e aceito em 25/09/2007

sofreram grandes modificações e avanços significativos como uma prática acessória em técnicas de reprodução assistida.

O desenvolvimento da ciência da criobiologia iniciou-se com as observações de Molish sobre morte celular devido à formação de cristais de gelo, quando da exposição de tecidos vegetais a baixas temperaturas, no final no século 19 (Molisch 1897). Apesar de a primeira descrição de vitrificação datar desta mesma época, (Tammann, 1898) pesquisa detalhada sobre esta técnica de criopreservação envolvendo modelos animais, só veio a desenvolver-se a partir da metade dos anos 80 do último século (Rall & Fahy, 1985; Rall, 1987; Trounson et al., 1988).

Na atualidade, os dois métodos de criopreservação mais difundidos em biologia da reprodução são o congelamento lento e a vitrificação. O congelamento lento tem a vantagem de utilizar baixas concentrações de crioprotetores, os quais estão associados com toxicidade e choque osmótico. A vitrificação é um método rápido, que não exige o emprego de aparelhos especiais, mas faz uso de altas concentrações de crioprotetores.

Vitrificação, que literalmente significa “transformação em vidro” pode ser definida como a conversão de um sistema do estado fluido ao estado sólido, unicamente pelo aumento de viscosidade, sem qualquer alteração de fase ou cristalização da água e, portanto, em completa ausência de gelo (Luyet & Hodapp, 1938). Tal fenômeno pode ser alcançado aumentando-se a concentração do agente crioprotetor de forma a evitar a formação de gelo durante a queda de temperatura, tanto no interior das células como na fase líquida remanescente (Pegg, 2005).

Visto que concentrações relativamente elevadas de crioprotetores são necessárias para vitrificação, uma característica importante do crioprotetor a ser utilizado é que ele, em altas concentrações, não provoque dano celular devido a sua toxicidade. Para um dado tipo celular, a concentração inicial máxima que pode ser utilizada sem perda da viabilidade, depende da temperatura, da velocidade com que o crioprotetor é adicionado e removido e do tempo total de exposição. A relação com a temperatura é bastante complexa, pois que a toxicidade química diminui conforme a temperatura baixa e a toxicidade é tanto dependente do tempo quanto da dose. Por outro lado, a toxicidade osmótica aumenta pela redução da temperatura (Pegg, 2005). Cria-se então um compromisso entre acrescentar o crioprotetor a baixas temperaturas, em geral entre 4°C e 0°C, e a velocidade de penetração do crioprotetor que é mais eficiente a temperaturas mais elevadas, o que acarreta em um tempo menor de exposição do que na baixa temperatura e, portanto, teoricamente diminui o dano celular final.

Um exemplo perfeito da enorme importância das condições de tempo e temperatura sob as quais os crioprotetores são acrescentados e removidos durante a vitrificação nos é dado pelo experimento de Elford & Walter (1972). Estes autores aumentaram a concentração do crioprotetor dimetil-sulfoxido (DMSO), ao qual tecido muscular liso foi inicialmente exposto, de 20% a 37°C, até a concentração de 60%, através de uma série de etapas de incremento da concentração, ao mesmo tempo que a temperatura era gradativamente diminuída até -79°C. Processo reverso foi utilizado durante o aquecimento. Desta maneira, não ocorreu a formação de gelo a -79°C e a função contrátil das fibras musculares ficou totalmente preservada.

Outro aspecto fundamental a ser levado em consideração em qualquer técnica de criopreservação é o efeito osmótico dos crioprotetores utilizados. Particularmente durante a

vitrificação, o efeito osmótico do crioprotetor pode resultar em alterações acentuadas no volume celular, visto que sua velocidade de penetração é mais lenta que a água do meio extracelular. Tais alterações no volume das células não devem chegar ao seu limite máximo, o que resultaria em dano celular e lise. Portanto, um ponto importante antes de iniciar-se uma metodologia de vitrificação é a medição da velocidade de penetração dos solutos de vitrificação do sistema, ao mesmo tempo em que é medida a resposta do volume celular às alterações na osmolaridade que serão causadas por estes solutos.

A permeabilidade de células à água e a crioprotetores pode ser calculada por se construir uma curva de volume celular contra tempo, após alterações gradativas da concentração do crioprotetor. Este processo foi executado para estimar-se a permeabilidade de espermatozoides (Gilmore et al., 1997) e oócitos (Newton et al., 1999; Paynter et al., 2001) humanos à água e aos crioprotetores DMSO e propanodiol. Em posse destes dados, pode-se calcular a melhor velocidade para as alterações gradativas de concentração dos crioprotetores, principalmente durante a fase de remoção, mais crítica para as células, do que durante a fase de adição. Nesta etapa podem ser adicionados solutos que não penetram nas células, mas funcionam como tampões osmóticos que limitam ou regulam a entrada de água, conforme a concentração do crioprotetor vai sendo diminuída.

Nem todos os crioprotetores têm a mesma eficiência em vitrificação nem a mesma toxicidade (Fahy et al., 2004a, b) sendo que estes parâmetros variam ainda conforme o tipo celular estudado (Wusteman et al., 2002). A toxicidade das altas concentrações de crioprotetores utilizados em vitrificação pode ser consideravelmente diminuída pela adição de outros solutos que também promovem a formação do estado vítreo, por exemplo, alguns açúcares, como produtos derivados da hidrólise do amido, dextrans, polipeptídeos, polivinilpirrolidona (PVP), sulfato de condroitina e polietilenoglicóis (PEGs) (Sutton et al., 1992).

Três fatores afetam a probabilidade de ocorrer a vitrificação: a velocidade de resfriamento, a viscosidade do meio e o volume (Arav et al., 2002). Aumentando a viscosidade ou a velocidade de resfriamento, ou diminuindo o volume irão aumentar a probabilidade da vitrificação. Originalmente, vitrificação é alcançada pela simples imersão da amostra no nitrogênio líquido a -196°C fazendo com que a transferência de calor da amostra ao nitrogênio líquido leve a uma evaporação do nitrogênio líquido imediatamente ao redor da amostra formando uma camada de gás nitrogênio, a qual atua como um isolante. Esta situação teoricamente deve prejudicar a transferência de calor da amostra tornando quase que impossível atingir uma velocidade de resfriamento suficientemente rápida e uniforme para atingir a vitrificação. Um aparelho foi então desenvolvido (Vit-Master®, IMT, Israel; Arav, 2002), o qual aplica uma pressão negativa ao nitrogênio líquido baixando sua temperatura à -210°C. Com esta estratégia não há evaporação do nitrogênio líquido quando da imersão da amostra e a velocidade de resfriamento aumenta dramaticamente. A validade deste método em termos de viabilidade das amostras pós-aquecimento, ainda está em fase de investigação e aprimoramentos em diferentes laboratórios.

Por outro lado, a maioria das metodologias atuais de vitrificação em reprodução assistida humana utiliza ferramentas diminutas que acomodam o embrião ou oócito em volumes sub-microlitros. Diversas alternativas vêm sendo testadas procurando diminuir o volume da solução e aumentar a velocidade de resfriamento, como colocar a amostra diretamente sobre grades de microscopia eletrônica (Steponkus et al.,

1990), utilizar o sistema de palheta aberta (Vajta et al., 1998; Zaho et al., 2007), o *cryotip* (Hochi et al., 2001), a rede de nylon (Matsumoto et al., 2001) e, finalmente, o *cryotop* (Kuwayama et al., 2005). Cada uma destas metodologias apresentou resultados satisfatórios em termos de sobrevivência dos embriões e oócitos vitrificados, mas dúvidas quanto à praticidade dos protocolos, a repetitividade da metodologia e a segurança do material em tais sistemas abertos impedem seu emprego mais generalizado.

### Vitrificação como uma técnica acessória em medicina reprodutiva:

Até poucos anos atrás, a maioria dos tecidos ou células era criopreservado com resultados satisfatórios em termos de viabilidade pós-congelamento, a partir de algum método "clássico" de criopreservação. Tais protocolos utilizam baixas concentrações de crioprotetores, os quais permitem a formação de gelo extracelular durante o resfriamento, mas evitam a formação de gelo intracelular pelo rebaixamento lento da temperatura e aquecimento muito rápido. Quais seriam as vantagens da vitrificação sobre estes métodos tradicionais de criopreservação de forma a torná-la uma metodologia alternativa em reprodução assistida?

Alguns autores mencionam resultados bastante satisfatórios da vitrificação de embriões e espermatozoides humanos (Kuleshova & Lopata, 2002), enquanto outros salientam que as taxas de sobrevivência e viabilidade pós-aquecimento são muito variáveis (Liebermann et al., 2002). No Brasil, resultados bastante animadores foram relatados por Fioravante e colegas (2007a) em uma série de 39 ciclos de transferências de embriões obtidos pós vitrificação dos oócitos. Os autores descrevem taxas de gestação de aproximadamente 35% após a transferência em média de 2,75 embriões gerados a partir de oócitos re-aquecidos. Ainda, os mesmos autores relatam a apropriação da metodologia para a criopreservação de embriões obtidos, a partir de oócitos previamente vitrificados ou que tenham sido submetidos ao diagnóstico pré-implantacional (Fioravante et al., 2007 b,c).

Um dos motivos do aumento espantoso na popularidade da vitrificação nos últimos anos foi a divulgação e disseminação da idéia de que esta seria uma técnica mais simples de ser executada e a menor custo. Entretanto, este conceito pode ser enganador. Se por um lado evita-se a necessidade de um aparelho que proporcione uma velocidade controlada de resfriamento, por outro, as velocidades de resfriamento e aquecimento são críticas e nenhuma destas etapas está sob controle rígido do operador durante a vitrificação. Ainda, o período de tempo exato e a temperatura exata da exposição inicial às altas concentrações do crioprotetor são fundamentais para o sucesso do processo (Bos-Mikich, et al., 1995). Estes parâmetros também ficam expostos a variações involuntárias do operador e /ou do ambiente. Por estes motivos, não é de surpreender, a grande variabilidade em taxas de sobrevivência e viabilidade observada entre diferentes centros que vêm testando a técnica de vitrificação para a criopreservação, principalmente de oócitos e embriões humanos. Outro ponto que deve ser levado em consideração ao fazer-se a opção pela vitrificação como método de criopreservação em um laboratório de reprodução humana é o nível de ocupação do pessoal de laboratório e o nível de movimento do mesmo. Ao iniciar-se um processo de vitrificação o embriologista deve dedicar-se e concentrar-se na técnica até a imersão do material no nitrogênio líquido o que em media leva no máximo, dois minutos. Considerando-se que mesmo os embriologistas mais experientes realizam o processo de vitrificação de não mais do que dois embriões ao mesmo tempo, havendo um número

grande de pacientes, cada qual com um número elevado de embriões, o tempo gasto pela equipe de embriologistas será certamente superior àquele gasto no congelamento lento, onde é possível manipular grupos de embriões ao mesmo tempo e os embriões poderão ser expostos a condições subótimas durante o desenvolver do processo (Bos-Mikich, comunicação pessoal, 2007).

Há duas situações em que o uso da vitrificação deveria ser considerado (Pegg, 2005): primeiro quando a formação de gelo extracelular é claramente responsável pelo dano celular observado no material biológico e, segundo, quando os resultados de criopreservação por métodos clássicos de congelamento não têm apresentando resultados satisfatórios, como é o caso do congelamento de oócitos humanos.

### Vitrificação de oócitos humanos

Levando-se em consideração que as primeiras gestações, a partir de oócitos criopreservados ocorreram à cerca de duas décadas atrás, a eficiência das diferentes metodologias para criopreservação do gameta feminino humano permanece baixa, em termos de fertilização e bebês nascidos. Até mesmo após a introdução da ICSI, que contorna um problema comum da criopreservação de oócitos, qual seja o endurecimento da zona pelúcida, a criopreservação de oócitos deve ainda considerada um procedimento experimental e de uso clínico limitado. As técnicas de congelamento lento são potencialmente inapropriadas para a criopreservação de oócitos humanos, devido à sua alta sensibilidade ao resfriamento e à baixa condutividade (Liebermann et al., 2003a) explicadas pela baixa permeabilidade do oolema. Esta maior sensibilidade ao resfriamento pode ser compensada por técnicas de resfriamento ultra-rápidas, como a vitrificação, por eliminar a formação de cristais de gelo, tanto dentro do citoplasma como no meio externo.

Taxas de sobrevivência de até 96% foram relatadas após a vitrificação de oócitos humanos (Hunter et al., 1995; Kuleshova et al., 1999; Chen et al., 2000; Kuwayama & Kato, 2000; Yoon et al., 2000; Liebermann et al., 2003b; Lucena et al., 2006), deve-se, entretanto, levar em consideração que alguns destes estudos utilizaram uma população bastante reduzida de gametas (Chen et al., 2000; Kuwayama & Kato, 2000). Yoon e colegas (2000) descreveram índices bastante encorajadores de gestação e implantação de 21.4% e 6.4%, respectivamente, após a transferência de até 6 embriões obtidos por ICSI de oócitos previamente vitrificados. Estudo mais recente (Lucena et al., 2006) reporta taxas de gestação mais elevadas (25-100%), após transferência de 4-5 embriões obtidos pós-vitrificação e ICSI de oócitos de pacientes tratadas por diferentes etiologias. Recente relato de caso (Huang et al., 2007a) descreve ainda, o uso bem sucedido da vitrificação para a criopreservação de oócitos coletados imaturos e maturados *in vitro* em uma paciente portadora de tumores ovarianos *borderline*. Apesar destes sucessos, fica também evidente que, as baixas taxas de implantações dos embriões pós-vitrificação dos oócitos exige a transferência de um número consideravelmente elevado deles, o que por sua vez, requer a produção e criopreservação de números elevados de gametas para dar-se início ao processo e obter-se resultados finais satisfatórios.

Importante mencionar que, semelhante aos resultados já descritos sobre a constituição cromossômica de embriões obtidos após vitrificação de oócitos murinos (Bos-Mikich et al., 1995), estudo recente também mostrou não haver qualquer aumento na taxa de aneuploidias após a vitrificação, quando comparada com o congelamento lento (Huang, et al., 2007b).

Estes resultados confirmam a capacidade de re-organização do citoesqueleto do oócito em cultura, após sua despolimerização causada pela criopreservação (Eroglu et al., 1998).

### Vitrificação de embriões

A criopreservação de embriões supranumerários dos tratamentos de IVF/ICSI tornou-se um procedimento rotineiro em basicamente todos os centros de reprodução assistida. Vitrificação está sendo gradativamente considerada como uma alternativa ao método de congelamento lento convencional para embriões humanos desde o estágio de pronúcleo até de blastocisto.

Vitrificação bem sucedida de embriões de mamíferos foi relatada pela primeira vez por Rall & Fahy em 1985. Logo a seguir Quinn & Kerin (1986) tentaram utilizar o mesmo protocolo para embriões humanos, mas os resultados foram muito inferiores àqueles obtidos em murinos. Desde então, variações da metodologia vêm sendo investigadas para embriões humanos, inclusive o uso de diferentes crioprotetores como DMSO, glicerol, etileno glycol, propanodiol e açúcares em diversas concentrações e combinações (Chen et al., 2000; Mandelbaum, 2000; Shaw et al., 2000; Wright et al., 2004).

Utilizando concentrações de DMSO relativamente mais baixas do que trabalhos anteriores (4.2 -4.5 mol/l), embriões humanos desde pronúcleo (Van den Abbeel et al., 1997) até 2 -16 células (Barg et al., 1990; Feichtinger et al., 1991) foram vitrificados e resultaram em gestações levadas a termo, demonstrando a propriedade da metodologia. O uso de soluções de vitrificação baseadas em etileno glycol, também resultou em gestações e nascimentos após criopreservação de embriões humanos entre 8-16 células (Mukaida et al., 1998; Saito et al., 2000). Interessante mencionar que um estudo recente utilizando embriões murinos em sucessivos estágios do desenvolvimento demonstrou que a re-vitrificação acarreta menos danos ao embrião que o congelamento lento (Sheehan et al., 2006). Os autores mostraram que a vitrificação sucessiva não compromete o desenvolvimento embrionário subsequente medido em termos de taxas de compactação, desenvolvimento ao estágio de blastocisto, número total de células e qualidade da massa celular interna.

Com o desenvolvimento de meios de cultura sequenciais que permitem a produção eficaz de blastocistos *in vitro*, surgiu também a necessidade de um método eficiente para sua criopreservação. Entretanto, a criopreservação de blastocistos tem se mostrado um desafio para a maioria dos cientistas procurando criopreservá-los utilizando métodos clássicos de congelamento lento, semelhantes àqueles empregados para o congelamento de estágios mais precoces do desenvolvimento (Nakayama et al., 1995; Alper et al., 2001; Pantos et al., 2001). Em contrapartida, alguns grupos (Liebermann et al., 2003b) que dão preferência à transferência e congelamento de blastocistos em vista do crescente interesse em transferir-se apenas um embrião, preconizam uma aparente superioridade do estágio de blastocisto para criopreservação, em comparação a estágios mais precoces do desenvolvimento.

