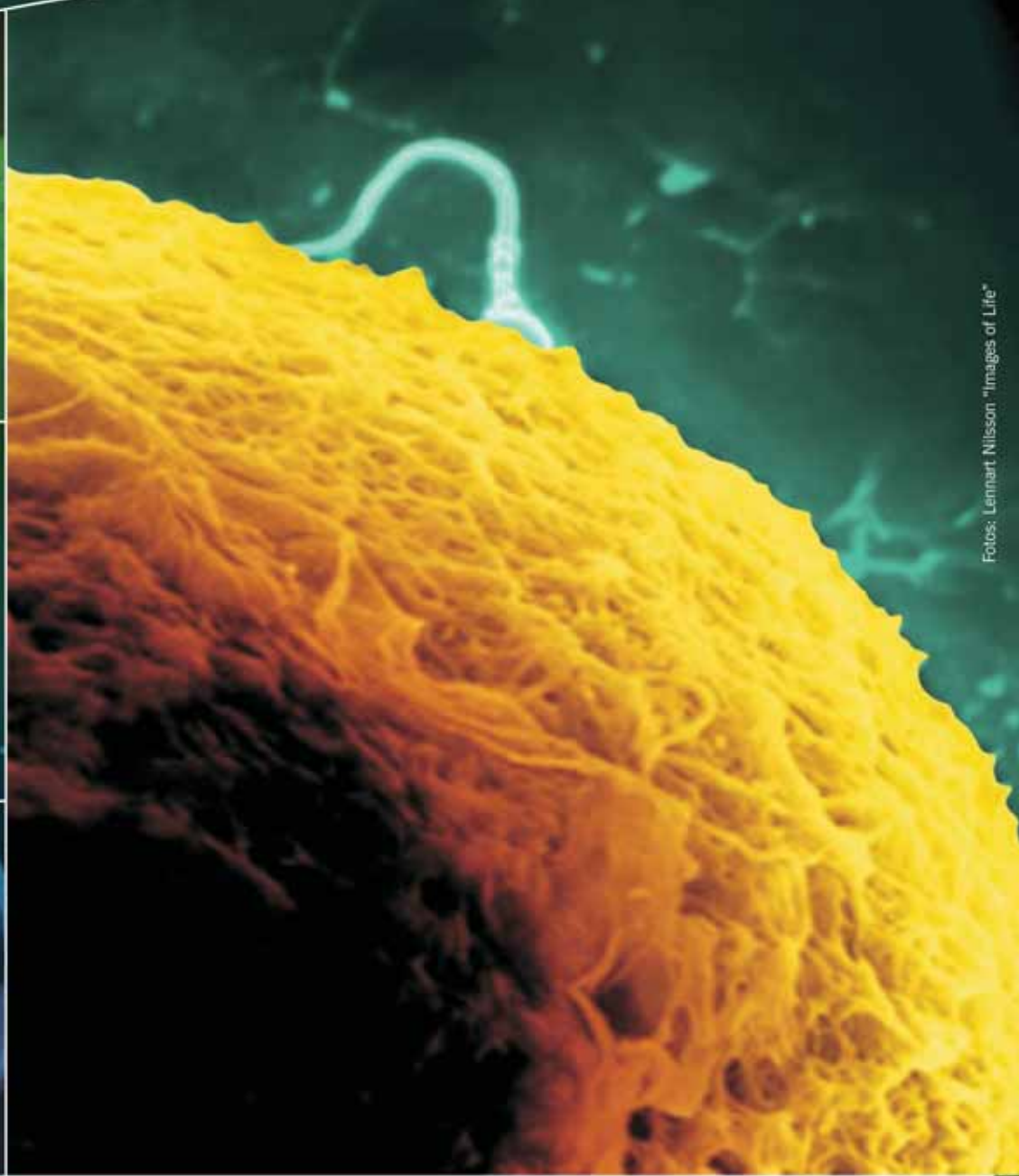
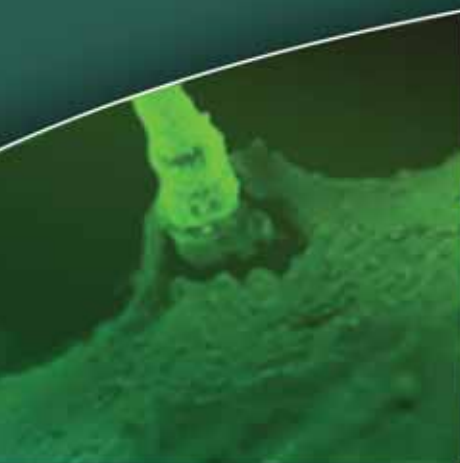


Volume 13  
Number 3  
Jul-Aug-Sep 2009  
ISSN 1517-5693

# JBRA

## Assisted Reproduction

JORNAL BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA



Fotos: Lennart Nilsson "Images of Life"



# **Luveris®**

## alfalutropina

**A suplementação com r-hLH pode determinar benefícios sobre a evolução do tratamento para mulheres acima de 35 anos de idade<sup>1</sup>**

**Possibilita a individualização do tratamento<sup>2</sup>**



**LUVERIS® 75 UI (alfalutropina) - USO ADULTO - Para uso subcutâneo.** **Indicação:** Luveris® em associação com uma preparação de hormônio folículo estimulante (FSH), é recomendado para a estimulação do desenvolvimento folicular em mulheres com insuficiência grave de LH e FSH. Luveris® deve ser administrado segundo um esquema de injeções diárias, simultaneamente ao FSH. Dado que estas pacientes são amenorréicas e têm uma reduzida secreção de estrogênios endógenos, o tratamento pode ser iniciado a qualquer momento. **Contraindicações:** hipersensibilidade às gonadotrofinas ou a qualquer dos excipientes; carcinoma do útero, ovário ou mama; tumores ativos, não tratados, do hipotálamo e da hipófise; hipertrofia ou cistos ovarianos de etiologia desconhecida; hemorragias ginecológicas de etiologia desconhecida. **Precauções e advertências:** Não deve ser utilizado quando não é possível a obtenção de uma resposta efetiva, tais como, falência ovariana, má formação dos órgãos sexuais ou tumores fibróides do útero incompatíveis com a gravidez. As pacientes devem ser examinadas em relação a hipotireoidismo, insuficiência da supra-renal, hiperprolactinemia e tumores do hipotálamo ou hipófise. Risco aumentado de hiperestimulação, podendo conduzir a um grave quadro clínico, caracterizado por cistos ovarianos de grandes dimensões, que podem romper. Uma excessiva resposta ovariana raramente origina uma hiperestimulação significativa, exceto se houver administração de hCG para induzir a ovulação. Portanto, é prudente não administrar hCG nestes casos e recomendar à paciente a abstenção de relações sexuais, ou métodos anticoncepcionais de barreira, durante pelo menos 4 dias. Recomenda-se a monitorização com ecografia, bem como medições do estradiol. Em pacientes submetidas à indução de ovulação, a incidência de gravidez e nascimentos múltiplos é maior, em comparação à concepção natural. Luveris® não deve ser administrado durante a gravidez e a amamentação, em idosos, crianças e outros grupos de risco. Não se conhecem os efeitos da superdosagem com alfalutropina, no entanto, pode-se admitir a ocorrência da síndrome da hiperestimulação ovariana. **Reações adversas:** A alfalutropina é utilizada em associação com alfafolitropina, sendo difícil atribuir efeitos indesejáveis a qualquer das substâncias utilizadas. Foram relatadas reações ligeiras e moderadas no local da injeção (equimose, dor, rubor, prurido ou edema). Não foram relatadas reações graves no local da injeção nem reações alérgicas sistêmicas após a administração de Luveris®. A síndrome de hiperestimulação ovariana foi observada em menos de 6% das pacientes tratadas com Luveris®. Não foi relatada síndrome de hiperestimulação ovariana grave. Podem ocorrer tromboembolia, torsão dos anexos (uma complicação do aumento do volume ovariano) e hemoperitônio. Pode também ocorrer gravidez ectópica, especialmente em mulheres com história de doença tubária anterior. Reações mais comuns: reações no local da injeção, cefaleia, sonolência, náuseas, dor abdominal, dor pélvica, síndrome de hiperestimulação ovariana, cistos ovarianos, dor nas mamas. **Posologia:** O tratamento deve ser adaptado à resposta individual da paciente, avaliada pela medição das dimensões do folículo por meio de ecografia e do nível de estrogênios. Inicia-se com a administração diária de 75 UI de alfalutropina, por até 3 semanas, em associação com 75-150 UI de FSH. Se um aumento da dose de FSH for considerado apropriado, o ajuste da dose deve ser efetuado, de preferência, após intervalos de 7-14 dias e, de preferência, com incrementos de 37,5-75 UI. Pode ser aceitável prolongar a duração da estimulação em qualquer um dos ciclos até 5 semanas. Quando se obtém uma resposta ótima, deve ser administrada uma única injeção de hCG, 24-48 horas após as últimas injeções de Luveris® e de FSH. Recomenda-se que a paciente tenha relações sexuais no dia da administração de hCG, bem como no dia seguinte. Como alternativa, pode ser efetuada uma inseminação intra-uterina. Pode ser necessário um suporte da fase lútea, uma vez que a ausência de substâncias com atividade luteotrópica (LH / hCG) após a ovulação pode conduzir a uma falência prematura do corpo lúteo. Se for obtida uma resposta excessiva, o tratamento deve ser interrompido e o hCG não deve ser administrado. O tratamento deve ser reiniciado no ciclo seguinte, com uma dose de FSH inferior à do ciclo anterior. **Modo de Usar:** Para administração subcutânea única e imediata após abertura e reconstituição. Luveris® pode ser misturado com Gonaf® monodose em 1 ml de solvente, e co-administrado numa injeção única. Neste caso Luveris® deve ser reconstituído em primeiro lugar e depois utilizado para reconstituir o pó de alfafolitropina. Os produtos não utilizados ou os resíduos devem ser descartados. **Conservação:** Conservar em temperatura abaixo de 25°C. Proteger da luz. Nessas condições o medicamento é estável por 36 meses. VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA. SAC Merck Serono: 0800-113320. Reg MS 1.0089.0354

**Referência:** 1. Humaidan P, Bungum M, Bungum L, Yding Andersen C. Effects of recombinant LH supplementation in women undergoing assisted reproduction with GnRH agonist down-regulation and stimulation with recombinant FSH. RBM On-line 2004; p.1204. 2. Shoham Z, Balen A, Patel A et al. Results of ovulation induction using human menopausal gonadotropin or purified follicle-stimulating hormone in hypogonadotrophic hypogonadism patients. Fertil Steril 1991; 56: 1048-1053.

**Contraindicação:** pacientes com carcinoma do útero, ovário ou mama. **Interação medicamentosa:** Luveris® não deve ser coadministrado a outros medicamentos na mesma seringa, exceto Gonaf® na apresentação monodose. A PERSISTIREM OS SINTOMAS O MÉDICO DEVERÁ SER CONSULTADO.



# JBRA

## Assisted Reproduction

### CORPO EDITORIAL

Editor	Instituição	Região/ País
Maria do Carmo Borges de Souza	G&O Barra/ UFRJ	RJ Brasil

#### Editor Adjunto

Paulo Franco Taitson	IRH / PUC MG	MG Brasil
----------------------	--------------	-----------

#### Consultor Editorial

José Gonçalves Franco Jr	CRH	SP Brasil
--------------------------	-----	-----------

#### Assistente Editorial

Bruno Borges		RJ
--------------	--	----

#### Editores Associados

Edson Borges Jr	Fertility / Inst Sapientiae	SP Brasil
João Batista A Oliveira	CRH	SP Brasil
Selmo Geber	Origen / UFMG	MG Brasil
Weydson Barros Leal	UFPE	PE Brasil

### CONSELHO EDITORIAL

Adelino Amaral Silva	Gênesis	DF Brasil
Alessandro Schuffner	Conceber	PR Brasil
Álvaro Petracco	Fertilitat/ PUC RS	RS Brasil
Ana Cristina Allemand Mancebo	G&O Barra	RJ Brasil
Anne R Greenlee	OHSB	EUA
Aroldo Camargos	UFMG	MG Brasil
Bela Zausner	Gênese	BA Brasil
Bruno Scheffer	IBRRA	BH Brasil
Carlos André Henriques	G&O Barra	RJ Brasil
César Calfatti	Clin Los Dominicos	Chile
Claudia Borrero	Conceptum	Colombia
Claudia G Petersen	CRH	SP Brasil
Cláudio Chillik	CEGYR	Argentina
Condesmar Marcondes Filho	Nucl Santista RH	SP Brasil
David Vantman	CER	Chile
Dirceu H Mendes Pereira		SP Brasil

Eduardo Pandolfi Passos	SEGIR / UFRGS	RS Brasil
Ernesto Gallardo Lozano	IMER	México
Fabio Firmbach Pasqualotto	Conception	RS Brasil
Fernando Zeghers-Hochschild	Clin Las Condes	Chile
Francisco Risquez	Clin La Trinidad	Venezuela
Humberto Ikuo Shibasaki	UFMT	MT Brasil
Jorge Blaquier	Fertilab	Argentina
João Pedro Junqueira Caetano	Pró-Criar/Mater Dei	MG Brasil
Joaquim Roberto C Lopes	Cenafert	BA Brasil
Jonathas Borges Soares	Projeto Alfa	SP Brasil
Jorge Hallak	Androscience	SP Brasil
Juan Manuel Montoya	Conceptum	Colombia
Ivan Valencia Madera	CEMEFES	Equador
Karen Sermon	VUB	Bélgica
Leila Montenegro S Farah	Fertility	SP Brasil
Leticia Urdapilleta	Cegyr	Argentina
Lídio Jair Ribas Centa	Androlab/ UFPR	PR Brasil
Luiz Fernando Dale	C Medicina da Reprodução	RJ Brasil
Madalena Caldas	GERAR	PE Brasil
Marcos Sampaio	Origen	MG Brasil
Mariângela Badalotti	Fertilitat	RS Brasil
Marilena Correa	UERJ	RJ Brasil
Mario Cavagna	H Perola B/ I Sapientiae	SP Brasil
Marisa Decat de Moura	IBBRA/Mater Dei	BH Brasil
Newton E Busso	Unifert	SP Brasil
Paulo Serafini	Huntington/ USP	SP Brasil
Renzo Antonini Filho	I Saude da Mulher	MG Brasil
Ricardo Melo Marinho	Mater Dei	MG Brasil
Roberta Wonchokier	Projeto Alfa	SP Brasil
Roberto Coco	Fecunditas	Argentina
Rose Marie M Melamed	Fertility	SP Brasil
Sidney Glina	Hosp Albert Einstein	SP Brasil
Silvana Chedid	Chedid-Grieco	SP Brasil
Renato Fanchin		França