Não parece, entretanto haver uma superioridade da vitrificação em relação ao congelamento lento em relação as taxas de implantação (em torno de 30%) ou de gestação (em torno de 45%) para a criopreservação de blastocistos (Liebermann & Tucker, 2006). Relato recente (Hiraoka et al., 2007) de quatro casos descreve resultados excelentes em termos de gestações (n=3; 75%) e implantações (n=3; 75%) após a transferência de blastocistos eclodidos previamente vitrificados. Blastocistos humanos são menos permeáveis a água e existe, teoricamente, maior risco da formação de cristais de gelo na blastocela durante o resfriamento e aquecimento. Comparando as taxas de sobrevivência de blastocistos criopreservados pelo método tradicional de

congelamento lento e pela vitrificação, Yeoman e colegas (2001) demonstraram que a sobrevivência e eclosão de blastocistos de macacos rhesus eram consideravelmente superiores após vitrificação (36% e 5% vs 85% e 71%, respectivamente). Em 2002, Vanderzwalm e colegas demonstram taxas de gestação superiores a 20%, após a transferência de blastocistos previamente vitrificados, cujas blastocelas foram artificialmente colabadas antes da vitrificação em solução de etileno glycol, ficoll e sacarose. Estudos subsequentes de vitrificação de blastocistos humanos utilizando o *cryoloop* mostraram taxas de sobrevivência entre 37-50% e taxas de implantação entre 22-29% (Mukaida et al., 2001; Reed et al., 2002; Mukaida et al., 2003a,b; Stehlik et al., 2005). Além destes estudos, alguns outros trabalhos comparativos entre eficiência do congelamento lento e da vitrificação revelaram que os resultados alcançados pela vitrificação de embriões e oócitos humanos são, no mínimo, equivalentes ou significativamente superiores àqueles obtidos pelo congelamento lento (Liebermann et al., 2003a; Walker et al., 2004; Kuwayama et al., 2005).

### Vitrificação de tecido ovariano

Por fim, cabe mencionar o emprego da vitrificação na criopreservação de tecido ovariano. A criopreservação de tecido ovariano, apesar de já contar com gestações bem sucedidas e com o nascimento de crianças saudáveis (Donnez et al., 2004; Meiorow et al., 2005; Donnez et al., 2006) após congelamento lento, ainda está em fase experimental em diversos laboratórios do mundo. Análises histológicas pós-congelamento lento de tecido ovariano demonstraram que a maior dificuldade encontrada está na manutenção da estrutura folicular e do estroma ovariano, responsável pelo funcionamento coordenado entre o oócito, células foliculares e o tecido circunvizinho (Gook et al., 1999; Bos-Mikich et al., 2006). Recente estudo comparativo entre congelamento lento e vitrificação de fragmentos ovarianos de diversas espécies de mamíferos, inclusive humanos, revelou que a vitrificação de fragmentos ovarianos causou danos mais extensos na estrutura folicular que o congelamento lento (Gandolfi et al., 2006). Em contrapartida, estudos em modelos experimentais mostraram que a restauração da função endócrina ovariana e a capacidade de desenvolvimento dos oócitos, fertilização e até nascimento são possíveis, após a vitrificação de ovários murinos inteiros, em uma solução contendo DMSO e propilenoglycol (Migishima et al., 2003; Kagawa et al., 2007). Certamente devido às grandes diferenças histológicas e fisiológicas existentes entre ovários murinos e humanos, estes resultados não podem ser extrapolados de uma espécie para a outra e refinamentos da metodologia são evidentemente necessários antes de que sua aplicação clínica possa ser considerada.

Em conclusão, a vitrificação de oócitos, embriões e tecido ovariano humano parece estar conquistando uma posição cada vez mais sólida entre as metodologias em reprodução assistida em diversos centros mundiais de reprodução assistida humana. Aprimoramentos da técnica e maior conhecimento dos efeitos de suas diferentes variáveis por parte dos embriologistas envolvidos na sua execução contribuirão, certamente, para maior aceitação e emprego clínico bem sucedido deste método de criopreservação.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

- Alper M., Brinsden P., Fisher R., Wikland M.- To blastocyst or not to blastocyst? That is the question. Hum Reprod 16: 617-619, 2001.
- Arav A., Yavin S., Zeron Y., Natan D., Dekel I., Gacitua H.- New trends in gamete's preservation. Mol Cell Endocrinol 187: 77-81, 2002.
- Barg P.E., Barad D.H., Feichtinger W.- Ultrarapid freezing (URF) of mouse and human preembryos: a modified approach. J In vitro Fert Emb Transf. 7: 355-357, 1990.

- Bos-Mikich A., Wood M.J., Candy C.J., Whittingham G.D. - Cytogenetical analysis and developmental potential of vitrified mouse oocytes. *Biol Reprod* 53: 780-785, 1995.
- Bos-Mikich, A., Ferreira, M.O., Frantz, G.N., Oliveira, N.P., Frantz, N. - The effects of cryopreservation on the stromal components of the ovarian cortex. A histological analysis. *JBRA* 10: 27-30, 2006.
- Chen S.U., Lien Y.R., Chao K.H., Lu H.F., Ho H.N., Yang Y.S. - Cryopreservation of mature human oocytes by vitrification with ethylene glycol in straws. *Fertil Steril* 74: 804-808, 2000.
- Donnez J., Dolmans M.M., Demylle D., Jadoul P., Pirard C., Squifflet J. - Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 364: 1405-1410, 2004.
- Donnez J., Dolmans M.M., Demylle D., Jadoul P., Pirard C., Squifflet J., Martinez-Madrid B., Van Langendonck A. - Restoration of ovarian function after orthotopic (intraovarian and periovarian) transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a woman treated by bone marrow transplantation for sickle cell anemia: case report. *Hum Reprod* 21: 183-188, 2006.
- Elford B.C., Walter C.A. - Effects of electrolyte composition and pH on the structure and function of smooth muscle cooled to -79°C in unfrozen medium. *Cryobiology* 9: 82-100, 1972.
- Eroglu A., Toth T.L., Toner M. - Alterations of the cytoskeleton and polyploidy induced by cryopreservation of metaphase II mouse oocytes. *Fertil Steril* 69: 944-57, 1998.
- Fahy G.M., Wowk B., Wu J., Painter S. - Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. *Cryobiology* 48: 22-35, 2004a.
- Fahy G.M., Wowk B., Wu J., Phan J., Rasch C., Chang A., Zendejas E. - Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances. *Cryobiology* 48: 157-178, 2004b.
- Feichtinger W., Hochfellner C., Ferstl U. - Clinical experience with ultra-rapid freezing of embryos. *Hum Reprod* 6: 735-736, 1991.
- Fioravante J., Ribeiro M.A., Alegretti J.R., Rocha A.M., Serafini P., Motta E.L.A. - Nascimento de crianças saudáveis a partir de de fertilização in vitro de oócitos vitrificados. *JBRA* 11 (1) Edição Especial, p 22, 2007 a.
- Fioravante J., Ribeiro M.A., Alegretti J.R., Rocha A.M., Serafini P., Motta E.L.A. - Sucesso na combinação das técnicas de vitrificação de oócitos e embriões. *JBRA* 11 (1) Edição Especial, p24, 2007b.
- Fioravante J., Ribeiro M.A., Alegretti J.R., Rocha A.M., Serafini P., Motta E.L.A. - Gestação após dupla biópsia embrionária e vitrificação para diagnóstico de amiotrofia espinhal por reação em cadeia de polimerase - Relato de caso. *JBRA* 11 (1) Edição Especial, p26, 2007c.
- Gandolfi F., Paffoni A., Brambilla E.P., Bonetti S., Brevini D., Pharm T.A.L., Ragni G. - Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. *Fertil Steril*, 85: 1150-1156, 2006.
- Gilmore J.A., Liu J., Gao D.Y., Critser J.A. - Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. *Hum Reprod* 12: 112-118, 1997.
- Gook D.A., Edgar D.H., Stern C. - Effect of cooling rate and dehydration regimen on the histological appearance of human ovarian cortex following cryopreservation in 1,2-propanediol. *Hum Reprod* 14: 2061-2068, 1999.
- Hiraoka K., Hiraoka K., Kinutani M., Kinutani K. - Vitrification of human hatched blastocysts: a report of 4 cases. *J Reprod Med* 52: 413-415, 2007.
- Hochi S., Hirabayashi M., Hirao M., Kato M., Kobayashi T., Kimura K., Hirasawa K., Leibo S.P., Ueda M. - Effects of cryopreservation of pronuclear stage rabbit zygotes on the morphological survival, blastocyst formation and full-term development after DNA micro-injection. *Mol Reprod Dev*: 60: 227-232, 2001.
- Huang J.Y.J., Buckett W.M., Gilbert L., Tan S.-L., Chian R.-C. - Retrieval of immature oocytes followed by in vitro maturation and vitrification: A case report on a new strategy of fertility preservation in women with borderline ovarian malignancy. *Gynecol Oncol* 105: 542-544, 2007a.
- Huang J.Y.J., Chen H.-Y., Tan S.-L., Chian R.-C. - Effect of choline-supplemented sodium-depleted slow freezing versus vitrification on mouse oocyte meiotic spindles and chromosome abnormalities. *Fertile Steril Epub ahead of publication*, 2007b.
- Hunter J.E., Fuller B.J., Bernard A., Jackson A., Shaw R.W. - Vitrification of human oocytes following minimal exposure to cryoprotectants: initial studies on fertilization and embryonic development. *Hum Reprod* 10: 1184-1188, 1995.
- Kagawa K., Kuwayama M., Nakata K., Vajta G., Silber S., Manabe N., Kato O. - Production of the first offspring from oocytes derived from fresh and cryopreserved pre-antral follicles of adult mice. *Reprod Biomed Online* 14: 693-699, 2007.
- Kuleshova L., Gianaroli L., Magli C., Ferraretti A., Trounson A. - Birth following vitrification of a small number of human oocytes. Case report. *Hum Reprod* 14: 3077-3079, 1999.
- Kuleshova L., Lopata A. - Vitrification can be more favourable than slow cooling. *Fertil Steril* 78: 449-453, 2002.
- Kuwayama M., Kato O. - All-round vitrification method for human oocytes and embryos. *J Assist Reprod Genet* 17: 477, (2000).
- Kuwayama M., Vajta G., Kato O., Leibo S.P. - Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 11: 300-308, 2005.
- Liebermann J., Nawroth F., Isachenko V., Isachenko E., Rahimi G., Tucker M.J. - The potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol Reprod* 67: 1671-1680, 2002.
- Liebermann J., Tucker M.J., Sills E.S. - Cryoloop vitrification in assisted reproduction: analysis of survival rates in > 1000 human oocytes after ultra-rapid cooling with polymer augmented cryoprotectants. *Clinic Exper Obst Gyn* 30: 125-129, 2003a.
- Liebermann J., Dietl J., Vanderzwalmen P., Tucker M. - Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now? *Reprod Biomed Online* 7: 623-633, 2003b.
- Liebermann J., Tucker M.J. - Comparison of vitrification and conventional cryopreservation of day 5 and day 6 blastocysts during clinical application. *Fertil Steril* 86: 20-26, 2006.
- Lucena E., Bernal D.P., Lucena C., Rojas A., Moran A., Lucena A. - Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. *Fertil Steril* 85: 108-111, 2006.
- Luyet B.J., Hodapp R. - Revival of frog spermatozoa vitrified in liquid air. *Proc. Soc. Exp. Biol. NY* 39: 433-434, 1938.
- Mandelbaum J. - Embryo and oocyte cryopreservation. *Hum Reprod* 15: 43-47, 2000.
- Matsumoto H., Jiang J.Y., Tanaka T., Sasada H., Sato E. - Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology* 42: 139-144, 2001.
- Meirou D., Levron J., Eldar-Geva T., Hardan I., Fridman E., Zalel Y., Schiff E., Dar J. - Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med* 353: 318-321, 2005.
- Migishima F., Suzuki-Migishima R., Song S.-Y., Kuramochi T., Azuma S., Nishijima M., Yokoyama M. - Successful cryopreservation of mouse ovaries by vitrification. *Biol Reprod* 68: 881-887, 2003.
- Molisch H. - Untersuchung uber das Erfrieren der Pflanzen. Jena 1897. Citado em: Steponkus P.L., Dowgert M.F., Gordon-Kamm W.J. - *Cryobiology* 20: 448-465, 1984.
- Mukaida T., Wada S., Takahashi K., Pedro P.B., An T.Z., Kasai M. - Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cells mouse embryos. *Hum Reprod* 13: 2874-2879, 1998.
- Mukaida T., Nakamura S., Tomiyama T., Wada S., Kasai M., Takahashi K. - Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of a Cryoloop containerless technique. *Fertile Steril* 76: 1965-1969, 2001.
- Mukaida T., Nakamura S., Tomiyama T., Wada S., Oka C., Kasai M., Takahashi K. - Vitrification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles. *Hum Reprod* 18: 384-391, 2003a.
- Mukaida T., Takahashi K., Kasai M. - Blastocyst cryopreservation: ultra-rapid vitrification using Cryoloop technique. *Reprod Biomed Online* 6: 221-225, 2003b.
- Nakayama T., Goto Y., Kanzaki H., Takabatake K., Himeno T., Noda Y., Mori T. - Developmental potential of frozen-thawed human blastocysts. *J of Assist Repr Genet* 12: 239-243, 1995.
- Newton H., Pegg D.E., Barrass R., Gosden R.G. - Osmotic inactive volume, hydraulic conductivity and permeability to dimethyl sulphoxide of human oocytes. *J of Repr. Fertil.* 117: 27-33, 1999.
- Pantos K., Stefanidis K., Pappas K., Kokkinopoulos P., Petroutsou K., Kokkali G., Stravou D., Tzigonis V. - Cryopreservation of embryos, blastocysts and pregnancy rates of blastocysts derived from frozen-thawed embryos and frozen-thawed blastocysts. *J of Assisted Reprod Genetics* 18: 579-582, 2001.
- Paynter S.J., O'Neil L., Fuller B.J., Shaw R.W. - Membrane permeability of human oocytes in the presence of the cryoprotectant propane 1,2-diol. *Fertil Steril* 75: 532-538, 2001.
- Pegg D. - The role of vitrification techniques of cryopreservation in reproductive medicine. *Hum Fert* 8: 231-239, 2005.
- Quinn P., Kerin J.F. - Experience with the cryopreservation of human embryos using the mouse as a model to establish successful techniques. *J in vitro Fert Emb Transf* 3: 40-45, 1986.
- R all W.F., Fahy G.M. - Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 313: 573-575, 1985.

- Rall W.F. - Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 24: 387-402, 1987.
- Reed M.L., Lane M., Gardner D.K., Jensen N.L., Thompson J. - Vitrification of human blastocysts using the cryoloop method: successful clinical application and birth of offspring. *J Assist Reprod Genet* 19: 2187-2194, 2002.
- Saito H., Ishida G.M., Kaneko T., Kawachiya S., Ohta N., Takahashi T., Saito T., Hiroi M. - Application of vitrification to human embryo freezing. *Gynaec Obstc Invest*: 49: 145-149, 2000.
- Shaw J., Oranrathnachi A., Trounson A. - Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* 53: 59-72, 2000.
- Sheehan C.B., Lane M., Gardner D.K. - The CryoLoop facilitates re-vitrification of embryos at four successive stages of development without impairing embryo growth. *Hum Reprod* 21: 2978-2984, 2006.
- Stehlik E., Stehlik J., Katayama K.P., Kuwayama M., Jambor V., Rohammer R., Kato O. - Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. *Reprod Biomed Online* 11: 53-57, 2005.
- Steponkus P.L., Myers S.P., Lynch D.V., Gardner L., Bronshteyn P.J., Leibo S.P., Rall, W.F., Pitt R.E., Lin T.T., MacIntyre R.J. - Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. *Nature* 10: 170-172, 1990.
- Sutton R.L. - Critical cooling rates for aqueous cryoprotectants in the presence of sugars and polysaccharides. *Cryobiology* 29: 585-598, 1992.
- Tammann G. - Ueber die abh ngkeit der Kernr, welche sich in verschiedenen flussigkeit bilden, von der temperature. *Zeitschrift fur Physikalische Chemie* 25: 441-479, 1898.
- Trounson A., Peura A., Freeman L., Kirby C. - Ultrarapid freezing of early cleavage stage human embryos and eight cell mouse embryos. *Fertil Steril* 49: 822-826, 1988.
- Vajta G., Holm P., Kuwayama M., Booth P.J., Jacobsen H., Greeve T., Callesen H. - Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Devel* 51: 53-58, 1998.
- Van den Abbeel E., Camus M., van Waesberghe L., Devroey P., van Steirteghem A.C. - A randomized comparison of the cryopreservation of one-cell human embryos with a slow controlled-rate cooling procedure or a rapid cooling procedure by direct plunging into liquid nitrogen. *Hum Reprod* 12: 1554-1560, 1997.
- Vanderzwalmen P., Bertin G., Debauche C., Standaert V., van Rosendaal E., Vandervorst M., Bollen N., Zoch H., Mukaida T., Takahashi K., Shoysman R. - Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification. *Hum Reprod* 17: 744-751, 2002.
- Walker D., Tummon I.S., Hammit D.G., Session D.R., Dumesic D.A., Thornhill A.R. - Vitrification versus programmable rate freezing of late stage embryos: a randomized comparison prior to application in clinical IVF. *Reprod Biomed Online* 8: 558-568, 2004.
- Whittingham D.G., Leibo S.P., Mazur P. - Survival of mouse embryos frozen to -196 and -269 C. *Science* 178: 411-414, 1972.
- Wright D., Eroglu A., Toner M., Toth T. - Use of sugars in cryopreserving human oocytes. *Reprod Biomed Online* 9: 179-186, 2004.
- Wusteman M.C., Pegg D.E., Robinson M.P., Wang L.H., Fitch P. - Vitrification media: toxicity, permeability and dielectric properties. *Cryobiology* 44: 124-137, 2002.
- Yeoman R.R., Gerami-Naini B., Mitalipov S., Nusser K.D., Widmann-Rowning A.A., Wolf D.P. - Cryoloop vitrification yields superior survival of Rhesus monkey blastocysts. *Hum Reprod* 16: 1965-1969, 2001.
- Yoon T., Chung H.M., Lim J.M., Han S.Y., Ko J.J., Cha K.Y. - Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitrified oocytes in a stimulated in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril* 74: 180-181, 2000.
- Zaho X.M., Quan G.B., Zhou G.B., Hou Y.P., Zhu S.E. - Conventional freezing, straw, and open-pulled straw vitrification of mouse pronuclear (2-Pn.) stage embryos *Anim Biotechnol* 18: 203-212, 2007.

# Sugestão para a Revista?

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

# Seleção Embrionária: Qual o Melhor Método a ser Selecionado?

## Embryo Selection: Which is the Best Method to be Selected?

**Adriana Bos-Mikich<sup>1</sup>, Nilo Frantz<sup>2</sup>,  
Marco Höher<sup>2</sup>, Marcelo Ferreira<sup>2</sup>**

*1 Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS, Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.*

*2 Centro de Pesquisa e Reprodução Humana Nilo Frantz, Porto  
Alegre, RS.*

**Correspondência:** Dra. Adriana Bos-Mikich  
Departamento de Ciências Morfológicas  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Av. Sarmiento Leite 500 - Porto Alegre, RS  
CEP: 90.050-170  
Telefone: 051-33083599/ 33083146/ 051-93336767  
Fax: 051-33083146  
adriana.bosmikich@gmail.com

### RESUMO

A seleção do embrião com maiores chances de implantação e gestação é um ponto crítico para o sucesso das técnicas de reprodução assistida humana, principalmente devido à tendência mundial de transferir um embrião por ciclo. Diversos métodos vêm sendo propostos sem que exista ainda um consenso mundial sobre qual deles, isoladamente, seria o de maior poder prognóstico de implantação e gestação. Métodos qualitativos avaliam características morfológicas, desde o estágio de zigoto até o de blastocisto. Por outro lado, critérios fisiológicos indiretos de viabilidade embrionária, como a dinâmica dos pronúcleos e das divisões celulares e o início da compactação têm recebido cada vez mais atenção e credibilidade. Nenhum desses métodos pode, entretanto, identificar embriões portadores de constituição cromossômica normal sendo este o grande desafio da seleção embrionária, uma vez que 50% ou mais dos embriões considerados aptos para transferência são portadores de anomalias cromossômicas. Certamente o desenvolvimento e aprimoramento de metodologias refinadas de análise direta do metabolismo embrionário representarão o melhor instrumento para seleção do embrião inicial.

**Palavras chave:** embriões, métodos seleção, implantação, gestação.

Recebido 29/08/2007  
Avaliado e aceito 02/09/2007

### SUMMARY

*The selection of the embryo with the highest chances of implantation and pregnancy is a key point for the success of human assisted reproduction technologies, mainly due to the worldwide drift to single embryo transfer. Several methods are being proposed without reaching a general consensus on which one, on its own, would be the one with the strongest predictive power for implantation and gestation. Qualitative methods evaluate morphological characteristics from the zygote to the blastocyst stage. On the other hand, indirect physiological methods of embryo viability, such as pronuclear and cleavage dynamics and the beginning of compaction are receiving each time more attention and credibility. None of these methods can, however, identify the embryos with normal chromosomal complement, being that up to 50% or more of the embryos considered suitable for transfer are chromosomally abnormal. Certainly development and improvements of sophisticated methods to directly analyse embryonic metabolism will represent the best tool for embryo selection.*

**Key words:** embryos, selection methods, implantation, gestation.

### INTRODUÇÃO

Quando os primeiros embriões humanos foram gerados com sucesso *in vitro*, pouco era discutido sobre como se fazer a escolha dos embriões que teriam as maiores chances de implantação e gestação. Conforme as tecnologias de reprodução assistida humana foram sendo aprimoradas, a

ocorrência de gestações múltiplas e suas conseqüências, se tornou bastante mais freqüente do que a desejada, tanto pelos casais como pelos profissionais envolvidos. Ficou evidente que o número de embriões a serem transferidos deveria ser limitado a apenas um ou no máximo dois por transferência. Para que essa atitude pudesse ser tomada com a segurança de que os índices de gestação e implantação não viessem a diminuir, os grandes centros mundiais de reprodução assistida iniciaram uma busca sistemática de parâmetros do desenvolvimento embrionário que servissem de marcadores de viabilidade e potencial de desenvolvimento embrionário e fetal. Esperava-se que esse marcador ou marcadores de viabilidade permita a escolha do embrião líder de qualidade entre todos aqueles produzidos em ciclo de estimulação ovariana e fertilização *in vitro* ou ICSI, de maneira a dar ao casal as maiores chances de um bebê em casa, sem os riscos apresentados pelas gestações múltiplas.

Os primeiros relatórios de tratamentos de fertilização assistida na Europa gerados pela ESHRE para o ano de 1997 descrevem que a taxa de transferências embrionárias simples foi de 11.5%, de transferências duplas de 35.9%, de transferências triplas de 38.4% e de quatro ou mais embriões de 14.3% (EIM, 2001). Entretanto, o número de embriões transferidos após em tratamentos de reprodução assistida variou enormemente entre diferentes países europeus. De uma maneira geral, aquelas estatísticas não se modificaram muito nos 6 anos seguintes: 15.7%, 55.9%, 24.9% e 3.5% para transferências simples, duplas, triplas e de quatro ou mais embriões, respectivamente. (EIM, Registers 2007). Entretanto, dois países nórdicos, Suécia e Finlândia, relataram uma mudança radical em direção às transferências embrionárias simples durante este mesmo período: de 15.8% e 9.1%, em 1997 (EIM, 2001) eles aumentaram estes índices para 30.6% e 38.6%, em 2002 (EIM, 2006). As freqüências de gestações e nascimentos foram, entretanto, muito semelhantes nos dois períodos ou até levemente superiores no relatório de 2002. Como manter as taxas de gestação e nascimentos por transferência em torno de ou acima de 25%, ao mesmo tempo em que reduzimos o número de embriões transferidos? Parte da resposta reside na escolha do embrião que tenha as melhores chances de implantação e desenvolvimento a termo.

Como podemos identificar este embrião líder de qualidade em um grupo? Já em 1992, Steer e colegas propuseram um sistema de classificação cumulativo dos embriões, o qual permitiu a seleção do número ideal de embriões a serem transferidos de maneira a atingirem um percentual máximo de gestações, com uma baixa incidência de gestações múltiplas. Vários parâmetros morfológicos e fisiológicos foram propostos ao longo dos anos. Vamos então discutir alguns pontos relevantes desses métodos e comparar suas performances nos diversos centros de reprodução assistida humana mundiais.

### CRITÉRIOS ZIGÓTICOS

Desde o estágio de zigoto existe uma organização não casual das organelas e produtos gênicos que determinam uma polaridade do embrião (Edwards, 2005). Como marcadores de viabilidade e potencial de implantação e gestação da fase zigótica destacam-se a orientação dos pronúcleos e a distribuição e tamanho dos nucleoli (Scott et al., 2000; Zollner et al, 2002; Kattera & Chen, 2004). Não está bem estabelecido, entretanto, até que ponto esse critério pode depender de um único momento de observação, visto que os nucleoli são estruturas dinâmicas que sofrem alterações em número e localização ao longo da interfase mitótica. Em vista disto, alguns autores proclamam que a avaliação morfológica dos

embriões em cultivo nos dias 2 e 3 do desenvolvimento, baseada no número e na regularidade dos blastômeros e no grau de fragmentação, tem um valor prognóstico de implantação e gestação superior a classificação zigótica baseada nos pronúcleos (Payne et al., 2005; Nicoli et al., 2007). Outro indicador de viabilidade zigótica, a dissolução das membranas dos pronúcleos entre 22 e 25 horas pós-inseminação mostrou forte correlação com o número apropriado de células dos embriões nos dias 2 e 3 do desenvolvimento e taxas de gestação e implantação superiores ao grupo que não apresentou esse comportamento (Francsovit et al., 2005; Lawler et al., 2007).

### Critérios associados aos primeiros estágios do desenvolvimento

Já em 1984 Edwards e colaboradores relataram a relação existente entre o padrão de clivagem e a qualidade de embriões gerados *in vitro* demonstrando que pacientes cujos embriões atingiam o estágio de 8 células até 55 horas pós-inseminação tinham praticamente duas vezes mais chances de gestação do que aquelas cujos embriões atingiam o mesmo estágio 56 horas ou mais pós-inseminação. Não surpreendentemente, o mesmo fenômeno foi detectado para o momento da primeira divisão mitótica e este critério tem adquirido cada vez mais força como instrumento de seleção embrionária, em diferentes centros mundiais (Shoukir et al, 1997; Sakkas et al, 1998; Bos-Mikich et al, 2001; Lundin et al., 2001; Salumets et al, 2003).

A identificação de embriões que atingiram o estágio de 2-células 25-27 horas após a inseminação, dita clivagem precoce, é um forte marcador de viabilidade embrionária, não menos porque embriões que apresentam a 1ª divisão muito antes das 20h ou estão muito atrasados apresentam altas taxas de anomalias cromossômicas e baixo índice de implantação (Ebner et al, 2001). Estudo recente demonstrou ainda que a morfologia dos pronúcleos está correlacionada ao padrão de clivagem (Chen & Kattera, 2006) e a dinâmica de dissolução dos envoltórios nucleares também está relacionada com o padrão de clivagem e a qualidade embrionária (Wharf et al., 2004) evidenciando que a coordenação dos fenômenos fisiológicos do zigoto é fundamental para sua viabilidade e sobrevivência, além de ser um marcador indireto de sua constituição cromossômica.

A importância da clivagem precoce na viabilidade do embrião fica também evidente quando consideramos que cada estágio de desenvolvimento representa uma série de transformações morfológicas e, mais importante, alterações fisiológicas que devem acontecer dentro de um período de tempo determinado, de maneira a gerarem um feto viável. Nesse contexto, o momento da 1ª divisão mitótica é um passo crucial no desenvolvimento embrionário e representa um indicador de que o "relógio" fisiológico embrionário está trabalhando em um compasso adequado. Além disso, considerando-se que a 1ª. e a 2ª divisões mitóticas dependem de componentes maternos do oócito fertilizado e esses componentes irão se exaurir em um dado momento quando as divisões ocorrem no momento certo, pode-se prever que o genoma embrionário será também acionado no momento certo, levando a uma expressão gênica correta e a disponibilidade de seus produtos no momento correto, o que irá dar ao embrião suas melhores chances de sobrevivência e gestação bem sucedidas.

Até o momento não existe qualquer estudo que refute o poder prognóstico da seleção embrionária baseada na clivagem precoce, havendo entretanto, alguns autores que preconizam a necessidade de se agregar outros parâmetros a ela, como

a morfologia embrionária no dia da transferência (Terriou et al., 2007). Sob o ponto de vista prático do embriologista, a principal vantagem do método de seleção embrionária pela clivagem precoce reside na rapidez da avaliação. O profissional não necessita de mais do que poucos segundos para avaliar um grupo completo de embriões, fator decisivo para viabilidade embrionária quando se considera que a exposição das placas de cultivo a condições não ideais pode levar a inviabilidade dos embriões nelas contidos. As avaliações que utilizam variáveis qualitativas, como a distribuição e regularidade dos pronúcleos e dos nucleoli (Scott et al., 2000) ou a classificação morfológica (Veeck, 1991) exigem maior acuidade de observação e conseqüentemente, demoram mais tempo para serem realizadas, mesmo pelos embriologistas mais experientes, estando ainda sujeitas a divergências entre observadores.

Deve-se mencionar, entretanto, que em estudos feitos com a transferência de apenas um embrião, resultados contraditórios foram obtidos quanto à eficiência do uso da clivagem precoce como único critério para seleção embrionária. Enquanto alguns autores preconizam seu emprego como positivo (Van Montfort et al., 2004; Giorgetti et al., 2007), outros descrevem não haver um aumento significativo nas taxas de implantação e gestação, quando os embriões são escolhidos por este critério (Emiliani et al., 2006; Rehman et al., 2007).

Padrões de classificação e seleção embrionária para o segundo e terceiro dia do desenvolvimento baseiam-se primariamente na classificação morfológica dos embriões enfatizando o número apropriado de blastômeros (4 no dia 2 e 7-8 no dia 3) sua regularidade e o grau de fragmentação (Veeck, 1999) sendo que neste último item devemos ainda levar em consideração o tipo, disperso ou agregado, de fragmentos observados (Milki et al., 2002; Racowsky, et al., 2003; Volpes, et al., 2004). Ainda outro critério de avaliação, a multinucleação dos blastômeros no dia 2 ou 3 do desenvolvimento demonstrou ser também um forte marcador de viabilidade embrionária (Van Royen et al., 2003). Esse dismorfismo embrionário parece estar diretamente associado a um padrão de clivagens retardado e com um grau aumentado de fragmentação e decréscimo de implantação. Como a presença de multinucleação pressupõe a perda de cromossomos da placa metafásica da última divisão mitótica, acarretando ganhos ou perdas cromossômicas nos blastômeros, deve-se evitar a transferência de embriões portadores dessas anomalias (Sundström, 2007). Outro marcador potencial de competência de desenvolvimento embrionário no terceiro dia é o surgimento de junções oclusivas entre os blastômeros à medida em que se inicia o processo de compactação. O fenômeno da compactação precoce foi descrito primeiramente em conjunto com outros marcadores do desenvolvimento e mostrou haver uma correlação positiva entre a presença de embriões compactados precocemente no 3º dia e taxas de gestação aumentadas (Desai et al., 2000). Mais recentemente, análise retrospectiva de transferências de um ou dois embriões, mostrou que a compactação precoce associada a um baixo grau de fragmentação é um forte indicador de implantação e gestação (Skiadas et al., 2006). Paradoxalmente, o prognóstico favorável desse marcador torna-se desfavorável, quando a compactação precoce está associada a um elevado grau de fragmentação dos blastômeros. Observação semelhante foi feita por nosso grupo, onde detectamos que a inclusão de pelo menos um embrião com compactação precoce verificada no 3º dia de desenvolvimento, no grupo de embriões transferidos, leva a um aumento significativo nas taxas de gestação e implantação.

Por fim, cabe mencionar o impacto causado pela presença e grau de fragmentação dos embriões durante os estágios

iniciais de desenvolvimento. Estudo de 203 ciclos de transferências de um único embrião revelou que, após a transferência de blastocistos selecionados por sua boa qualidade, o grau de fragmentação no terceiro dia de desenvolvimento foi o fator que mostrou maior correlação com as taxas de implantação e gestação (Della Ragioni et al., 2007). Resultados confirmados pelo estudo de Nomura e colaboradores (2006), mas que estão em direto contraste com um estudo anterior (Rijnders & Jansen, 1998) onde não foi detectada uma correlação positiva entre a morfologia embrionária no terceiro dia do desenvolvimento e a sua capacidade de formação de blastocistos, em um programa de transferência de blastocistos. Entretanto, as transferências nesse estudo foram mistas, isto é, blastocistos de diferentes categorias foram transferidos para a mesma paciente, o que dificulta a interpretação dos resultados quanto o potencial de implantação e gestação dos diferentes tipos embriões.