**Diretoria da SBRA - 2009/2010**

**Presidente:** Adelino Amaral Silva  
www.sbra.com.br

**Departamento de Publicações**

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

**Presidente:** Adelino Amaral Silva

**1º Vice Presidente:** Bela Zausner

**2º Vice Presidente:** Condesmar Marcondes de Oliveira

**1º Secretário:** Newton Eduardo Busso

**2º Secretário:** Lidio Jair Ribas Centa

**1º Tesoureiro:** Hitomi Miura Nakagava

**2º Tesoureiro:** Marcelo de Pontes Rocha

**Editora do JBRA:** Maria do Carmo Borges de Souza

**Diretor de Comunicação:** Dr. Paulo Taitson

**Comissão de Atividades Internacionais:**

Marcos Sampaio

Ricardo Baruffi

**Departamento Científico:**

Mario Cavagna

Fabio Pasqualotto

Eduardo Motta

**Comissão de Ética e Defesa de Prerrogativa:****Efetivos:**

José Gonçalves Franco Junior

Edson Borges Junior

Selmo Geber

**Suplentes:**

Maria do Carmo Borges de Souza

Eduardo Pandolfi Passos

Alvaro Pigato Ceschin

**Comissão de Educação Continuada:**

Antonio Helio Oliani

Álvaro Petracco

Roberta Wonchockier

Maria Cecilia R.M. Albuquerque

**Conselho Fiscal:****Efetivos:**

Luiz Fernando Dale

Joaquim Roberto Costa Lopes

Edilberto de Araújo Filho

**Suplentes:**

Mylena Naves de Castro da Rocha

Assumpto Iaconelli

Pedro Paulo Roque Monteleone

**Conselho Consultivo:**

José Gonçalves Franco Júnior

Selmo Geber

Edson Borges

Maria do Carmo Borges de Souza

**Comissão de Comunicação:**

Paulo Franco Taitson

Lia Ferragut

César Cornel

**Relações Governamentais:**

Rosaly Rulli Costa

Hitomi Miura Nakagava

**PGD:**

Coordenador: Selmo Geber

Assumpto Iaconelli Junior

Leila Farah

Mariana Faller

**DST:**

Caio Parente Barbosa

Waldemar Diniz de Carvalho

Paulo Naud

**Endoscopia:**

**Coordenador:** Maria Cecilia Erthal

Paulo Beltrame

Sergio Galbinsky

**Endometriose:**

**Coordenador:** Vilmon de Freitas

Elvio Tognotti

João Pedro Junqueira

**Enfermagem:**

**Coordenadora:** Suzana Zachia

Renata Trigo

Jacqueline Aranki

**Psicologia:**

**Coordenadora:** Ana Rosa

**Andrologia:**

**Coordenador:** Edson Borges

**Projetos Multicentricos:**

Franco Junior

**Comissão de Normatização - ANVISA e SELO SBRA**

Maria do Carmo Borges de Souza

Jonathas Borges

Isabel Cristina Amaral de Almeida

Claudia Petersen

Condesmar Marcondes Filho

Gilberto Almodin

**Endocrinologia:**

**Coordenador:** Rui Ferriani

Helena Corletta

Paulo Spinola

Polimara Spritzer

Ricardo Marinho

**PRESIDENTES DA SBRA**

José Gonçalves Franco Junior **1996-1998 e 1999-2000**

Edson Borges Junior **2001-2002**

Selmo Geber **2003-2004**

Maria do Carmo Borges de Souza **2005-2006**

Eduardo Pandolfi Passos **2007-2008**

Adelino Amaral Silva **2009-2010**

## INFORMAÇÕES GERAIS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## TIPOS DE ARTIGOS PUBLICADOS

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

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

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

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

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

## PREPARAÇÃO DOS ORIGINAIS

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

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

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

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

## PÁGINA DE ROSTO

A página de rosto deve conter:

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

## RESUMO E ABSTRACT

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

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

## AGRADECIMENTOS

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

## REFERÊNCIAS

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

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

### 1. Artigo de periódico

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

### 2. Livro

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

### 3. Capítulo de livro

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

### 4. Artigo de revista eletrônica

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

### 5. Artigo publicado na Internet:

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

### 6. Site

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

### 7. Software

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

## TABELAS E FIGURAS

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

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

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

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

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

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

## ENVIO/SUBMISSÃO DE ARTIGOS

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

Profa. Dra. Maria do Carmo Borges de Souza

Editora do Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida  
Centro Médico BarraShopping

Av. das Américas, 4666, salas 312/313  
CEP 22649-900 □ Rio de Janeiro, RJ

Fone: (21) 2430.9060

Fax: (21) 2430.9070

<http://www.sbra.com.br>

---

**Editorial**
**O desejo de ter filhos: um questionamento em aberto**

Tonia Costa, Egleubia Andrade de Oliveira, Maria do Carmo Borges de Souza  
 ..... 8

---

**Artigo Original**
**Análise morfológica dos folículos primordiais de ovários de ovino criopreservados em EG, DMSO e sua associação.**

Patrícia Miyuki Tsuribe, Carlos Alberto Monte Gobbo, Fernanda da Cruz Landim Alvarenga  
 ..... 9

**Resultados del co-cultivo de embriones sobre células endometriales autólogas en pacientes que realizan un primer procedimiento de reproducción asistida.**

V.Eyheremendy, F.G.E.Raffo, M. Papayannis, J. Barnes, C Granados , J. Blaquier  
 ..... 14

**Eficácia da injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) de resgate após falha de fertilização in vitro convencional.**

Sarah Nacheif, Aparecida dos Santos Canha, Agnes Mayumi Takahira, Gilberto da Costa Freitas, Artur Dzik, Mario Cavagna  
 ..... 18

**América Latina e busca por reprodução assistida: perfil da paciente em um serviço público de referência no Rio de Janeiro (Brasil).**

Tonia Costa, Eduardo Navarro Stotz, Ronir Luiz, Maria do Carmo Borges de Souza  
 ..... 21

**Uso dos marcadores da reserva e variáveis da resposta ovariana à estimulação gonadotrófica como preditores da implantação embrionária em ciclos de ICSI**

Bruno Ramalho de Carvalho, Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva, Júlio César Rosa e Silva, Rosana Maria dos Reis, Rui Alberto Ferriani, Marcos Felipe Silva de Sá  
 ..... 26

**Avaliação comparativa do rFSH preenchido por bioensaio versus rFSH preenchido por massa em inseminação intra-uterina.**

Martha de Moraes Calvente Bulus, Maria do Carmo Borges de Souza, Ana Cristina Allemann Mancebo, Gutemberg Leão de Almeida Filho, Carlos André Henriques, Kátia Silveira da Silva  
 ..... 30

---

**Artigo de Revisão**
**Métodos de preservação da capacidade reprodutiva**

Luis Felipe Victor Spyer Prates, Selmo Geber  
 ..... 35

---

**Eventos**

..... 45

## O desejo de ter filhos: um questionamento em aberto

A infertilidade, hoje, é reconhecida pela OMS como doença, um problema de saúde pública. Embora não comprometa a integridade física, nem ameace a vida dos indivíduos, pode produzir impacto negativo, gerando frustração e debilitando a personalidade,

O desejo configura-se, então, como marco na busca por resolução de um problema – a ausência de filhos, ou infertilidade. Em acréscimo, as tecnologias reprodutivas, ao acenarem com possibilidades de resolução, instituíram a possibilidade de organizar, controlar o desejo. Assim, a reprodução passa a ser regulada pela decisão consciente de um filho programado.

Ao se afastar da esfera privada da intimidade do casal e se apoiar no instrumental tecnocientífico, a fecundidade e infecundidade assumem uma face técnica, que muitas vezes substitui (e até exclui) o sujeito subjetivo. Neste contexto, aponta-se um descompasso entre o desejo – consciente e inconsciente – de ter filhos.

Eis o desafio e a importância do trabalho multiprofissional integrado em saúde reprodutiva: se o paciente fala o seu desejo consciente, cabe à equipe permitir aflorar o desejo inconsciente, pois a infertilidade pode estar relacionada à sua impossibilidade de expressão. Além disso, há que se considerar que a temática da reprodução humana traz em si imbricados aspectos de diferentes domínios: biológicos, sociais e culturais. Cabe-nos questionar o quanto este desejo expressa representações, crenças, tabus e mitos construídos socialmente. Por que ter filhos é tão importante? O que leva uma pessoa a buscar tratamento por tantos anos ou a tentar ter um filho por 10, 20 anos? Se a função social da mulher extrapola o âmbito privado da casa, por que a maternidade parece ser ainda tão importante? A maternidade permanece como condicionante da identidade feminina, sua atribuição biológica “natural”? O desejo é então uma imposição social?

**Tonia Costa**

**Egleubia Andrade de Oliveira**

**Maria do Carmo Borges de Souza**

\*Instituto de Ginecologia da UFRJ

Divisão de Reprodução Humana

# Análise morfológica dos folículos primordiais de ovários de ovino criopreservados em EG, DMSO e sua associação.

## Morphological analysis of primordial follicles from sheep ovaries cryopreserved in EG, DMSO and their association."

Patrícia Miyuki Tsuribe<sup>1</sup>, Carlos Alberto Monte Gobbo<sup>2</sup>, Fernanda da Cruz Landim Alvarenga<sup>3</sup>

<sup>1</sup>PhD, Embriologista da Clínica Endogin Serh, Bauru - SP.

<sup>2</sup>Professor Assistente Doutor do Departamento de Urologia da Faculdade de Medicina da UNESP, Botucatu - SP

<sup>3</sup>PhD, Professora Adjunto do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica da UNESP, Botucatu - SP.

Local de realização do trabalho: Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica da UNESP, Botucatu - SP.

Apresentado no XII Congresso Brasileiro de Reprodução Assistida de 2008 em São Paulo

Órgão financiador: FAPESP/Proc.: 02/02705-7

### RESUMO

**Objetivo:** Comparar os crioprotetores Dimetil Sulfoxido (DMSO), Etileno Glicol (EG) e sua associação, para criopreservação do córtex ovariano de ovelha.

**Metodologia:** Os fragmentos ovarianos foram divididos em 3 partes: **1.** Uma parte foi destinada a análise do material fresco. **2.** Uma segunda parte foi incubada com as soluções de congelamento contendo 1,5M EG ou 1,5M DMSO ou 1,5M EG + 1,5M DMSO e lavada para diluição dos crioprotetores. **3.** A terceira foi submetida à ação dos crioprotetores (EG 1,5M; DMSO 1,5M e EG+ DMSO 1,5M), e criopreservada. Em todos os grupos, uma parte da amostra foi submetida ao isolamento dos folículos pré-antrais e o restante foi destinado à análise ultra-estrutural.

**Resultado:** Após o isolamento dos folículos primordiais (controle), a porcentagem de folículos viáveis foi 78,9%. A porcentagem de folículos viáveis apenas na exposição dos crioprotetores 1,5M EG, 1,5M DMSO e 1,5M EG + 1,5M DMSO foi de 77,1%, 68,4% e 60,7% respectivamente. Após a criopreservação foi de 75%, 60% e 55,6% respectivamente. Na análise ultra-estrutural os folículos primordiais oriundos de fragmentos ovarianos frescos ou expostos aos crioprotetores apresentaram morfologia semelhante. No entanto, nas amostras congeladas observou-se alteração das mitocôndrias em todos os grupo. Apesar disso a integridade das demais organelas foi preservada nos folículos criopreservados com EG, enquanto que nos outros grupos (DMSO e associação) foi observado excesso de vesiculação no citoplasma dos oócitos e dilatação da membrana nuclear indicando degeneração.

**Conclusão:** O Etileno Glicol parece ser o crioprotetor mais adequado para criopreservação do tecido ovariano de ovino.

**Palavras-chave:** Criopreservação, folículo ovariano, Microscopia Eletrônica de Transmissão

### ABSTRACT

**Objective:** Compare the cryoprotectants Dimethyl Sulphoxide (DMSO), Ethylene Glycol (EG) and their association for cryopreservation of sheep ovarian cortex.

**Methodology:** Fragments collected from ovaries were divided into 3 parts. **1.** One part from sample was destined for analysis of fresh material. **2.** The second part

was incubated with solution of freezing having 1,5M EG or 1,5M DMSO or 1,5MEG + 1,5M DMSO and washed for dilution of the cryoprotectants. **3.** The third part was submitted to cryopreservation using the same cryoprotectants (EG 1,5M; DMSO 1,5M and EG + DMSO 1,5M) and cryopreserved. In all groups, one part of sample was submitted to pre-antral follicles isolation and the remainder was destined to ultra-structural analysis.