### Critérios associados ao blastocisto

No extremo do desenvolvimento embrionário *in vitro*, o blastocisto representa, por si só, uma seleção "natural" daqueles embriões mais aptos ao desenvolvimento subsequente. Ainda, a presença de um ou mais blastocistos no 5º ou 6º dia de desenvolvimento *in vitro* fornece um parâmetro adicional de avaliação da viabilidade embrionária, quando da sua classificação quanto ao grau de expansão, disposição e forma das células do trofotoderma e da massa celular interna (Baladan et al., 2006; Quea et al., 2007; Rehman et al., 2007). A obtenção de bons blastocistos não significa, entretanto, a certeza de se ter embriões viáveis e com capacidade de implantação e desenvolvimento fetal a termo: alguns tipos de anomalias cromossômicas numéricas não impedem a completa progressão embrionária *in vitro*, como ficou evidenciado em dois estudos. Primeiramente foram descritos casos de mosaicismos extensivos em "bons" blastocistos e embriões trissômicos que atingiram o estágio de blastocisto com uma frequência de até 37% (Sandalinas et al., 2001). Interessante observar nesse mesmo estudo que somente aquelas monossomias compatíveis com o desenvolvimento no 1º trimestre (monossomias do X e do 21) foram detectadas no estágio de blastocisto, levando à conclusão de que, embora haja uma forte seleção contra embriões cromossomicamente anormais durante a cultura ao estágio de blastocisto, esse instrumento não pode ser utilizado como um método confiável de seleção contra anomalias cromossômicas clinicamente relevantes tais como as trissomias. Essas observações foram reforçadas em um estudo mais atual (Rubio et al., 2007), onde os autores mostraram que, após a avaliação cromossômica de 6936 embriões de pacientes com indicação para diagnóstico pré-implantação (PGD), embriões de ploidia normal atingiram o estágio de blastocisto em frequências significativamente maiores (68.2%) do que embriões portadores de aneuploidias (42.8%) e mosaicos (53.7%). Existe, portanto, uma seleção contrária ao desenvolvimento de embriões com anomalias cromossômicas, mas é ainda preocupante a elevada frequência de embriões anormais que atingem o estágio de blastocisto e que, conseqüentemente, tem boas chances de implantação e gestação.

Seria então a análise cariotípica dos embriões a única maneira segura de transferirmos embriões viáveis e cromossomicamente balanceados, com boas chances de implantação e gestação? Se tal fosse verdadeiro, deveríamos fazer o PGD em todos embriões antes da transferência. Como declara Munné (2006, 2007), se considerarmos que as aneuploidias mais freqüentes em mulheres acima de 35 anos de idade, não estão relacionadas com o estágio de clivagem do embrião e

as trissomias podem alcançar o estágio de blastocisto e além dele, a análise morfológica por si só não é suficiente para selecionar anomalias cromossômicas nos embriões gerados destas pacientes e, portanto, o PGD deveria ser recomendado para todas pacientes de 35 anos ou mais. Deve-se ressaltar, entretanto, que antes que o uso indiscriminado do PGD se torne uma rotina em laboratórios de reprodução assistida humana, testes clínicos randomizados se fazem necessários para determinar se a análise da aneuploidia leva a melhoras significativas das taxas de gestação, ou ainda, se a biópsia embrionária tem algum impacto na saúde das futuras crianças ou adultos (Gosden, 2007). Além disso, não restam dúvidas de que embriões saudáveis são perdidos com o a prática do PGD. Tal fato pode acontecer, potencialmente, quando embriões mosaicos normalizam em cultura ou, mais significativamente, devido a problemas inerentes da técnica de PGD (Gosden, 2007). Assim sendo, por melhores que sejam as intenções de empregar essa tecnologia para seleção embrionária, ela pode não preencher a expectativa primária de um programa de Reprodução Assistida, qual seja, aumentar as chances de gestação e de bebês nascidos de suas pacientes.

Por outro lado, no caso das anomalias pós-meioticas, que têm a mesma frequência em todas idades maternas (cerca de 33%, Muné, 2006) e estão diretamente relacionadas com distúrbios embrionários, como velocidade das clivagens, irregularidade dos blastômeros, grau de fragmentação e multinucleação, esses parâmetros podem ser de grande valia para a exclusão da maior parte dos embriões cariotipicamente anormais, especialmente quando utilizados em conjunto para a elaboração de um sistema de classificação embrionária cumulativo ou combinado, como alguns autores têm utilizado com sucesso para a seleção do blastocisto a ser transferido em programas de transferência de um único embrião (De Fish et al., 2001; De Placido et al., 2002; Rienzi et al., 2002; Sjöblom et al., 2006; Scott et al., 2007).

Cabe ainda citar o papel do antígeno – G leucocitário humano (HLA-G) presente no meio de cultivo embrionário desde o terceiro dia de desenvolvimento (Menicucci et al., 1999). Esse antígeno parece representar um marcador importante de sobrevivência e implantação embrionária visto que, quando detectado em concentrações elevadas no meio de cultivo, ele está associado a clivagens mais aceleradas e potenciais de gestação e implantação maiores (Fuzzi et al., 2002). Mais recentemente, o uso prospectivo da medição dos níveis de HLA-G no meio de cultivo para seleção embrionária provou ser um instrumento prognóstico poderoso de gestação e implantação (Sher et al., 2005). O grande problema da opção por esse critério de seleção é a metodologia em si, bastante mais trabalhosa e que requer ensaios laboratoriais e reagentes específicos, os quais certamente elevarão os custos do tratamento.

Em um futuro próximo, a avaliação do desempenho fisiológico do embrião *in vitro* deverá ser o indicador mais forte de viabilidade e de potencial de implantação e gestação por refletir mais diretamente a constituição cromossômica do embrião. Nesse sentido, a análise do metabolismo embrionário medido em termos de captação de aminoácidos do meio de cultivo (Brison et al., 2004), da análise do proteoma embrionário (Katz-Jaffe et al., 2006) ou ainda o registro das taxas de respiração embrionária (Lopes et al., 2007) são tecnologias emergentes que deverão ser implementadas nos laboratórios de reprodução assistida humana dentro de poucos anos.

Em conclusão, é correto assumirmos que, no momento, não há um único método capaz de indicar, em um grupo de embriões, aquele com maiores chances de implantação

e gestação. Podemos, entretanto, embasar nossa escolha em critérios fisiológicos como a dinâmica dos pronúcleos e nucleoli, a clivagem e a compactação precoce, ausência de fragmentação e, preferencialmente, considerar esses parâmetros em conjunto para a seleção do embrião com maior potencial de implantação e gestação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Balaban B., Yakin K., Urman B. - Randomized comparison of two different blastocyst grading systems. *Fertil Steril* 85: 559-563, 2006.
- Brison D.R., Houghton Bos-Mikich A., Mattos A.L.G., Ferrari A.N. - Early cleavage of human embryos an effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome. *Hum Reprod* 16: 2858-2861, 2001.
- F.D., Falconer D., Roberts S.A., Hawkhead J., Lieberman B.A., Leese H.J. - Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Hum Reprod* 19: 2319-2324, 2004.
- Chen C., Kattera S. - Comparison of pronuclear zygote morphology and early cleavage status of zygotes as additional criteria in the selection of day 3 embryos: a randomized study. *Fertil Steril* 85: 347-352, 2006.
- Della Ragione T., Verheyen G., Papanikolaou E.G., Van Landuyt L., Devroey P., Van Steirteghem A. - Developmental stage on day-5 and fragmentation rate on day-3 can influence the implantation potential of top-quality blastocysts in IVF cycles with single embryo transfer. *Reprod Biol Endocrinol* 26: 2-10, 2007.
- De Placido G., Wilding M., Strina L., Alviggi A., Alviggi E., Mollo A., Varichio M.T., Tolino A., Schiattarella C., Dale B. - High outcome predictability after IVF using a combined score for zygote and embryo morphology and growth rate. *Hum Reprod* 17: 2402-2409, 2002.
- Desai N., Goldstein J., Rowland D.Y., Goldfarb J. - Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. *Hum Reprod* 15: 2190-2196, 2000.
- Edwards R.G., Fishel S., Cohen J. Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1:3-23, 1984.
- Edwards R.G. - Changing genetic world of IVF, stem cells and PGD. B. Polarities and gene expression in differentiating embryo cells and stem cells. *Reprod Biomed Online* 11: 761-776, 2005.
- EIM Registers 2001- European IVF Monitoring –Assisted reproductive technology in Europe 1997. Results generated by ESHRE. *Hum Reprod* 16: 384-391, 2001.
- EIM Registers 2007- European IVF Monitoring – Andersen A.N., Goossens V., Gianaroli L., Felberbaum R., de Mouzon J., Nygren K.G. - Assisted reproductive technology in Europe, 2003. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod*, 22: 1513-1525, 2007.
- Emiliani S., Fasano G., Vamdamme B., Vannin A.S., Verdooth M., Biramane J., Delbaere A., Englert Y., Devreker F. - Impact of the assessment of early cleavage in a single embryo transfer policy. *Reprod Biomed Online* 13: 255-260, 2006.
- Fancsovi P., Toth L., Takacs Z.F., Murber A., Papp Z., Urbancsek J. - Early pronuclear breakdown is a good indicator of embryo quality and viability. *Fertil Steril* 84: 881-887, 2005.
- de Fish, J.D., Rodriguez H., Ross, R., Overby G., Sher G. - The graduated embryo score (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage-stage embryos. *Hum Reprod* 16: 1970-1975, 2001.
- Fuzzi B., Rizzo R., Criscuoli L., Melchioni L., Scarcelli B. - HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtention of pregnancy. *Eur J Immunol* 32: 311-315, 2002.
- Giorgetti C., Hans E., Terriou P., Salzmann J., Barry B., Chabert-Orsini V., Chinchole J.M., Franqueballe J.P., Glowaczow E., Sitri M.C., Thibault M.C., Roulier R. - Early cleavage: an additional predictor of high implantation rate following elective single embryo transfer. *Reprod Biomed Online* 14: 85-91, 2007.
- Gosden R. - Genetic test may lead to waste of healthy embryos. *Nature* 445: 372, 2007.
- Kattera S., Chen C. - Developmental potential of human pronuclear zygotes in relation to their pronuclear orientation. *Hum Reprod* 19: 294-199, 2004.
- Katz-Jaffe M.G., Gardner D.K., Schoocraft W.B. - Proteomic analysis of individual human embryos to identify novel biomarkers of development and viability. *Fertil Steril* 85: 101-107, 2006.
- Lawler C., Baker H.W.G., Edgar D.H. - Relationships between timing of syngamy, female age and implantation potential in human in vitro-fertilised oocytes. *Reprod Fertil Dev* 19: 482-487, 2007.

21. Lopes A., Greeve T., Callesen H. - Quantification of embryo quality by respirometry. *Theriogenology* 67:21-31, 2007.
22. Lundin, K., Bergh, C., Hardarson, T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum. Reprod* 16: 2652-2657, 2001.
23. Menicucci A., Noci I., Fuzzi B., Criscuoli L., Scarcelli G., Baricordi O. - Non-classic sHLA class I in human oocyte culture medium. *Hum Immunol* 60: 1054-1057, 1999.
24. Milki A.A., Hinckley M.D., Gebhardt J., Dasig D., Westphal L.M., Behr B. - Accuracy of day 3 criteria for selecting the best embryos. *Fertil Steril* 77: 1191-1195, 2002.
25. Munné S. - Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. *Reprod Biomed Online* 12: 234-253, 2006.
26. Munné S., Chen S., Colls P., Garrisi J., Zheng X., Cekleniak N., Lenzi M., Hughes P., Fischer J., Garrisi M., Tomkin G., Cohen J. - Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. *Reprod Biomed Online* 14:628-634, 2007.
27. Nicoli A., Valli B., Di Girolamo R., Di Tommaso B., Gallinelli A., La Sala G.B. - Limited importance of pre-embryo pronuclear morphology (zygote score) in assisted reproduction outcome in the absence of embryo cryopreservation. *Fertil Steril* 2007 (Epub ahead of print).
28. Nomura M., Iwase A., Furui K., Kitagawa T., Matsui Y., Yoshikawa M., Kikawa F. - Preferable correlation to blastocyst development and pregnancy rates with a new embryo grading system specific for day 3 embryos. *J Assist Reprod Genet* 24: 23-8, 2007.
29. Payne, J.F., Raburn D.J., Couchman G.M., Price T.M., Jamison M.G., Walmer D.K. - Relationship between pre-embryo pronuclear morphology (zygote score) and standard day 2 or 3 embryo morphology with regard to assisted reproductive technique outcomes *Fertil Steril* 84: 900-909, 2005.
30. Quea G., Romero K., Garcia-Velasco J.A. - Extended embryo culture to increase implantation rate. *Reprod Biomed Online* 14: 375-383, 2007.
31. Racowsky C., Combelles A., Nureddin Y., Pan A., Finn A., Miles L. - Day 3 and day 5 morphological predictors of embryo viability. *Reprod Biomed Online* 6: 323-331, 2003.
32. Rehman K.S., Bukulmez O., Langley M., Carr B.R., Nackley A.C., Doody K.M., Doody K.J. - Late stages of embryo progression are a much better predictor of clinical pregnancy than early cleavage in intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization cycles with blastocyst-stage transfer. *Fertil Steril* 87: 1041-1052, 2007.
33. Rienzi L., Ubaldi F., Iacobelli M., Ferrero S., Minasi M.G., Martinez F., Tesarik J., Greco F. - Day 3 embryo transfer with combined evaluation at the pronuclear and cleavage stages compares favourably with day 5 blastocyst transfer. *Hum Reprod* 17: 1852-1855, 2002.
34. Rijnders P.M., Jansen C.A.M. - The predictive value of day 3 embryo morphology regarding blastocyst formation, pregnancy and implantation rate after day 5 transfer following in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 13: 2869-2873, 1998.
35. Rubio C., Rodrigo L., Mercader A., Mateu E., Buendia P., Pehlivan T., Viloria T., De Los Santos M.J., Simon C., Remohi J., Pellicer A. - Impact of chromosomal abnormalities on preimplantation embryo development. *Prenat. Diagn* 27 : 748-756, 2007.
36. Sakkas D., Shoukir Y., Chardonnes D., Bianchi P.G., Campona A. - Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum Reprod* 13 182-187, 1998.
37. Salumets A., Hyden-Granskog C., Makinen S., Suikkari A. M., Tiitinen A., Tuuri T. - Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Hum.Reprod.*18: 821-825, 2003.
38. Sandalinas M., Sadowy S., Alikani M., Calderon G., Cohen J., Munne S. - Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. *Hum Reprod* 16: 1954-1958, 2001.
39. Scott L., Alvero R., Leondires M., Miller B. - The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod* 15:2394-403, 2000.
40. Scott L., Finn A., O'Leary T., Mc Lellan S., Hill J. - Morphologic parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates. *Hum Reprod* 22: 230-240 2007.
41. Sher G., Keskinetepe L., Fisch J.D., Acacio B.A., Ahlering P., Batzofin J., Ginsburg, M. - Soluble human leukocyte antigen G expression in phase I culture media at 46 hours after fertilization predicts pregnancy and implantation from day 3
42. embryo transfer. *Fertil & Steril* 83: 1410-1413, 2005.
43. Shoukir Y., Campana A., Farley T., Sakkas D. - Early cleavage of in-vitro fertilized embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability, *Hum Reprod* 12: 1531-1536, 1997.
44. Sjöblom P., Menezes J., Cummins L., Mathivalagan B., Costello M.F. - Prediction of embryo developmental potential and pregnancy based on early stage morphological characteristics. *Fertil Steril* 86: 848-861, 2006.
45. Skiadas C.C., Jackson K.V., Racowsky C. - Early compaction on day 3 may be associated with increased implantation potential. *Fertil Steril* 86; 1386-1391, 2006.
46. Steer C.V., Mills C.L., Tan S.L., Campbell S., Edwards R.G. - The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in vitro fertilization and embryo transfer programme. *Hum Reprod* 7: 117-119, 1992.
47. Sundström P. - Interpretations of multinucleation—is it ever normal? *Fertil Steril* 86: e3 , 2007.
48. Terriou P., Giorgetti C., Hans E., Salzmänn J., Charles O., Cignetti L., Avon C., Roulier R. - Relationship between even early cleavage and day 2 embryo score and assessment of their predictive value for pregnancy. *Reprod Biomed Online* 14: 294-299, 2007.
49. Van Montfort A.P.A., Demoulin J.C.M., Kester A.D.M., Evers J.L.H. - Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters a study using single embryo transfers. *Hum Reprod* 19: 2103-2108, 2004.
50. Van Royen E., Mangelschots K., Vercruyssen M., De Neubourg D., Valkenburg M., Ryckaert G., Gerris J. - Multinucleation in cleavage stage embryos. *Hum Reprod* 18: 1062-1069, 2003.
51. Veeck LL (ed) *Atlas of the human oocyte and early conceptus*. Vol II, Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 1991.
52. Volpes A., Sammartano F., Coffaro F., Mistretta V., Scaglione P., Allegra A. - Number of good quality embryos on day 3 is predictive for both pregnancy and implantation rates in in vitro fertilization/ intracytoplasmic sperm injection cycles, *Fertil Steril* 82 1330-1336, 2004.
53. Wharf E., Dimitrakopoulos A., Khalaf Y., Pickering S. - Early embryo development is an indicator of implantation potential. *Reprod Biomed Online* 8: 212-218, 2004.
54. Zollner U., Zollner K.P., Hartl G., Dietl J., Steck T. - The use of a detailed zygote score after IVF/ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience. *Hum Reprod* 17: 1327-1333, 2002.