**Results:** After isolation of fresh primordial follicles (control), the percentage of viable follicles was 78,9%. The percentage of viable follicles only exposed to cryoprotectants 1,5M EG, 1,5M DMSO and 1,5M EG + 1,5M DMSO was 77,1%, 68,4% and 60,7% respectively. After cryopreservation were 75%, 60% and 55,6% respectively. Ultra-structural analysis of the primordial follicles derived from fresh ovarian fragments or from fragments just exposed to the cryoprotectants showed similar morphology. However, in frozen samples, alterations of mitochondria were observed in all groups. Despite this, the integrity of the remained organelles was preserved in follicles cryopreserved with EG, while that in others groups (DMSO and association) an excess of vacuolization in cytoplasm of oocytes and swelling of nuclear membrane was observed indicating degeneration.

**Conclusion:** The Ethylene Glycol seems to be the cryoprotector more adequate for cryopreservation of sheep ovarian tissue.

**Key words:** Cryopreservation, ovarian follicle, Transmission Electron Microscopy

### INTRODUÇÃO

Recentes avanços no tratamento de câncer por quimioterapia e radioterapia tem melhorado consideravelmente a sobrevivência de pacientes jovens portadoras de câncer. No entanto, estes tratamentos têm efeitos altamente deletérios sobre os ovários causando uma redução severa no número de folículos com alta possibilidade de causar esterilidade (Apperley & Reddy 1995; Sanders *et al.*, 1996). O congelamento de fragmentos de tecido do córtex ovariano antes da realização do tratamento representa uma alternativa viável para preservação da fecundidade. A técnica de criopreservação ovariana envolve o congelamento dos folículos primordiais imaturos *in situ* em

pedaços do córtex ovariano. O folículo primordial contém um ócito que constitui 1% do volume da célula madura, possuem poucas organelas e não tem zona pelúcida ou grânulos corticais, assim eles são potencialmente mais tolerantes a congelamento e descongelamento (Oktay *et al.*, 1998). Acima de tudo isso, existe a vantagem quanto ao número, pois centenas de pequenos folículos podem ser obtidas utilizando um procedimento de biópsia simples ou milhares no caso do ovário total.

Um dos grandes desafios para os profissionais da área de reprodução tem sido em produzir ócitos maduros *in vitro* a partir destes folículos primordiais criopreservados. Estudos animais têm demonstrado que o tecido ovariano congelado e descongelado pode restaurar a secreção cíclica dos esteróides ovarianos após o autoenxerto (Barros *et al.*, 2001; Petroianu *et al.*, 2006) ou transplante (Prates *et al.*, 2005; Lee, 2005). Gravidez após auto-enxerto ovariano congelado tem sido relatada em ratos, camundongos e ovelhas (Guenasena *et al.*, 1997<sup>a</sup>; Shaw, 2000; Gosden, 1994). Em 2004, foi descrito o primeiro nascimento após a realização de transplante ortotópico de tecido ovariano humano congelado de uma mulher que teve linfoma de Hodgkin (Donnez, 2004).

A fertilidade pode então ser restaurada por enxerto ovariano ou hipoteticamente, por separação dos folículos primordiais do tecido ovariano descongelado e feito a maturação *in vitro*, seguido de fertilização *in vitro* com transferência de embriões. Este procedimento tem sido realizado com sucesso no tecido ovariano fresco de camundongo (Cortvriendt, 1996; Eppig, 1979) mas não foi possível ainda em espécies animais.

O crioprotetor mais utilizado para congelamento folicular utilizado na maioria dos estudos foi o Dimetil Sulfoxido (DMSO) (Guenasena *et al.*, 1997<sup>b</sup>; Baird *et al.*, 1999). No entanto, poucos são os estudos que comparam a utilização de diferentes crioprotetores. Da mesma forma, os efeitos tóxicos dos crioprotetores, sobre os tecidos não submetidos ao congelamento têm sido pouco estudados. O objetivo principal do trabalho foi comparar diferentes crioprotetores na preservação dos folículos primordiais do tecido ovariano criopreservado. Para tanto, comparou-se os crioprotetores Dimetil Sulfoxido (DMSO), Etileno Glicol (EG) e sua associação, para criopreservação de fragmentos do córtex ovariano de ovelha.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta do tecido do córtex ovariano

Foram colhidos 50 ovários ovinos cuja idade dos animais variou de 12 meses a 24 meses em matadouro Suin Quality de São Manoel/SP e lavados e armazenados em soro fisiológico a temperatura ambiente e transportado até o laboratório. No laboratório, os ovários foram tratados com álcool 70% por 30 segundos, lavados por 3 vezes em soro fisiológico e sob condições assépticas, foi retirado todo tecido adiposo envolto com uma tesoura. Em seguida, foi retirada a camada mais externa do ovário (camada cortical onde contém maior número de folículos primordiais) com auxílio de uma lâmina de bisturi. Os fragmentos de 2-3mm obtidos de cada ovário foram divididos em 3 partes:

1 : Uma parte da amostra constituída por 2 porções de fragmentos foi destinada a análise do material fresco, sendo 1 porção dos fragmentos submetida ao processo de isolamento folicular por dissociação mecânica e 1 porção dos fragmentos foi fixada em glutaraldeído a 2,5% para MET.

2 : Na segunda amostra foi submetida ao teste de toxicidade, onde os fragmentos ovarianos foram incubados com as soluções de criopreservação contendo 1,5M de EG ou 1,5M de DMSO ou 1,5M de EG + 1,5M de DMSO. Após a lavagem para diluição dos crioprotetores uma parte foi submetido ao isolamento folicular e a outra para MET.

3 : Finalmente, a terceira porção foi submetida à ação dos crioprotetores (EG 1,5M, DMSO 1,5M e EG+DMSO 1,5M), e criopreservada através da curva convencional

(0,3°C/min). Após o descongelamento, uma amostra foi submetida ao isolamento dos folículos pré-antrais e o restante foi destinado à análise ultra-estrutural.

### Teste de toxicidade

A fim de avaliar o efeito da toxicidade dos crioprotetores sobre os folículos, os fragmentos foram imersos em solução de meio MEM + 10% SFB + 50ug/gentamicina (meio de manutenção) por 5 minutos e em seguida acondicionados em meio de manutenção contendo 1,5M de EG/DMSO/EG+DMSO por 10 minutos sendo posteriormente transferidos para solução contendo 1,5M de EG/DMSO/EG+DMSO + 0,25M de sacarose onde permaneceram por mais 10 minutos a 20°C.

Após completar o período de equilíbrio, os crioprotetores (EG, DMSO e EG+DMSO) foram removidos do tecido ovariano transferindo para o meio de manutenção com 1M de EG/DMSO/EG+DMSO + 0,5M de sacarose por 10 minutos, em seguida para a solução com 0,5M de EG/DMSO/EG+DMSO + 0,5M de sacarose por 10 minutos. Finalmente, para a solução com 0,5M de sacarose por 10 minutos e por último para o meio de manutenção fresco.

### Criopreservação

Após a exposição aos crioprotetores (EG, DMSO e EG+DMSO) nas concentrações e período de equilíbrio utilizados no teste de toxicidade descrito acima, fragmentos de tecido ovariano (n = 10/grupo) foram acondicionados em criotubos de 1,8 ml e colocados num freezer biológico programável pré-resfriados a 20°C. Os criotubos foram resfriados a 2,0°C/min até -9°C; em seguida foi induzido manualmente o "seeding" e mantidos nesta temperatura por 10 minutos. Em seguida, utilizou-se curva de resfriamento de 0,3°C/min até -40°C; 10°C/min até -140°C sendo finalmente os tubos armazenados em nitrogênio líquido a -196°C durante 2 a 20 dias.

### Descongelamento

As amostras foram retiradas do LN<sub>2</sub> e mantidos a temperatura ambiente por 20 segundos e a 37°C por 25 segundos, sendo então transferidos para o meio de manutenção acrescido de 1M de EG/DMSO/EG+DMSO + 0,5M de sacarose por 10 minutos. Em seguida para a solução com 0,5M de EG/DMSO/EG+DMSO + 0,5M de sacarose por 10 minutos e finalmente, para a solução com 0,5M de sacarose por mais 10 minutos sendo então incubados em meio de manutenção fresco.

### Teste de Viabilidade Folicular

Foi realizado o teste de viabilidade folicular em folículos isolados a frescos, submetidos ao teste de toxicidade e criopreservados. Foram utilizadas 40 amostras por grupo experimental. As amostras foram dissociados mecanicamente. A suspensão foi filtrada por filtros de nylon de 500um e 100um e centrifugada a 400g por 5 minutos. O precipitado foi diluído com 2ml de MB e analisado em microscópio invertido para identificação e contagem dos folículos pré-antrais.

A coloração folicular foi feita a temperatura ambiente através da incubação dos folículos com Iodeto de Propídio (IP) e Acridina Orange sobre lâmina histológica permitindo a classificação de acordo com a forma e número das células da granulosa em microscópio fluorescente invertido. O iodeto de propídio cora o DNA de células inviáveis com dano de membrana, fluorescendo em vermelho. A Acridina Orange cora em amarelo-esverdeado as células viáveis com fita dupla de DNA.

### Análise Ultra-estrutural

Para análise ultra-estrutural foram fixados 5 fragmentos ovarianos por grupo experimental. Cada um dos fragmentos foi fixado em uma solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato (pH=7,2) e mantidos a 4°C

por um período mínimo de 24 horas. As amostras foram pós-fixadas em 1% de tetróxido de ósmio, em solução a 0,1M de tampão cacodilato de sódio por 2 horas a 4°C. Em seguida foram desidratadas em séries decrescentes de etanol (30, 50, 70, 90 e 95), seguidos de 3 banhos de 20 minutos cada em etanol absoluto a temperatura ambiente. O tecido foi embebido em resina Epon-812 e a polimerização realizada a 60°C. O material foi seccionado em secções ultrafinas (60 a 70nm) e montado em grades de cobre (malha 200). As grades foram contrastadas com 4% de acetato de uranila e citrato de chumbo e analisadas em MET (Philips CM100).

### Análise estatística

O efeito do crioprotetor sobre a percentagem de folículos normais foi analisado através de ANOVA seguida de teste T usando os dados de dez réplicas. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando  $P < 0,05$ .

### RESULTADOS

Recuperação dos folículos primordiais após o isolamento folicular.

Os folículos pré-antrais isolados variaram em tamanho e aparência. Os folículos primordiais foram caracterizados por um oócito granuloso, denso envolto por uma camada de células das granulosa achatadas ou achatadas e cuboides (Figura 1).

O número médio de folículos primordiais isolados após a exposição aos agentes crioprotetores (EG=21,1; DMSO=18,7 e EG+DMSO=17) mostraram não ser significativa com relação ao tecido ovariano a fresco (23,2).

O número médio de folículos primordiais isolados no tecido fresco ( $n = 23,2$ ) foi estatisticamente superior ao do tecido criopreservado em EG+DMSO ( $n = 5,9$ ) ( $P < 0,05$ ). Após o processo de congelamento, foi observada diferença no número médio de folículos primordiais isolados entre o EG ( $n = 13,3$ ) e DMSO ( $n = 10,1$ ) em relação ao EG+DMSO ( $n = 5,9$ ).

### Teste de Viabilidade Folicular

O teste de viabilidade realizado logo após a colheita mostrou folículos primordiais e primários com poucas células da granulosa lesadas (coradas pelo IP em vermelho), sendo a maioria corada em amarelo-esverdeado pela Acridina Orange, indicando integridade.

Os resultados obtidos após apenas a exposição aos agentes crioprotetores (EG=77,1%; DMSO=68,4% e EG+DMSO=60,7%) e após a criopreservação do tecido ovariano (EG=75%; DMSO=60% e EG+DMSO=55,6%) mostraram que em todos os tratamentos a viabilidade folicular foi similar àquela observada no tecido ovariano a fresco (78,9%).

Não foi observado diferença morfológica identificável a microscopia de luz entre folículos isolados de tecido a fresco, submetidos a ação dos crioprotetores e congelados-descongelados com EG. No entanto, os folículos criopreservados em DMSO e EG+DMSO apresentaram sinais de degeneração mais frequentemente.

### Análise ultra-estrutural

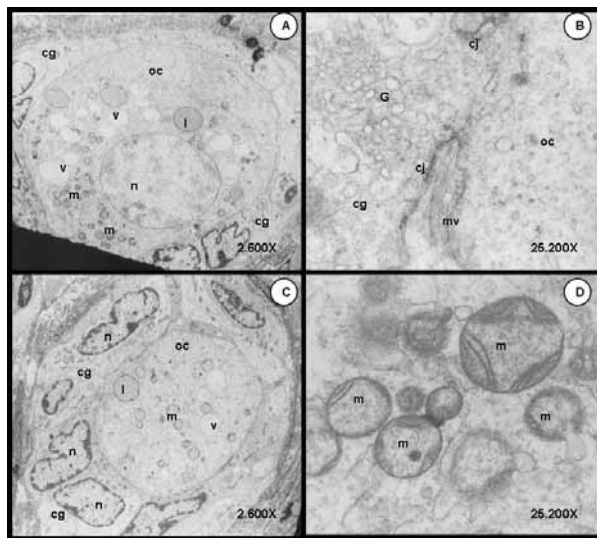
Os folículos pré-antrais observados tanto no material fresco como nos fragmentos ovarianos somente submetidos a ação dos crioprotetores exibiram um oócito de aspecto saudável circundado por uma ou mais camadas de células da granulosa bem organizadas. O ooplasma continha numerosas mitocôndrias arredondadas ou alongadas apresentando cristas pouco desenvolvidas. Em alguns casos foram observadas mitocôndrias em forma de alças indicando a multiplicação destas organelas. Complexos de Golgi eram raros, mas bem desenvolvidos. Foi observado retículo endoplasmático liso e rugoso, em agregações isoladas ou associações complexas com

mitocôndrias e vesículas. Um número variável de vesículas espalhadas pelo ooplasma também foi notado. Foram visíveis algumas microvilosidades na membrana do oócito e, ocasionalmente, pequenas quantias de material da zona pelúcida. As células da granulosa eram pequenas, com alto índice núcleo:citoplasma. Estas células apresentavam muitas mitocôndrias alongadas, retículo endoplasmático liso e rugoso e Complexo de Golgi, além de algumas vesículas elétron-densas (Figura 2).