# Sugestão para a Revista?

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

# Endometrioma: Deveria ser Operado antes do Tratamento de Fertilização *In Vitro* (FIV)?

## Endometrioma: Should this be Managed Before *In Vitro* Fertilization (FIV)?

**Juliano Augusto Brum Scheffer,  
Caterina Ferreti, René Frydman,  
Renato Fanchin**

Departments of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Medicine ( J.B.S., C.F., R.F., R.F.), Clamart, France

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

### ABSTRACT

*Endometriosis is a common gynaecological disorder in which endometrial tissue (glandular epithelium and stroma) is found outside the uterine cavity. It affects 20–40% of women who complain of subfertility, although it can be found also in 5–10% of fertile women. Endometriosis mostly presents as superficial and deep pelvic peritoneal implants, adhesions and ovarian cysts. Characteristic symptoms include dyspareunia, severe dysmenorrhoea and chronic pelvic pain. It has been believed for almost a century by the majority of academic opinion that endometriosis is a disease caused by shedding of menstrual endometrium and its dissemination throughout the pelvis. Transvaginal ultrasound is an increasingly accepted technique for the diagnosis of an ovarian endometrioma. The primary indications for treatment of ovarian endometriomas are the symptoms of pelvic pain and dyspareunia (pain during or after sexual intercourse). There is a lack of randomized controlled studies to report definitively the impact of endometriomas and conservative surgery of ovarian prior to IVF/ICSI cycles. The most effective method of laparoscopic surgery remains controversial.*

**Key words:** Endometriosis / ultrasonics / surgery

### RESUMO

Endometriose é uma desordem ginecológica comum em que o tecido endometrial (epitélio e estroma glandular) é encontrado fora da cavidade uterina. Afeta 20-40% das mulheres subférteis, embora se possa encontrar também em 5-10% de

mulheres férteis. Endometriose apresenta-se na maior parte como implantes pélvicos superficiais e profundos, adesões e cistos ovarianos. Os sintomas característicos incluem a dispareunia, a dismenorréia severa e a dor pélvica crônica. Foi acreditado por quase um século pela maioria da opinião acadêmica que a endometriose é uma doença causada pelo escoamento do endométrio menstrual e sua disseminação pela pelve. O ultrassom transvaginal é uma técnica cada vez mais aceita para o diagnóstico de um endometrioma ovariano. As indicações preliminares para o tratamento de endometriomas ovarianos são os sintomas da dor pélvica e da dispareunia (dor durante ou após o intercuro sexual). Há uma falta de estudos controlados randomizados para relatar definitivamente o impacto dos endometriomas e a cirurgia conservadora antes dos ciclos de fertilização in vitro e injeção intracitoplasmática de espermatozoides (IVF/ICSI). O método mais eficaz da cirurgia laparoscópica permanece controverso.

**Palavras chave:** Endometriose / ultra-som / cirurgia

### CONTEXT

*Endometriosis is a common gynaecological disorder in which endometrial tissue (glandular epithelium and stroma) is found outside the uterine cavity. It affects 20–40% of women who complain of subfertility, although it can be found also in 5–10% of fertile women. Endometriosis mostly presents as superficial and deep pelvic peritoneal implants, adhesions and ovarian cysts. Characteristic symptoms include dyspareunia, severe dysmenorrhoea and chronic pelvic pain (Hart et al., 2005).*

*It has been believed for almost a century by the majority of academic opinion that endometriosis is a disease caused by shedding of menstrual endometrium and its dissemination throughout the pelvis (Cullen, 1920; Sampson, 1927). The*

Recebido em 03/02/2007  
Avaliado e aceito 16/06/07

origin of ovarian endometriomas, endometriotic deposits within the ovary, is unknown; however, most authors believe that they result initially from a deposit of endometrium passed through the Fallopian tube, causing adherence of the ovary to the pelvic peritoneum and progressive invagination (folding inwards) of the ovary (Hughesdon, 1957; Brosens et al., 1994; Nisolle & Donnez, 1997). If this is true, an endometrioma would be a pseudocyst (false cyst), the wall of which is the inverted ovarian cortex (centre) and hence the removal of this cyst wall might involve removal of normal ovarian tissue, with possible adverse implications for future fertility (Yazbeck et al., 2006).

Transvaginal ultrasound is an increasingly accepted technique for the diagnosis of an ovarian endometrioma. In a recent review, Moore et al. (2002) identified 38 articles related to the diagnosis of endometriosis by ultrasound scan, but only seven studies were found to be sufficiently sound for further analysis. The authors concluded that transvaginal ultrasound is indeed a useful test to detect or to exclude the presence of an ovarian endometrioma. However, the size of the endometriomas included in these studies ranged from 20 mm to 200 mm, with a mean of 40 mm, which suggests that the resolution obtained with current ultrasound techniques is inadequate to detect smaller endometriomas (Brosens, 2004).

The primary indications for treatment of ovarian endometriomas are the symptoms of pelvic pain and dyspareunia (pain during or after sexual intercourse). The evidence suggests that, although medical treatment will result in a reduction in size of the endometrioma of up to 57%, the most effective approach to treatment is surgical (Farquhar & Sutton, 1998), but it may impair the outcome of fertility treatment (Yanushpolsky et al., 1998).

Several alternative laparoscopic techniques have been described for the treatment of ovarian endometriomas: cyst wall laser vaporization (destruction by burning) preceded or not by medical therapy (Brosens et al., 1996), drainage and coagulation, and stripping (Canis et al., 1992). The procedure of drainage of the endometrioma alone is not recommended due to the risk of infection and a high rate of recurrence (Vercellini et al., 1992; Donnez et al., 2002; Audebert, 2005). However, the most effective method of laparoscopic surgery (excisional or ablative) remains controversial. Following ovarian endometrioma cystectomy, some studies have shown conflicting results on ovarian response, with some patients showing a detrimental effect (Tinkanen & Kujansuu, 2000; Ho et al., 2002) and others showing no adverse effect (Canis et al., 2001; Marconi et al., 2002).

There is a lack of randomized controlled studies to report definitively the impact of endometriomas and conservative surgery of ovarian prior to in vitro fecundation (IVF/ICSI) cycles (Garcia-Velasco et al., 2004). The causes of the reduced ovarian reserve in operated ovaries have been poorly investigated. In this regard, it is important to note that, at present, there are no definitive data to clarify whether the damage is related to the surgical procedure and/or to the previous presence of the cyst. Indeed, it cannot be excluded that the cyst per se may damage the surrounding ovarian tissue. Using pathological sections of the ovarian cortex surrounding ovarian endometriomas, Maneschi et al. (1993) found a reduced number of follicles antecedent to surgery, suggesting that the disease per se may be detrimental to the ovary. A major concern is that resection of endometriomas results in the loss of small follicles adjacent to the cyst wall and a reduced oocyte pool, which itself is associated with infertility (Exacoustos et al., 2004). In fact, several retrospective studies have reported reduced responses to gonadotrophins after cystectomy for ovarian endometriomas in young

women (Somigliana et al., 2006) and ovarian endometrioma cystectomy before starting ovulation induction in assisted reproduction cycles does not seem to improve the cycle outcome in asymptomatic and uncomplicated patients with certain diameters (Garcia-Velasco et al., 2004). However, failure to operatively address the endometrioma might result in continued discomfort and potential complications, such as cyst rupture (endometrioma > 4cm) (Wong, 2004) and the possibility of malignancy (Nishida et al., 2000).

In conclusion, it would seem that the age of the patient, the certainty of diagnosis, and the patient's symptoms are important factors to consider when counseling whether to consider conservative ovarian surgery or proceed directly to controlled ovarian hyperstimulation (COH). Proceeding directly to COH in asymptomatic women with ovarian endometriomas might reduce the time to pregnancy, diminish patient costs, and avoid the potential complications of surgery. Conversely, asymptomatic women with ovarian endometriomas > 4 cm and symptomatic women with ovarian endometriomas might be advised to surgical treatment.

## REFERENCE

- Audebert A. - Ovarian endometrioma and infertility: when not to treat? *Gynecol. Obstet. Fertil.*, 33: 416-422, 2005.
- Brosens I. A. - Is mild endometriosis a progressive disease? *Hum. Reprod.*, 9: 2209-2211, 1994.
- Brosens I.A., Van Ballaer P., Puttemans P., Deprest J. - Reconstruction of the ovary containing large endometriomas by an extraovarian endosurgical technique. *Fertil. Steril.*, 66: 517-521, 1996.
- Brosens I. - Endometriosis and the outcome of in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 81: 1198-1200, 2004.
- Canis M., Mage G., Wattiez A., Chapron C., Pouly J.L., Bassil S. - Second-look laparoscopy after laparoscopic cystectomy of large ovarian endometriomas. *Fertil. Steril.*, 58: 617-619, 1992.
- Canis M., Pouly J.L., Tamburro S., Mage G., Wattiez A., Bruhat M.A. - Ovarian response during IVF-embryo transfer cycles after laparoscopic ovarian cystectomy for endometriotic cysts of >3 cm in diameter. *Hum. Reprod.*, 16: 2583-2586, 2001.
- Cullen T. - The distribution of adenomyoma containing uterine mucosa. *Archs. Surg.*, 1: 215-283, 1920.
- Donnez J., Wyns C., Nisolle M. - Does ovarian surgery for endometriomas impair the ovarian response to gonadotropin? *Fertil. Steril.*, 78: 206-207, 2002.
- Exacoustos C., Zupi E., Amadio A., Szabolcs B., De Vivo B., Marconi D., Elisabetta Romanini M., Arduini D. - Laparoscopic removal of endometriomas: sonographic evaluation of residual functioning ovarian tissue. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 191: 68-72, 2004.
- Farquhar C., Sutton C. - The evidence for the management of endometriosis. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 10: 321-332, 1998.
- Garcia-Velasco J.A., Mahutte N.G., Corona J., Zúñiga V., Gilés J., Arici A., Pellicer A. - Removal of endometriomas before in vitro fertilization does not improve fertility outcomes: a matched, case-control study. *Fertil. Steril.*, 81: 1194-1197, 2004.
- Hart R., Hickey M., Maouris P., Buckett W., Garry R. - Excisional surgery versus ablative surgery for ovarian endometriomata: a Cochrane Review. *Hum. Reprod.*, 20: 3000-3007, 2005.
- Ho H.Y., Lee R.K., Hwu Y.M., Lin M.H., Su J.T., Tsai Y.C. - Poor response of ovaries with endometrioma previously treated with cystectomy to controlled ovarian hyperstimulation. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 19: 507-511, 2002.
- Hughesdon P. E. - The structure of endometrial cysts of the ovary. *J. Obstet. Gynaecol. Br. Emp.*, 64: 481-487, 1957.
- Maneschi F., Marasá L., Incandela S., Mazzarese M., Zupi E. - Ovarian cortex surrounding benign neoplasms: a histologic study. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 169: 388-393, 1993.
- Marconi G., Vilela M., Quintana R., Sueldo C. - Laparoscopic ovarian cystectomy of endometriomas does not affect the ovarian response to gonadotropin stimulation. *Fertil. Steril.*, 78: 876-878, 2002.
- Moore J., Copley S., Morris J., Lindsell D., Golding S., Kennedy S. - A systematic review of the accuracy of ultrasound in the diagnosis of endometriosis. *Ultrasound. Obstet. Gynecol.*, 20: 630-634, 2002.

- Nishida M., Watanabe K., Sato N., Ichikawa Y. - Malignant transformation of ovarian endometriosis. *Gynecol. Obstet. Invest.*, 50: 18-25, 2000.
- Nisolle M., Donnez J. - Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil. Steril.*, 68: 585-596, 1997.
- Sampson J. - Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 14: 422-469, 1927.
- Somigliana E., Infantino M., Benedetti F., Arnoldi M., Calanna G., Ragni G. - The presence of ovarian endometriomas is associated with a reduced responsiveness to gonadotropins. *Fertil. Steril.*, 86: 192-196, 2006.
- Tinkanen H., Kujansuu E. - In vitro fertilization in patients with ovarian endometriomas. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.*, 79: 119-22, 2000.
- Vercellini P., Vendola N., Bocciolone L., Colombo A., Rognoni M.T., Bolis G. - Laparoscopic aspiration of ovarian endometriomas. Effect with post-operative gonadotropin releasing hormone agonist treatment. *J. Reprod. Med.*, 37: 577-580, 1992.
- Yanushpolsky E.H., Best C.L., Jackson K.V., Clarke R.N., Barbieri R.L., Hornstein M.D. - Effects of endometriomas on oocyte quality, embryo quality and pregnancy rates in in vitro fertilization cycles: a prospective, case-controlled study. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 15: 193-197, 1998.
- Yazbeck C., Madelenat P., Sifer C., Hazout A., Poncelet C. - Ovarian endometriomas: Effect of laparoscopic cystectomy on ovarian response in IVF-ET cycles. *Gynecol. Obstet. Fertil.*, 34: 808-812, 2006.
- Wong B.C., Gillman N.C., Oehninger S., Gibbons W.E., Stadtmauer L.A. - Results of in vitro fertilization in patients with endometriomas: is surgical removal beneficial? *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 191: 597-606, 2004.

# Sugestão para a Revista?

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

# Maturação *In Vitro* de Oócitos Obtidos de Pacientes com a Síndrome dos Ovários Policísticos em Ciclos sem Estimulação Ovariana Controlada: Resultados Iniciais.

## *In Vitro* Maturation of Oocytes from Patients with Polycystic Ovarian Syndrome without Controlled Ovarian Stimulation. Preliminary Results.

**<sup>1</sup>Nilo Frantz, <sup>2</sup>Adriana Bos-Mikich,  
<sup>1</sup>Gerta Frantz, <sup>1</sup>Marcos Höher ,  
<sup>1</sup>Marcelo Ferreira**

<sup>1</sup>Centro de Pesquisa e Reprodução Humana Nilo Frantz, Porto Alegre, RS.

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

**Correspondência:** Profa. Dra. Adriana Bos-Mikich

Departamento de Ciências Morfológicas

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Av. Sarmiento Leite 500

Porto Alegre, RS

CEP: 90.050-170

Telefone: 051-33083599/ 33083146/ 051-93336767

Fax: 051-33083146

adriana.bosmikich@gmail.com

### RESUMO

O presente trabalho tem por objetivo descrever o primeiro relato nacional sobre maturação *in vitro* de oócitos obtidos de pacientes com a síndrome dos ovários policísticos, em ciclos sem estimulação ovariana controlada. Dez pacientes foram encaminhadas ao programa. Oócitos foram coletados de todas pacientes de folículos medindo 2 - 8 mm entre o 8º. e 10º. dia do ciclo. Não houve diferença significativa entre as taxas de oócitos que maturaram às 24 e às 48 horas pós-coleta, nem entre as taxas de fertilização nos dois grupos ( $p < 0.005$ ). Noventa e dois por cento ( $n=34$ ) dos oócitos fertilizados clivaram ao estágio de duas células, mas apenas 5 (13%) deles apresentaram clivagem precoce às 27 horas pós-inseminação. Todas as pacientes obtiveram embriões para transferência, mas a qualidade dos embriões, segundo critérios morfológicos e sua dinâmica de clivagem foi bastante pobre. Não obtivemos qualquer gestação nesta série de pacientes. Acreditamos que a metodologia uma vez aperfeiçoada, representa uma alternativa viável para pacientes portadoras da síndrome dos ovários policísticos.

**Palavras chave:** ovários policísticos, maturação *in vitro*

### SUMMARY

*The present work aims to describe the first national report on in vitro maturation of oocytes collected from patients with the polycystic ovarian syndrome in cycles with no controlled ovarian stimulation. Ten patients were enrolled in the program. Oocytes were collected from all patients from follicles with 2-8mm in diameter between the 8<sup>o</sup> and 10<sup>o</sup> day of the cycle. There wasn't any significant difference between the rates of oocyte maturation at 24 or 48 hours post collection or fertilization in the two groups ( $p < 0.005$ ). Ninety two percent of the fertilized oocytes ( $n=34$ ) cleaved to the 2-cell stage, but only 5 (13%) of them showed early cleavage at 27 hours post-insemination. All patients had embryos for transfer, however, the quality of the embryos, according to morphological criteria and their cleavage dynamics, was very poor in this study. We did not obtain any pregnancy in this series of patients. We believe that once the methodology has been improved, it represents a viable choice for patients with the polycystic ovarian syndrome.*

**Key words:** polycystic ovaries, in vitro maturation.

### INTRODUÇÃO

A maturação *in vitro* (IVM) de oócitos coletados a partir de ciclos não estimulados é uma tecnologia emergente que vem apresentando resultados bastante promissores em alguns centros de reprodução assistida mundiais. Apesar de a técnica estar apenas recentemente sendo explorada como uma

Recebido em 10/08/2007  
Avaliado e aceito em 04/10/2007

alternativa em reprodução humana, ela tem longa data em reprodução animal principalmente na pecuária, em bovinos (Blondin et al., 2002). As vantagens do emprego da maturação *in vitro* de oócitos humanos incluem a não necessidade do uso de hormônios estimuladores do crescimento folicular e bloqueadores da hipófise, além da ausência total do risco de hiperestímulo ovariano e suas consequências indesejáveis.