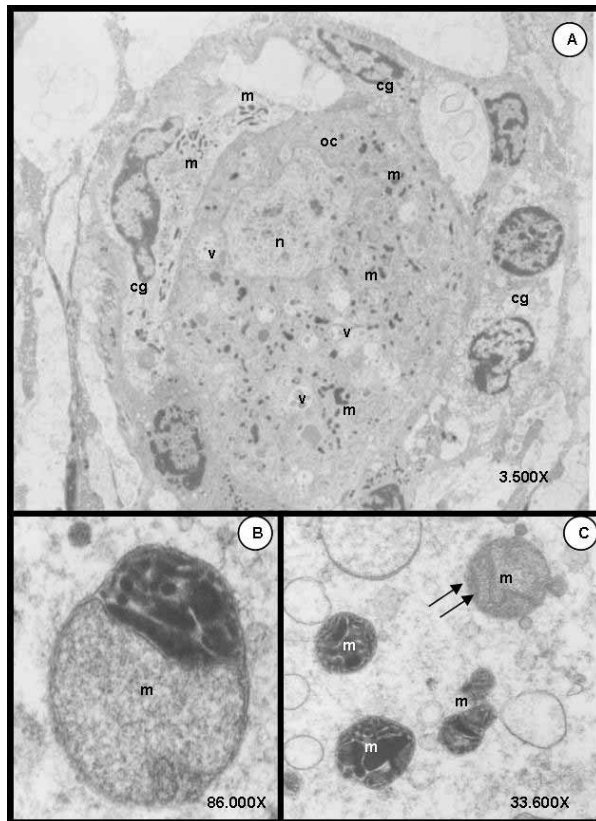
Por outro lado o exame dos folículos pré-antral de fragmentos ovarianos congelados mostrou alterações da morfologia celular. No grupo criopreservado com EG, embora o aspecto geral das organelas fosse semelhante ao descrito anteriormente, observou-se aumento da elétron-densidade da matrix mitocondrial (Figura 3). Alguns oócitos apresentaram concomitantemente mitocôndrias alteradas e mitocôndrias com aspecto normal. Estas mitocôndrias enegrecidas apresentavam, via de regra, menor tamanho. Nos folículos criopreservados utilizando-se o DMSO e o EG + DMSO esta característica também foi observada. No



**Figura 1.** Comparação entre um folículo primordial (fp) e 2 oócitos (o) oriundos de folículos antrais



**Figura 2:** Aspecto geral dos folículos pré-antrais intactos observados. A - Folículo primordial oriundo de fragmento ovariano não congelado. Notar o oócito (oc) envolto por células da granulosa (cg) de aspecto achatado. B - Detalhe da região de contato entre o oócito (oc) e uma célula da granulosa (cg). Microvilosidades (mv) e complexos juncionais (cj) puderam ser vistos na superfície do oócito. C - Folículo primário oriundo de fragmento ovariano exposto ao Etileno-glicol. D - Detalhe das mitocôndrias (m) observadas nos folículos tratados com Etileno-glicol. G = complexo de golgi, I = lipídeo, n = nucléolo, v = vacúolos,



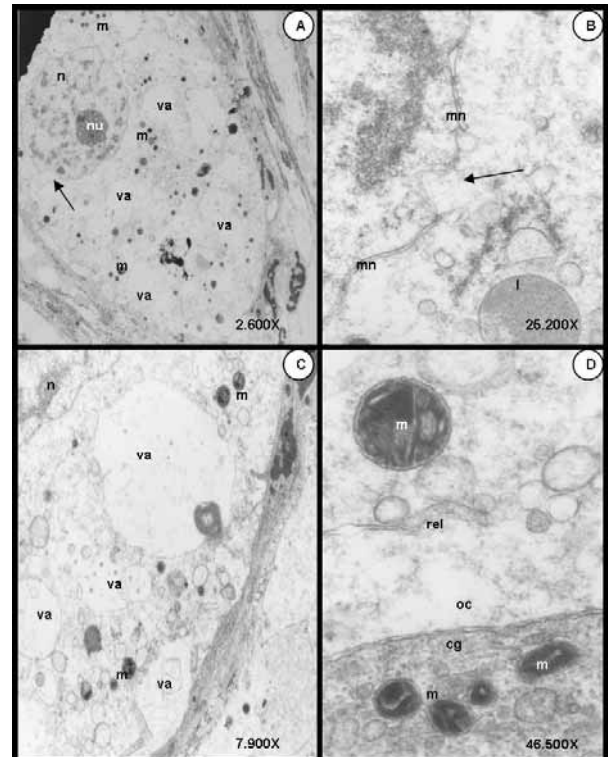
**Figura 3:** Aspecto geral dos folículos pré-antrais congelados com Etileno-Glicol. A - Vista geral de um folículo primário. Notar o aspecto enegrecido das mitocôndrias (m) tanto no oócito (oc) como nas células da granulosa (cg). B e C - Detalhe das mitocôndrias (m) observadas nos folículos congelados com Etileno-glicol. Note que algumas mitocôndrias intactas (setas duplas) foram vistas em conjunto com mitocôndrias lesadas. n = nucléolo, v = vacúolos.

entanto, nestes oócitos observou-se uma desorganização de outras organelas caracterizada por vesiculação excessiva no citoplasma, com aumento das cisternas do retículo endoplasmático. Além disso, foi observado regiões de dilatação da membrana nuclear, a qual se apresentou rompida em alguns pontos (Figura 4).

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Neste experimento foram coletados em média 23,2 folículos pré-antrais por fragmento ovariano fresco. Este baixo número está relacionado a metodologia manual de maceração do tecido utilizada associada a maior fibrosidade do tecido ovariano dos animais adultos. Foi observada uma diminuição no número de folículos obtidos após a adição dos crioprotetores, a qual se tornou mais acentuada após a criopreservação. Este fato pode estar associado a uma diminuição dos folículos com morfologia normal nos fragmentos ovarianos após a adição dos crioprotetores e congelamento. Possivelmente os folículos com morfologia alterada tenham se rompido com maior facilidade durante o isolamento mecânico, ou não tenham sido identificados. Durante o teste de viabilidade dos folículos isolados, através da coloração com sondas fluorescentes não foi observada diferença entre os grupos. Este fato também parece estar associado a uma seleção realizada durante a identificação dos folículos, o que fez com que somente folículos com morfologia normal fossem analisados.