As principais recomendações de IVM são os casos de ovários policísticos, casais com fertilidade anterior comprovada ou casais com infertilidade não relacionada a fator feminino (Jurema & Nogueira, 2006). No caso de mulheres portadoras da síndrome dos ovários policísticos com distúrbios menstruais ou ovários policísticos com ciclos menstruais regulares, as vantagens da metodologia são evidentes: elas possuem um número considerável de folículos para serem puncionados e não correm o risco de sofrerem o hiper estímulo, bastante freqüente neste grupo de pacientes.

A maioria dos relatos sobre a experiência dos centros de reprodução humana com maturação *in vitro* de oócitos humanos refere-se à maturação e fertilização de oócitos imaturos obtidos juntamente com os gametas maduros, em metáfase II, em ciclos de estímulo ovariano controlado. Poucos centros têm-se dedicado a captura de oócitos em pacientes não estimuladas com gonadotrofinas exógenas, para maturação e fertilização *in vitro*. Por este motivo, os relatos de maturação e desenvolvimento embrionário *in vitro* após maturação de oócitos obtidos de folículos com diâmetro entre 2 e 8mm em ciclos não estimulados são escassos e evidenciam a busca dos pesquisadores da melhora dos resultados obtidos em termos de implantações e de gestações levadas a termo.

O Centro de Pesquisa e Reprodução Humana Nilo Frantz iniciou as primeiras coletas de oócitos imaturos em ciclos não estimulados em 2005, especificamente para pacientes portadoras da síndrome dos ovários policísticos. Neste relato descrevemos nossa experiência com esta metodologia emergente e discutimos os resultados em relação ao descrito na literatura enfatizando especialmente as características do desenvolvimento embrionário após maturação *in vitro* dos oócitos.

## MATERIAL & MÉTODOS

Dez pacientes, com idades entre 25 e 36 anos (média de 28,4 anos) portadoras da síndrome dos ovários policísticos foram encaminhadas para o programa de coleta de oócitos imaturos, sem qualquer estímulo hormonal durante a fase de crescimento folicular. Para inclusão das pacientes foram utilizados os critérios de Síndrome dos ovários policísticos do consenso de Rotterdam, publicados pelo grupo de Rotterdam ESHRE/ASRM (2004). Todas pacientes que concordaram participar do programa assinaram consentimento livre e esclarecido. Estas pacientes apresentavam diversos cistos foliculares pequenos entre 2 e 8mm de diâmetro, espalhados ao longo do córtex ovariano. As pacientes apresentavam ainda sintomas de hiperandrogenismo e/ou amenorréia ou oligomenorréia. Nenhuma das mulheres obteve gestação anterior ao tratamento e não respondiam adequadamente a estímulo ovariano induzido por citrato de clomifeno. As pacientes com amenorréia receberam acetato de medroxiprogesterona para induzir sangramento de privação. Todas as pacientes foram monitoradas por ultrassom no dia 2 do ciclo para assegurar a ausência de cistos ovarianos. Outra avaliação por ultrassom foi executada nos dias 7 ou 8 de maneira a excluir-se a presença de um folículo dominante. Os oócitos imaturos foram coletados entre o 8º e o 10º dia do ciclo, 36h após injeção de hCG (Ovidrel, Serono) utilizando-se uma agulha de 19-Gauge, especialmente desenhada pela fabricante Cook para aspiração de folículos imaturos, e pressão de sucção de 75 a 80 mmHg.

Os oócitos imaturos coletados foram isolados e incubados em placas contendo meio de maturação (Oocyte Maturation Medium, Sage, USA), já acrescido de fonte protéica e suplementado com 75UI de FSH, 75UI de LH (Menopour, Ferring, Suecia) a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> em atmosfera úmida por 24 ou 48 horas. Após as primeiras 24 horas de cultivo, os oócitos foram denudados pela exposição à hialuronidase (Sage) e avaliados para a ausência de vesícula germinativa e presença de primeiro corpúsculo polar. Os oócitos que atingiram o estágio de MII foram inseminados por ICSI, 3 a 4 horas após a denudação. Fertilização foi avaliada 18 horas após ICSI pela presença de dois pronúcleos. Os zigotos obtidos foram cultivados em meio Embryo Maintenance Medium (Sage) por 72 horas antes da transferência, quando a avaliação morfológica foi executada (Veeck, 1999) e os embriões com melhores índices foram transferidos para as pacientes.

Para o preparo do endométrio, as pacientes receberam valerato de estradiol oral (6mg), a partir do dia da coleta dos oócitos. Todas pacientes apresentaram endométrio de espessura igual ou superior a 7 mm, adequado à transferência no 2º. ou 3º. dia pós-inseminação sendo portanto o estágio de desenvolvimento dos embriões variável em uma mesma paciente. Suporte lúteo foi feito pela administração de progesterona micronizada (600mg/dia), a partir do dia da fertilização.

## RESULTADOS

Foi coletado um total de 111 oócitos, 11 em média por paciente. Deste total, 35.1% (39/111) atingiram o estágio de MII em 24 horas e outros 22.1% (25/111) atingiram o mesmo estágio em 48 horas de cultivo (P<0.005), perfazendo um total de 64 oócitos em MII (57% dos gametas coletados). Após ICSI, 51% (23/39) dos oócitos que atingiram MII em 24 horas e 48% (12/25) daqueles que atingiram MII em 48 horas apresentaram 2PN (P<0.005). Destes zigotos, 92% (34/37) clivaram ao estágio de 2 células. Apenas 5 embriões (13%), quatro de 24 horas de maturação e um de 48 horas de maturação, apresentaram clivagem precoce ao estágio de 2 células. Todas as pacientes obtiveram embriões para transferência. Foram transferidos 33 embriões no dia 2 ou 3 de desenvolvimento embrionário, sendo a média de 3,3 embriões por paciente. Apenas 4 pacientes obtiveram embriões no estágio de 7-8 células, no terceiro dia do desenvolvimento. A Tabela I apresenta um resumo das características dos dez ciclos de coleta, maturação *in vitro* e transferência realizados nesta série de pacientes. Nenhum embrião foi classificado como grau I, apenas 6 embriões (18%) obtiveram classificação GII, sendo os restantes todos classificados como GIII, GIV ou GV, portadores de fragmentos e irregularidades dos blastômeros. Não houve congelamento de embriões excedentes. Não obtivemos gestação neste grupo de pacientes.

**Tabela I** - Características da fertilização e desenvolvimento embrionário pós-maturação *in vitro* de oócitos coletados em ciclos sem estímulo ovariano controlado.

	N	%	Média/ paciente	Variação
Ciclos com oócitos imaturos	10			
Número total de oócitos	111		11	3-19
24h maturação				
Oócitos em MII (% do total)	39	35.1	3.9	0-6
Oócitos fertilizados	23	51	2.3	0-6
Fertilizados anormais	1	4		
Clivagem precoce	4	17		0-4

48h maturação				
Oócitos em MII (% do total)	25	22.5		0-7
Oócitos fertilizados	12	48	1.2	0-7
Clivagem precoce	1	9		
Transferência dos embriões				
Ciclos com embriões para transferência	10			

## DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram que a coleta, maturação e fertilização *in vitro* de oócitos obtidos a partir de ciclos utilizando apenas a gonadotrofina coriônica anterior à coleta é um procedimento factível para o tratamento de infertilidade em pacientes com ovários policísticos. Esta metodologia evita a hiperestimulação ovariana e os riscos e custos associados a ela. A prevalência de hiperestímulo especialmente em pacientes jovens portadoras de síndrome dos ovários policísticos pode ser de até 6% (MacDougall et al., 1993; Brisden et al., 1995). Embora diversas estratégias tenham sido criadas para prevenir e evitar esta complicação, nenhuma delas é inquestionavelmente segura. O único método confiável é evitar a estimulação com FSH (Orvieto, 2005).

Desde o trabalho pioneiro de Cha e colegas em 1991, diversos estudos em diferentes centros descreveram o uso da maturação *in vitro* de oócitos coletados em ciclos não estimulados (Tounson et al., 1994; Tan & Child, 2002; Cha et al., 2000; Chian et al., 2000; Child et al., 2001; Mikkelsen & Lindenberg, 2001; Lê Du et al., 2005; Al-Sunadi et al., 2007; Ge et al., 2007). Ao nosso entender, esta é a primeira descrição do mesmo processo realizado no Brasil, especificamente para pacientes portadoras da síndrome dos ovários policísticos.

A média de 11 oócitos coletados por pacientes neste estudo está bastante próxima aos resultados apresentados em trabalhos anteriores (Tounson et al., 1994; Cha et al., 2000; Child et al., 2001; Lin et al., 2003; Cha et al., 2005; Lê Du et al., 2005; Al-Sunadi et al., 2007), apesar de ser mais baixa que relatos mais recentes (Ge et al., 2007). Cinquenta e sete por cento dos oócitos coletados imaturos atingiram o estágio de metafase II após 24 ou 48 horas de cultura indicando capacidade de maturação nuclear *in vitro* comparável a resultados publicados anteriormente (Lê Du et al., 2005; Vlaisavljević et al., 2006; Ge et al., 2007). O presente estudo utilizou hCG, 36 horas antes da coleta dos oócitos. Assunto ainda controverso, alguns estudos (Chian et al., 2000; Son et al., 2002; Lê Du et al., 2005; Son et al., 2007) demonstram taxas mais elevadas de desenvolvimento embrionário e gestações, a partir do uso de hCG (10.000IU) antes da coleta dos gametas. Por outro lado, quando a qualidade dos embriões foi analisada em relação à multinucleação e fragmentação dos blastômeros, o grupo de pacientes que recebeu hCG antes da coleta apresentou taxas significativamente inferiores destes parâmetros comparado com o grupo que não recebeu hCG (Vlaisavljević et al., 2006).

Dentre os zigotos obtidos neste estudo, o desenvolvimento embrionário até o dia 2 foi bastante satisfatório no sentido de que apenas 3 zigotos apresentaram bloqueio de desenvolvimento inicial, um fenômeno esperado com certa frequência quando da maturação *in vitro*, devido à interrupção do crescimento e desenvolvimento *in vivo* da estrutura folicular e do oócito nela contido (Tounson, 2001). Entretanto, a qualidade dos embriões clivados ao terceiro dia foi bastante pobre. Dentre os 33 embriões transferidos às 10 pacientes, nenhum foi classificado como grau I. A grande maioria dos embriões transferidos apresentou atraso no desenvolvimento, diferentes graus de fragmentação

e blastômeros não homogêneos, além de apresentarem baixo índice de clivagens precoces comparados a embriões de ciclos estimulados (Bos-Mikich, 2001). Único trabalho anterior que também menciona sobre a baixa qualidade morfológica dos embriões de IVM foi do grupo francês de Lê Du e colaboradores (2005). Tais características provavelmente estejam relacionadas com alterações cromossômicas incompatíveis com desenvolvimento embrionário e implantação, geradas durante o processo de maturação *in vitro*. Esta situação ganhou relevância a partir do estudo utilizando microscopia confocal do fuso metafásico e a constituição cromossômica de oócitos maturados *in vitro* (Li et al., 2005). Estes gametas apresentaram um índice de anomalias do fuso e de configuração dos cromossomos cerca de três vezes superior aos oócitos maturados *in vivo*. Trabalho ainda mais recente confirmou o retardo no desenvolvimento e o elevado índice de anomalias cromossômicas em embriões gerados a partir de oócitos maturados *in vitro* em presença ou não do esterol estimulador da meiose presente no fluido folicular (Lundin et al., 2007).

Visto que o sucesso da maturação *in vitro* é profundamente dependente das condições de cultivo (Chian, 2004), o grande desafio para a aplicação rotineira da IVM em reprodução humana é identificar e controlar as variáveis ambientais que certamente estão influenciando na qualidade dos embriões produzidos e conseqüentemente na dificuldade em obtermos gestações, a partir destes embriões. Interessante notar que, com exceção de um trabalho em que a média de embriões transferidos por paciente foi de 1,6 (Sönderström-Anttila et al., 2005), a maioria dos estudos relata a transferência de um número elevado de embriões, de 3 a 6 (Cha et al., 2005; Al-Sunadi et al., 2007; Ge et al., 2007), em um momento em que há uma tendência mundial para a transferência de uma menor quantidade embrião nas pacientes de IVF/ICSI de ciclos estimulados. Por outro lado, muito pouco ainda é conhecido sobre os fatores envolvidos na maturação citoplasmática, que são acumulados no oócito durante o crescimento folicular e que serão responsáveis pelo desenvolvimento embrionário e fetal subsequente.

Provavelmente, as condições atuais de IVM não estão permitindo a completa aquisição de competência citoplasmática dos oócitos, enquanto que a competência nuclear é relativamente fácil de ser alcançada. Certamente, fatores extrínsecos ao gameta imaturo, do sistema de coleta e cultivo, originalmente desenvolvidos para oócitos maduros pré-ovulatórios podem estar afetando a competência destes gametas a se desenvolverem e atingirem uma gestação. Um exemplo desta situação é dado pelo trabalho recente de Hashimoto e colaboradores (2007), o qual mostrou que em um programa de IVM, oócitos coletados com uma agulha de 20 G e pressão de 180mmHg tem significativamente melhor desenvolvimento embrionário e atingem número significativamente maior de gestações, do que aqueles coletados com vácuo de 300mmHg. Entretanto, semelhante ao estudo de Ge e colaboradores (2007) que, como nós, utilizaram pressão entre 75 e 80mmHg, com excelentes resultados de desenvolvimento embrionário e gestações, acreditamos que esta medida de sucção é apropriada para a coleta de oócitos imaturos em pacientes com ovários policísticos. Outro fator que também deve estar contribuindo para as baixas taxas de sucesso de ciclos de IVM em termos de implantações e nascimentos, é a não-sincronia inerente do processo, entre as etapas de maturação citoplasmática e nuclear (Tounson, 2001; Combelles et al., 2002; Lanzendorf, 2006).

## CONCLUSÃO

Em conclusão, vários trabalhos têm demonstrado que oócitos humanos maturados *in vitro* não tem a mesma capacidade de desenvolvimento que aqueles coletados de folículos maduros. Entretanto, esta é uma tecnologia ainda experimental apresentando resultados não plenamente favoráveis em todos os centros procurando estabelecer a tecnologia. Pode-se assumir que os eventos fundamentais da maturação para que o gameta adquira sua total competência de desenvolvimento não ocorram de forma apropriada durante o processo *in vitro*. Mais estudos são necessários para determinar quais adequações ao sistema de coleta e de cultivo são necessárias de maneira a tornar a maturação *in vitro* mais bem sucedida, em diferentes centros de reprodução assistida mundiais. Certamente, a experiência de um número maior de casos de IVM nos fornecerá os elementos necessários para aprimoramentos da metodologia.

Apesar de suas limitações, acreditamos que a oferta e aplicação de IVM para pacientes cientes e esclarecidas sobre o procedimento e suas limitações têm o potencial de oferecer a um grupo seleto de pacientes, chances de gestação em ciclos não estimulados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Al-Sunaidi M., Tulandi T., Holzer H., Sylvestre C., Chian R.C., Tan S.L. - Repeated pregnancies and live births after in vitro maturation treatment Fertil Steril 87: 1212e9-1212e12, 2007.
- Blondin P., Bousquet D., Twagiramungu H., Barnes F., Sirard M.A. - Manipulation of Follicular Development to Produce Developmentally Competent Bovine Oocytes. Biol. Reprod. 66: 38-43, 2002.
- Bos-Mikich A., Mattos A.L.G., Ferrari A.N. - Early cleavage of human embryos an effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome. Hum Reprod 16: 2858-2861, 2001.
- Brisden P., Wada I., Tan S.L., Balen A., Jacobs H.S. - Diagnosis, prevention and management of ovarian hyperstimulation syndrome. Br J Obstet Gynecol 102: 767-772, 1995.
- Cha K., Koo J.J., Choi D.H., Han S.Y., Yoon T.K. - Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from non stimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. Fertil Steril 55: 109-113, 1991.
- Cha K.Y., Han S.Y., Chung H.M., Choi D.H., Lim J.M., Lee W.S. - Pregnancies and deliveries after in vitro maturation culture followed by in vitro fertilization and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 73: 978-983, 2000.
- Cha K.Y., Chung H.M., Lee D.R., Kwon H., Chung M.K., Park L.S., Choi D.H., Yoon T.K. - Obstetric outcome of patients with polycystic ovary syndrome treated by in vitro maturation and in vitro fertilization-embryo transfer. Fertil Steril 83: 1461-1465, 2005.
- Chian R.C., Buckett W.M., Tulandi T., Tan S.L., Prospective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. Hum Reprod 15: 165-170, 2000.
- Chian R.C. - In vitro maturation of immature oocytes for infertile women with PCOS. Reprod Biomed Online 8: 547-552, 2004.
- Child T.J., Abdul-Jalil A.K., Gulekli B., Tan S.L. - In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated normal ovaries, polycystic ovaries, and women with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 76: 936-942, 2001.
- Combelles C.M., Cekleniak N.A., Racowsky C., Albertini D.F. - Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes. Hum Reprod 17: 1006-1016, 2002.
- Ge H.-S., Huang X.-F., Zhang W., Zhao J.-Z., Lin J.-J., Zhou W. - Exposure to human chorionic gonadotropin during in vitro maturation does not improve the maturation rate and developmental potential of immature oocytes from patients with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril, (2007) doi:10.1016/j.fertnstert.2007.02.021.
- Hashimoto S., Fukuda A., Murata Y., Kikkawa M., Oku H., Kanaya H., Sonoda M., Sugihara K., Murata T., Nagata F., Nakaoaka Y., Morimoto Y. - Effect of aspiration vacuum on the developmental competence of immature human oocytes retrieved using a 20-gauge needle. Reprod Biomed Online 14: 444-449, 2007.
- Jurema M.W., Nogueira D. - In vitro maturation of human oocytes for assisted reproduction. Fertil Steril 86: 1277-1291, 2006.
- Lanzendorf S.E. - Developmental potential of in vitro- and in vivo-matured human oocytes collected from stimulated and unstimulated ovaries. Fertil Steril 85: 836-837, 2006.
- Le Du A., Kadoch I.J., Bourcigaux N., Doumerc S., Bourrier M-C, Chevalier N., Fanchin R., Chian R.-C., Tachdjian G., Frydman R., Frydman N. - In vitro oocyte maturation for the treatment of infertility associated with polycystic ovarian syndrome: the French experience. Hum Reprod 20: 420-424, 2005.
- Li Y., Feng H.-L., Cao Y.-J., Zheng G.-J., Yang Y., Mullen S., Critser J.K., Chen Z.-J. - Confocal microscopic analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes matured in vitro. Fertil Steril 85: 827-832, 2005.
- Lin Y.H., Hwang J.L., Huang L.W., Mu S.C., Seow K.M., Chung J. - Combination of FSH priming and hCG priming for in-vitro maturation of human oocytes. Hum Reprod 18: 1632-1636, 2003.
- Lundin K., Ziebe S., Bergh C., Loft A., Selleskog U., Nilsson L., Grondahl C., Arse J.-C. - Effect of rescuing donated immature human oocytes derived after FSH/hCG stimulation following in vitro culture with or without Follicular Fluid Meiosis Activating Sterol (FF-MAS)-an embryo chromosomal and morphological analysis. J Assist Reprod Genet. 24:87-90, 2007.
- MacDougall, M.J., Tan S.L., Balen A., Jacobs H.S. - Controlled study comparing patients with and without polycystic ovaries undergoing in-vitro fertilization, Hum Reprod 8: 233-237, 1993.
- Mikkelsen A., Lindenberg S. - Benefit of FSH priming of women with PCOS to the in vitro maturation procedure and the outcome: a randomized prospective study. Reproduction 122: 587-592, 2001.
- Orvieto, R. Can we eliminate severe ovarian hyperstimulation syndrome?, Hum Reprod 20: 320-322, 2005.
- Rotterdam ESHRE-ASRM/sponsored PCOs consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long term health risks related to polycystic ovarian syndrome (PCOS). Hum Reprod 19: 41-47, 2004.
- Son W.-Y., Yoon S.-H., Lee S.-W., Ko Y., Yoon H.-G., Lim J.-H. - Blastocyst development and pregnancies after IVF of mature oocytes retrieved from unstimulated patients with PCOS after in-vivo hCG priming: Case report. Hum Reprod 17: 134-136, 2002.
- Son W.-Y., Lee S.-Y., Yoon S.-H., Lim J.-H. - Pregnancies and deliveries after transfer of human blastocysts derived from in vitro matured oocytes in in vitro maturation cycles Fertil Steril 87: 1491-1493, 2007.
- Sönderström-Anttila V., Mäkinen S., Tuuri T., Suikkari A.M. - Favorable pregnancy results with insemination of in vitro matured oocytes from unstimulated patients. Hum Reprod 20: 1534-1540, 2005.
- Tan S.L., Child T.J. - In vitro maturation of oocytes from unstimulated polycystic ovaries. Reprod Biomed Online 4: 18-23, 2002.
- Trounson, A., Wood, C., Kausche, A. - In vitro maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. Fertil. Steril. 62: 353-362, 1994.
- Trounson A., Anderiesz C., Jones G. - Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. Reproduction 121:51-75, 2001.
- Veeck, L (ed) Atlas of the human oocyte and early conceptus. Vol.2 Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 1999.
- Vlaisavljević V., Čížek-Sajko M., Kovac V. - Multinucleation and cleavage of embryos derived from in vitro-matured oocytes. Fertil Steril 86: 487-489, 2006.

CÓDIGO 12

## Preocupações Sobre Infertilidade nos Pacientes Antes de Realizarem Vasectomia na Clínica Privada

Autor principal:

**Fabio Firmbach Pasqualotto**

Co-autores:

**Pasqualotto, E.B.; Iaconelli JR, A.;  
Salvador, M.; BONETTI, T.C.S.;  
Borges JR, E.**

Instituição dos autores:

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul - RS; CONCEP-TION - Centro de Reprodução Humana, Caxias do Sul - RS; Fertility - Centro de Fertilização Assistida, São Paulo - SP; Associação Instituto Sapientiae - Centro de Estudos e Pesquisa, São Paulo - SP

### OBJETIVO

Avaliar as razões pelas quais os pacientes são submetidos à vasectomia, preocupações quanto a fertilidade futura e criopreservação seminal.

### MÉTODO

Cinquenta homens consecutivos que foram submetidos a cirurgia de vasectomia para esterilização voluntária foram avaliados no período de março de 2003 a março de 2006. Os pacientes foram questionados quanto as razões para serem submetidos a vasectomia e suas preocupações quanto a fertilidade futura e criopreservação seminal antes do procedimento de esterilização.

### RESULTADOS

62% consideraram procedimento simples e seguro, 30% é um procedimento melhor para o parceiro, 4% - consideraram o

aspecto econômico, e 4% uma boa alternativa quanto aos contraceptivos orais (sabidamente mais caros a longo-prazo). 60% consideraram a informação sobre a criopreservação de espermatozoides antes da vasectomia de grande utilidade, enquanto que 40% dos pacientes disseram não ser importante esta informação. Apenas 70% disseram que iriam avaliar a possibilidade de criopreservar o sêmen se estivesse disponível tal serviço. Quando foram questionados sobre preocupações sobre fertilidade futura, 90% disseram que não tinham e 10% disseram que tinham preocupação sobre o seu futuro fértil.

### CONCLUSÕES

A maioria dos homens que são submetidos à cirurgia de vasectomia a faz por ser extremamente fácil. Além disso, a maioria dos homens disseram não ter preocupações sobre a fertilidade futura. Finalmente, 42% irão criopreservar o sêmen caso lhe sejam oferecido a oportunidade.

CÓDIGO 15

## Sexagem Fetal a Partir de Plasma Materno

Autor principal:

**Flávia Cappello Donabela**

Co-autores:

**Araújo, A.; Ferriani, R.A.; Galerani,  
M.A.; Ramos, E.S.**

Instituição dos autores:

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP; Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP;

### OBJETIVO

Os objetivos deste trabalho foram: (1) Detectar a presença de sequência Y-específica de fetos masculinos em sangue materno; (2) Comparar a presença/ausência da sequência com o sexo fenotípico fetal ou do recém-nascido.

### MÉTODO

Foram coletados sangue periférico em tubos PPT (Plasma Preparation Tube) de 91 pacientes, sendo 38 gestantes de FIV e ICSI e 53 pacientes de gestação natural, em períodos diferentes da gravidez (de duas à vinte e três semanas de gestação) para extração de DNA e utilização da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação de sequência do gene TSPY. O DNA do feto foi extraído a partir do plasma da mãe. Foi realizada uma reação de Nested PCR para o gene TSPY e uma PCR simples para o gene controle (?-globina). Todas as reações foram repetidas pelo menos três vezes.

### RESULTADOS

O sexo fenotípico do feto ou recém-nascido (RN) foi avaliado em 61 casos através de ultrassonografia ou exame físico, respectivamente. Foi confirmado o sexo masculino em todas as 32 gestações com resultados positivos para o cromossomo Y e o sexo feminino em 28 de 29 negativos. Não houve falso-positivos (0%) e apenas um falso-negativo (1,6%).

### CONCLUSÕES

Este trabalho servirá para a posterior implantação desta técnica na sexagem precoce em casos de doenças ligadas ao cromossomo X e no tratamento intra-útero de Hiperplasia Adrenal Congênita. Embora o presente estudo esteja focado na sexagem, esta técnica poderá ser estendida futuramente à pesquisa de várias doenças.

Código 17

## Limitar o Número de Oócitos Fertilizados *In Vitro* Pode Diminuir as Chances de Sucesso nos Casos de Fator Masculino Grave.

**Autor principal:**

**Sidney Verza Jr**

**Co-autores:**

**Schneider, D.T.; Esteves, S.C.**

**Instituição dos autores:**

Androfert - Centro de Referência em Reprodução Masculina, Campinas

### OBJETIVO

Leis de regulamentação das técnicas de reprodução assistida (TRA) têm sido introduzidas (Itália) ou encontram-se em discussão em alguns países (Brasil). O objetivo é limitar o número de oócitos a serem fertilizados por fertilização *in vitro* (FIV-ICSI). O objetivo deste estudo foi comparar as taxas de nascidos vivos após a ICSI utilizando espermatozoides de homens com vários graus de defeito da espermatogênese, e estimar o número de oócitos a ser injetados necessários para obter um nascido vivo nestes casos.

### MÉTODO

Este estudo incluiu 626 ciclos de ICSI realizados de Jan/02 a Dez/05. Os ciclos foram divididos em 6 grupos, de acordo com a fonte e a qualidade do espermatozoide: Azoospermia não obstrutiva (ANO, G 1, n=67); azoospermia obstrutiva (AO, G 2, n=66); ejaculado com um único defeito (oligo ou asteno ou teratozoospermia, G 3, n=124); duplo defeito, (G 4, n=105); triplo defeito (G 5, n=96) e normal (espermatozoides ejaculados sem alteração, G 6, n=168). Taxas de nascidos vivos

foram comparadas entre os grupos e o número de oócitos injetados por nascido vivo foi calculado.

### RESULTADOS

Idade feminina e número de embriões transferidos não foram diferentes entre os grupos. Taxas de nascidos vivos foram significativamente inferiores na ANO e nos grupos defeito único e duplo em comparação aos demais grupos (26,8%, 27,9%, 26,5% vs. 44,0%, 31,2% e 32,3%, grupos 2, 5 e 6, respectivamente). Para obter um nascido vivo, consideravelmente mais oócitos injetados (~40%-50%) são necessários na ANO (38,8) e nos grupos com defeito espermático (33, 31 e 29,6, grupos 3, 4 e 5) comparados aos grupos AO (20,5) e normal (25,6).

### CONCLUSÕES

Leis restritivas que limitem o número de oócitos a ser fertilizados *in vitro* podem reduzir potencialmente a capacidade de homens com fator masculino grave, especialmente aqueles com azoospermia não obstrutiva, a terem seus próprios filhos biológicos.

Código 22

## Avaliação do Fuso Meiótico de Oócitos Bovinos Submetidos a Pré-maturação *In Vitro* na Presença de Butirolactona I, um Inibidor de Retomada Prematura da Meiose.

**Autor principal:**

**Elisa Melo Ferreira**

**Co-autores:**

**Vireque, A.A.; Adona, P.; Ferriani, R.A.; Navarro, P.A.A.S.**

**Instituição dos autores:**

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/USP

### OBJETIVO

Dentre as principais limitações que impedem o uso rotineiro da maturação *in vitro* (MIV) na Reprodução Assistida humana, podemos citar a assincronia entre maturação nuclear e citoplasmática e, possivelmente, lesões no fuso meiótico oocitário. Sendo assim, investigamos a morfologia do fuso meiótico e distribuição cromossômica de oócitos bovinos submetidos à pré-maturação com butirolactona I, um potente inibidor da retomada prematura da meiose e, posteriormente maturados *in vitro*.

### MÉTODO

Oócitos bovinos imaturos (n = 472) foram divididos em três grupos: 1) controle (n = 198), submetidos a 24 horas de MIV em TCM-199; 2) grupo 2 (n = 82), pré-maturação com o inibidor farmacológico butirolactona I, por 24 horas e indução da MIV em TCM-199 por 18 horas; 3) grupo 3 (n = 192), pré-maturação com butirolactona I, por 24 horas e indução da MIV em TCM-199 por 24 horas. Após MIV, os oócitos foram corados por imunofluorescência e observados quanto à morfologia do fuso e distribuição cromossômica. Para uma

melhor acurácia das análises, consideramos apenas os fusos fixados em visão lateral.

## RESULTADOS

A inibição da maturação nuclear ocorreu em 88,8% dos oócitos cultivados na presença de butirolactona I. As taxas de maturação foram similares entre os três grupos (78,3%; 69,51% e 81,25%, respectivamente, para os grupos 1, 2 e 3). Observamos 82,6% de fusos em MII normais no grupo controle. A exposição à butirolactona I após 24 h, seguida por 18h ou 24h de MIV, resultou, respectivamente, em 79,5% e 80,3% de fusos em MII normais. Assim, a incidência de ano-

malias meióticas, caracterizada por disrupção cromossômica e/ou cromossomos desalinhados, não diferiu entre os grupos (17.4%; 20.5% e 19.7%), respectivamente, para os grupos 1, 2 e 3. ( $P < 0,05$ ) (Teste do qui-quadrado).

## CONCLUSÕES

Os resultados indicam que a butirolactona I inibe efetivamente a retomada prematura da meiose, sem provocar efeitos deletérios na formação do fuso meiótico oocitário após a maturação in vitro. Novos estudos são necessários para se avaliar os efeitos da butirolactona I sobre outros aspectos da maturação in vitro de oócitos.

### CÓDIGO 26

## A Eficácia de 2 Diferentes Protocolos de Estímulo em Ciclos com Antagonistas de GNRH em Pacientes Acima de 35 Anos.

### Autor principal:

**Maria do Carmo Borges de Souza**

### Co-autores:

**Henriques, CA; Mancebo, ACA;  
Rocha, CA; Neves, HC**

### Instituição dos autores:

G&O Barra – Ginecologia e Obstetrícia da Barra – Rio de Janeiro – RJ; Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) – Instituto de Ginecologia – RJ

## OBJETIVO

Comparar a eficácia de dois diferentes protocolos de estímulo ovariano para FIV/ICSI, em ciclos com antagonistas de GnRH em pacientes acima de 35 anos.

## MÉTODO

Estudo observacional, prospectivo, compara 2 protocolos com antagonistas. ICSI à fresco, não-doadoras, > 35 anos: A: 41 pacientes/48 ciclos, estímulo contínuo rFSH + uFSH (2:1); Grupo B: 35 pacientes/37 ciclos, estímulo com rFSH+ uFSH, reduzindo rFSH no início do antagonista, associado a 200UI uHCG/dia. Todas usaram estradiol 4mg/dia, a partir do 21º dia do ciclo prévio por 7 dias. Monitorização transvaginal a partir do dia 2. Iniciado antagonista com folículo >14mm. Quando pelo menos 1 folículo >18mm e 2 >16mm, administrado rHCG. Desfechos primários: nº oócitos MII e taxa de gravidez clínica

## RESULTADOS

Os grupos foram comparáveis em relação à idade (A- 38,14 e B 38,67) ao IMC (A- 23,72 e B- 23,47) e perfil hormonal (FSH: A- 7,14 e B- 5,88; E2: A- 79,1 e B- 72,49). Não houve diferença significativa entre os grupos quanto ao nº de oócitos aspirados 5,59 vs 6,07; nº de oócitos MII, 3,22 vs 4,00; Taxa de fertilização: 76,02 versus 77,59; taxa de gravidez por transferência: 36% (16/44) vs 35% (12/34); taxa de gravidez por ciclo iniciado 32% (16/49) vs 30% (12/40). Os dias de estímulo apresentaram diferença significativa entre os grupos (A- 10,68 e B- 9,47), e da mesma forma a dose total de FSH utilizada (A- 3038,55 e B- 2325). Houve cancelamentos (A- 10,5 e B- 2,5%) e SHO (A- 2 e B 5%).

## CONCLUSÕES

Os antagonistas de GnRH na prática clínica estão associados a protocolos simples, com menor dosagem de gonadotrofinas, ainda menor quando do uso do hCG fracionado, tem custos reduzidos, pouco cancelamento e não apresentam maior incidência de SHO em relação ao esperado.

# Sugestão para a Revista?

**E-mail: [jornalsbra@cmb.com.br](mailto:jornalsbra@cmb.com.br)**

CÓDIGO 27

## Influência das Células do Cumulus Expostas ao Hormônio Luteinizante (LH) Exógeno Durante a Estimulação Ovariana no Desenvolvimento de Embriões Humanos e Resultados da ICSI

**Autor principal:**

**Sandro Cassiano Esteves**

**Co-autores:**

**Pedro Augusto Monteleone, Sidney Verza Jr, Alecsandra P Gomes, Andrea Crepaldi**

**Instituição dos autores:**

Androfert - Centro de Referência em Reprodução Masculina, Campinas, SP ; Clínica Monteleone, São Paulo

### OBJETIVO

Tem sido sugerido que o LH exógeno seria materializado via células do cumulus durante as primeiras horas de inseminação na fertilização in vitro clássica (FIV). No entanto, na injeção intracitoplasmática do espermatozóide (ICSI) as células do cumulus são removidas do oócito antes da microinjeção. Para verificar se a atividade do LH via células do cumulus é benéfica na ICSI, este estudo avaliou a incubação dos oócitos com as células do cumulus, expostas ou não ao LH exógeno durante a estimulação ovariana, analisando o desenvolvimento embrionário e os resultados da ICSI.

### MÉTODO

Estudo prospectivo envolvendo quatrocentos ciclos de ICSI, randomizados de acordo com a droga utilizada durante a estimulação ovariana (FSH puro, r-hFSH, Gonel F ou FSH+LH, HP-hMG, Menopur). Cada grupo foi dividido em dois subgrupos, sendo em um subgrupo as células do cumulus removidas imediatamente após a recuperação oocitária e no outro mantidas intactas por um

período de 3 horas antes da microinjeção. Foram comparados desenvolvimento embrionário e resultados da ICSI.

### RESULTADOS

Não houve diferença entre os grupos HP-hMG e r-hFSH em relação às taxas de fertilização, embriões de boa qualidade, gravidez clínica e nascidos vivos. Somente a dose total de gonadotrofina usada durante a estimulação ovariana diferiu significativamente entre os grupos, sendo mais elevada no grupo HP-hMG (~2.600 vs ~2.250 UI), independente da incubação com células do cumulus intactas ou removidas.

### CONCLUSÕES

Nossos dados sugerem que a atividade do LH exógeno durante a estimulação ovariana não teve impacto significativo no desenvolvimento embrionário e resultados da ICSI. A pré-incubação dos oócitos com as células do cumulus intactas antes da microinjeção não resulta em benefícios, independente do uso do LH durante a estimulação ovariana.

CÓDIGO 28

## Estudo Comparativo por Período com Relação à Taxa de Gravidez por Aspiração Segundo a Categoria Diagnóstica e a Idade da Mulher Submetida às Técnicas de Reprodução Humana Assistida (RHA).

**Autor principal:**

**Marcio Augusto Buffolo**

**Co-autores:**

**Berni, M.A.; Garcia, M.C.P.; Taloni, F.D.**

**Instituição dos autores:**

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul UFMS - Campus de Três Lagoas- Departamento de Ciências Biológicas

### OBJETIVO

Este trabalho tem por objetivo realizar uma análise bibliográfica em dados referentes às categorias diagnósticas da indicação aos procedimentos em reprodução humana assistida e taxa de gravidez e compará-los ao longo dos anos de 1999 a 2004 correlacionando – os com a idade da mulher.

### MÉTODO

Foram consultados os dados reportados a REDLARA (Rede Latino Americana de Reprodução Assistida) e comparadas as indicações de 3809 casos em 1999, 3605 casos em 2000, 3982 casos em 2001, 3272 casos em 2002, 3767 casos em 2003 e 5299 casos em 2004 onde esses dados foram sepa-

rados por categoria diagnóstica, idade da mulher, taxa de gravidez e evolução ao longo do período para um possível acompanhamento dos casos e junto a isso, foi aplicado o teste de significância para saber a qual nível de evolução para prognósticos futuros.

## RESULTADOS

Em 6 anos, a taxa de gravidez (T.G.) em mulheres com problemas tubários aumentou em média 6,5% ao ano e os outros problemas femininos, como endometriose, variaram 2,1 % aa. As T.G. devido a problemas masculinos cresceram 10,4% aa e um certo equi-líbrio nas taxas onde o problema é múltiplo, 1,01% aa. Causas inexplicáveis tiveram um aumento de cerca de 2,65% ao ano. No mesmo período, em relação a idade, a T.G. em cada categoria foi maior em mulheres > 35 anos em relação à mulheres < 40 anos, e quando comparado estas com de mesma idade que engravidaram naturalmente,

a T.G. se reduz praticamente à metade, em torno de 18% de implantação, enquanto que na po-pulação em geral, a T.G. é de 35%.

## CONCLUSÕES

De acordo com os dados apresentados, podemos concluir que com a melhoria das técnicas de reprodução humana assistida, e principalmente com a evolução das punções do epidídimo (TESE), biópsia testicular e capacitação espermática, aliados a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), as taxas de gravidez em mulheres onde a ordem do problema é masculina vem aumentando consideravelmente, junto com técnicas que garantam as mulheres condições de terem filhos mesmo com problemas no aparelho reprodutor. Porém, mulheres com mais de 40 anos continuam a ter dificuldade de engravidar e mesmo com as técnicas avançadas, a evolução dos índices de implantação não passou de 7,01%.

## CÓDIGO 46

# Eficiência na Recuperação de Espermatozoides Móveis Utilizando dois Métodos de Processamento em Gradiente Descontínuo de Densidade

### Autor principal:

**Vera Lucia Lângaro Amaral**

### Co-autores:

**Cordini, M; Frajblat, M; Sanches, F.C.**

### Instituição dos autores:

LBR- Laboratório de Biotecnologia da Reprodução/ UNIVALI-SC; Procriar- Centro de Fertilização Assistida/ Blumenau-SC

## OBJETIVO

Técnicas de processamento seletivo de sêmen são utilizadas regularmente em Clínicas de RHA e modificações devem ser realizadas na tentativa de melhorar a eficiência da técnica. Objetivo deste trabalho foi avaliar duas metodologias de processamento seminal utilizando o gradiente descontínuo de densidade Puresperm® (Cook, Qld, Austrália)

## MÉTODO

O ejaculado de 5 indivíduos foi avaliado para motilidade e concentração e dividido em duas frações iguais e submetidos a dois processamentos: 1) a primeira fração (2 - 3 mL) foi depositada sobre um gradiente descontínuo de densidade com duas camadas: 80 e 40% (1mL cada); 2) a segunda fração foi

dividida em volumes iguais de aproximadamente 1 mL e depositados sobre gradientes iguais ao anterior. As amostras foram processadas por centrifugação e posteriormente analisadas.

## RESULTADOS

Foi observado um aumento de 18% na concentração de espermatozoides móveis no processamento 1.

## CONCLUSÕES

Apesar da recomendação do uso de 1:1 de sêmen com o gradiente descontínuo, os resultados preliminares deste estudo indicam que é possível o uso de uma maior quantidade de amostra seminal, inclusive com a possibilidade de aumento na recuperação de espermatozoides móveis.

# Sugestão para a Revista?

**E-mail: [jornalsbra@cmb.com.br](mailto:jornalsbra@cmb.com.br)**

Código 58

# Maturação *In Vitro* (IVM) de Oócitos Obtidos de Pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos em Ciclos sem Estimulação Ovariana: Resultados Iniciais.

**Autor principal:**

**Nilo Frantz<sup>1</sup>**

**Co-autores:**

**Adriana Bos-Mikich, <sup>2</sup>; Gerta Frantz, <sup>1</sup>;  
Norma P. Oliveira<sup>1</sup>; Marcelo Ferreira<sup>1</sup>.**

**Instituição dos autores:**

<sup>1</sup>Centro de Pesquisa e Reprodução Humana Nilo Frantz, Porto Alegre-RS

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS

## OBJETIVO

Há maior experiência descrita na literatura de IVM de oócitos que tiveram estimulação hormonal. No entanto, há um grupo de pacientes, especialmente as com ovários policísticos (SOP) que podem se beneficiar com a IVM sem indução da ovulação. Neste relato, descrevemos nossa experiência com a IVM sem estimulação ovariana.

## MÉTODO

Dez pacientes com SOP foram selecionadas. Os oócitos foram coletados entre o 10º e 13º dia com agulha 19-gauge e lúmen duplo. Os oócitos, isolados e incubados com meio (Oocyte Maturation Medium, Sage) com 75UI de HMG a 37º, 5% CO<sub>2</sub> por 24 ou 48 h. Após 24h, foi avaliada a ausência de VG e presença de primeiro corpúsculo polar. Os oócitos em MII foram inseminados por ICSI. A fertilização foi avaliada em 18h com dois pronúcleos. Os zigotos foram cultivados por 72h antes da transferência. Foi usado para o preparo do endométrio, estradiol e, para suporte lúteo, progesterona micronizada.

## RESULTADOS

Foram coletados 126 oócitos de folículos com diâmetro entre 3 e 8 mm. Destes, 119 estavam imaturos e 7, todos de uma mesma paciente, já estavam em MII. Dos 119 imaturos, 33% foram a MII em 24h e outros 21%, em 48h. Após a ICSI, 58 % (37/64) apresentaram 2PN. Dos zigotos obtidos, 89% (34/37) apresentaram clivagem ao estágio de 2 células e 13%, com clivagem precoce. Nenhum ciclo foi cancelado. As pacientes apresentaram endométrios mínimo de 7mm. Todas as pacientes obtiveram embriões para transferência. Foram transferidos um total de 34 embriões no dia 3. Dos embriões transferidos, 76% eram de grau III ou IV. Não houve gestação neste grupo de pacientes.

## CONCLUSÕES

Ao nosso entender, esta é a primeira descrição do mesmo processo realizado no Brasil. Nossos resultados demonstram que a IVM sem estímulo é um procedimento possível, no entanto, as alterações cromossômicas desses oócitos imaturos podem ser responsáveis pelas dificuldades de desenvolvimento embrionário e de implantação.

## Correção de Autoria de Artigos

Gostaríamos de tornar pública uma correção em relação aos serviços a que pertencem os autores dos trabalhos que enviamos ao XI Congresso Brasileiro de Reprodução Assistida. O nosso serviço, Centro de Pesquisa e Reprodução Humana Nilo Frantz enviou ao congresso os trabalhos intitulados “ Desenvolvimento in vitro de embriões de descarte para geração de células-tronco e “ Relação entre tamanho folicular, taxas de fertilização, dinâmica de desenvolvimento embrionário e gestações”. Apesar de termos enviado a relação dos autores com suas respectivas instituições, na edição especial do Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida, com os resumos dos trabalhos do congresso, consta que todos os autores pertencem ao Centro de Pesquisa e Reprodução Humana Nilo Frantz. Gostaríamos de tornar público que a autora Profa. Dra. Adriana Bos-Mikich, mesmo publicando conjuntamente, não pertence a nosso serviço, sua instituição é o Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Atenciosamente,

Nilo Frantz

**Resposta:**

*Prezado Nilo:*

*Agradecemos sua observação. Na premência da publicação dos resumos no número especial para o Congresso, algumas incorreções passaram, as quais estão sendo, inclusive, reparadas neste exemplar.*

*O Jornal da SBRA é “ nosso”, estamos abertos a toda contribuição que busque a excelência do mesmo.*

*Um abraço.*

*A Editoria*

2007

## 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

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO LATO-SENSU  
EM REPRODUÇÃO HUMANA ASSISTIDA**
**Aprovado pelo Conselho Estadual de Educação e MEC**
**INSCRIÇÕES ABERTAS PELO SITE [www.sapientiae.org.br](http://www.sapientiae.org.br)**

 Associação Instituto Sapientiae – Centro de Estudos e Pesquisas em  
parceria com Faculdade de Medicina de Jundiaí - São Paulo, SP

 Informações: (11) 3887-2628 / 3887-1222 / [cursos@sapientiae.org.br](mailto:cursos@sapientiae.org.br)
**UTROGESTAN® - progesterona natural micronizada**
**USO ADULTO**

**Composição:** cada cápsula contém progesterona 100 mg ou 200 mg; excipientes qsp. **Indicações:** UTROGESTAN® é indicado para os distúrbios relacionados à deficiência de progesterona, como alterações do ciclo menstrual e amenorréia secundária; na insuficiência lútea; na pré-menopausa e na reposição hormonal da menopausa (como complemento à terapia estrogênica). UTROGESTAN® via vaginal é indicado também na implantação do embrião e manutenção da gravidez durante o primeiro trimestre e como suporte da fase lútea durante os ciclos de reprodução assistida. **Contra-indicações:** este medicamento é contra-indicado em doenças graves do fígado. Hipersensibilidade do princípio ativo ou a qualquer outro componente da fórmula. **Precauções:** alterações leves ou moderadas da função hepática, pacientes com disfunção renal. **Advertências:** Este medicamento não trata todas as causas de aborto espontâneo precoce e, particularmente, ele não tem ação sobre abortos provenientes de defeitos genéticos (o que corresponde a mais da metade das causas de aborto). **Pacientes idosos:** Não há dados que indiquem a necessidade do ajuste de dose para a paciente idosa. **Gravidez - Amamentação:** Nenhuma relação entre o progesterona e malformações fetais foi observada durante diversos estudos epidemiológicos em mais de mil pacientes. **Interações medicamentosas:** o uso crônico de barbitúricos, carbamazepinas, hidantoínas ou rifampicina pode diminuir a eficácia de UTROGESTAN®. Por outro lado, UTROGESTAN® pode potencializar os efeitos farmacológicos da ciclosporina, teofilina ou beta-bloqueadores. **Posologia:** Via Oral: Na insuficiência de progesterona, na insuficiência lútea o regime de tratamento usual é de 200mg por dia: — 10 dias por ciclo, habitualmente do 17º dia ao 26º dia, inclusive. Em terapia de reposição hormonal para menopausa, a terapia estrogênica isolada não é recomendada (risco de hiperplasia endometrial). Consequentemente, a progesterona é combinada em dose de 200 mg por dia, da seguinte forma: — dose única de 200 mg à noite antes de dormir, de 12 a 14 dias por mês. Na dose de 200 mg é comum observar-se um sangramento de privação após o uso da progesterona. Via vaginal: Cada cápsula gelatinosa deve ser introduzida profundamente na vagina. Suplementação da fase lútea (segunda fase do ciclo menstrual) durante ciclos de FIV: A dosagem recomendada é de 400 a 600 mg por dia, divididos em duas a três doses, do dia da injeção HCG até a 12ª semana de gravidez. Suplementação da fase lútea durante ciclos espontâneos ou induzidos: a dosagem recomendada é de 200 a 400 mg por dia, divididos em duas doses, a partir do 17º dia do ciclo, durante 10 dias. O tratamento será rapidamente reiniciado se a menstruação não ocorrer novamente e, sendo diagnosticada uma gravidez, até a 12ª semana desta. Ameaça de aborto precoce ou prevenção de aborto comum devido à insuficiência lútea: a dosagem recomendada é de 200 a 400 mg por dia divididos em duas doses até a 12ª semana de gravidez. **Forma farmacêutica e apresentações:** UTROGESTAN® 200 mg é apresentado em caixas contendo blister com 14 cápsulas gelatinosas. UTROGESTAN® 100 mg é apresentado em caixas contendo blister com 30 cápsulas gelatinosas. **VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA.** Registro no M.S.: 1.0390.0167. Farm Resp.: Dr. Wessel de Oliveira Cunha CRF-RJ: 2184. Fabricado por: CAPSUGEL PLOERMEL. Zone Industrielle Camagnon, B. P. 320 - 56803 Ploermel Cedex - Embalado por: Laboratórios Besins International Bélgica. Distribuído por: Farmoquímica S/A. Rua Viúva Cláudio, 300 - Rio de Janeiro - RJ - Indústria Brasileira - CNPJ: 33.349.473/0003-10 - SAC 0800 25 0110 - **Para ver o texto de bula na íntegra, acesse o site [www.lqm.com.br](http://www.lqm.com.br)**