As taxas de viabilidade folicular após a exposição aos agentes crioprotetores (EG=77,1%; DMSO=68,4% e EG+DMSO=60,7%) e após a criopreservação do tecido



**Figura 4:** Aspecto geral dos folículos pré-antrais congelados com DMSO e EG/DMSO.

A - Folículo primordial oriundo de fragmento ovariano congelado com DMSO. Notar o oócito (oc) com presença de grande quantidade de vacúolos (va) em seu interior. B - Detalhe da região perinuclear do oócito de um oócito congelado com DMSO. Notar a dilatação da membrana nuclear (mn), com ponto de ruptura (seta) da membrana da face citoplasmática. C - Folículo primordial oriundo de fragmento ovariano congelado com EG/DMSO. Notar a presença de inúmeros vacúolos (va). D - Detalhe das mitocôndrias (m) observadas tanto nas células da granulosa (cg) como no oócito (oc), onde também foi observada a dilatação do retículo endoplasmático liso (rel). n = núcleo.

ovariano (EG=75%; DMSO=60% e EG+DMSO=55,6%) indicam similaridade de todos os tratamentos com o observado no tecido ovariano a fresco (78,9%). Estes resultados concordam com os obtidos por Newton *et al.*, (1998) que utilizaram 4 tipos de crioprotetores e obtiveram melhores taxas de sobrevivência folicular com crioprotetores etileno glicol e dimetil sulfoxido (84% e 74% respectivamente) em relação a propileno glicol e glicerol (44% e 10% respectivamente). Também Aubard *et al.* (1998) obtiveram resultados semelhantes utilizando DMSO ou etileno glicol como agentes crioprotetores, sendo que ambos resultaram em nascimentos de ratos vivos.

Na análise ultra-estrutural os folículos primordiais oriundos de fragmentos ovarianos frescos ou expostos aos crioprotetores apresentaram morfologia semelhante. No entanto, quando foram analisadas as amostras congeladas observou-se alteração das mitocôndrias em todos os grupos, as quais se apresentavam com matriz enegrecida. Wilson *et al.* (1987) demonstraram que a criopreservação resulta em alterações na mitocôndria, incluindo espessamento de cristas, coalescência da membrana interna e escurecimento do espaço inter-membranoso. Alterações semelhantes foram observadas neste trabalho, nas mitocôndrias dos grupos congelados. Estas mudanças na estrutura mitocondrial poderiam certamente interferir na fosforilação oxidativa, resultando em um aumento no metabolismo da glutamina. O metabolismo da glutamina serve como medida da atividade do ciclo de Krebs, e portanto, da integridade funcional das mitocôndrias (Rieger *et al.*, 1991). O aumento no metabolismo da glutamina, após a criopreservação, pode ainda ser causado por

um aumento na demanda de grupos amina para síntese de nucleotídeos, glicoproteínas e proteoglicans, associadas aos mecanismos de reparo (Rieger *et al.*, 1991).

Apesar da alteração observada na mitocôndrias a integridade das demais organelas foi preservada nos folículos criopreservados com EG, enquanto que nos outros grupos (DMSO e associação) foi observado excesso de vesiculação no citoplasma dos oócitos e dilatação da membrana nuclear indicando degeneração. A interação entre lipídeos e proteínas desempenha um papel importante em manter a membrana intacta e funcionalmente ativa e a temperatura é um dos fatores que afetam a difusão dos componentes da membrana. O congelamento celular leva a alterações na distribuição dos fosfolipídeos entre as duas camadas da membrana celular. Os rearranjo dos lipídeos e proteínas de membrana que ocorrem durante a criopreservação induzem à exclusão de partículas intra membranosas em certas áreas e inclusão em outras. Esta mudança estrutural parece provocar modificações de fluidez local (Hinkorska-Galcheva *et al.*, 1989). Além disso, podem ocorrer outros efeitos deletérios como perda de íons e redução da função das "bombas" de íons (De Leeuw *et al.*, 1988). No presente experimento, as alterações encontradas nos folículos congelados com DMSO e EG+DMSO parecem estar associadas um aumento da permeabilidade celular, o que levou ao aumento do espaço perinuclear, edema do retículo endoplasmático e expansão das cisternas do Complexo de Golgi, conferindo ao citoplasma um aspecto vacuolizado.

Os agentes crioprotetores são criosolventes que têm um efeito marcante nas células vivas, protegendo-as contra distorções de sua geometria e do ambiente, bem como, interagindo com sua composição química durante os processos de congelamento e descongelamento. De acordo com Fahy *et al.* (1986) a magnitude do efeito crioprotetor deve ser grande o bastante para que seu efeito seja significativo. Devido a natureza homeostática da célula viva, a perda de até 20% da função de uma determinada organela ou enzima talvez tenha pequenas consequências, no entanto, quando ocorrem lesões mais extensas, estas são causadas ou pela ausência de crioproteção ou pela toxicidade do crioprotetor. Neste sentido Baxter e Lathe (1971) relatam que os efeitos tóxicos dos crioprotetores são específicos e estão relacionados com a desestabilização de proteínas. Portanto, os dados observados, no presente experimento, nos folículos criopreservados com DMSO e EG+DMSO pode estar associados tanto a lesão de membrana por baixa eficiência crioprotetora, como com o efeito tóxico dos crioprotetores. Baseado nos resultados obtidos concluiu-se que o processo de criopreservação é detrimental aos folículos ovarianos e que embora todos os crioprotetores testados tenham alterado a morfologia folicular, o Etileno Glicol parece ser o crioprotetor menos lesivo e portanto, mais adequado para criopreservação do tecido ovariano de ovino. Apesar disso, a criopreservação de folículos pré-antrais parece ser uma alternativa interessante para a estocagem de um grande número de oócitos imaturos, já que estes possuem várias características que os tornam menos suscetíveis à crioinjúria do que os oócitos maduros tais como menor tamanho do oócito, baixa taxa metabólica, ausência de zona pelúcida, poucas organelas e pequena quantidade de lipídios.

## AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao abatedouro Suin Quality de São Manoel/SP e aos pós-graduandos do departamento de Reprodução animal da UNESP/Botucatu.

## Endereço para correspondência

Patrícia Miyuki Tsuribe  
Rua Manoel Pereira Rolla 18-50 Vila Universitária  
Bauru SP CEP 17012-190  
Tel (14) 3103-2121 ramal 2680/ (14)9783-8551  
email.: pmtsuribe@ig.com.br

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Apperley JF, Reddy N. Mechanisms and management of treatment related gonadal failure in recipients of high dose chemotherapy. *Blood* 1995; 9: 93-116.
- Aubard Y, Newton H, Scheffe G, Gosden RG. Conservation of the follicular population in irradiated rats by the cryopreservation and orthotopic autografting of ovarian tissue. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998; 79: 83-7.
- Baird DT, Webb R, Campbell BK, Harkness LM, Gosden RG. Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at -196°C. *Endocrinology* 1999; 140:462-71.
- Barros FV, Massote F, Sales L, Sampaio M, Geber S. Transplante ovariano autólogo em peritônio de ratas. *Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida*, Brasil 2001; 5(2): 60-3.
- Baxter SJ, Lathe GH. Biochemical effects on kidney of exposure to high concentrations of dimethyl sulphoxide. *Biochem Pharmacol* 1971; 30: 1079-91.
- Cortvrindt R, Smits J, Vansteirteghem AC. In vitro maturation, fertilization and embryo development of mature oocytes from early preantral follicles from prepubertal mice in a simplified culture system. *Hum Reprod* 1996; 11: 2656-66.
- De Leeuw FE, Colenbrander B, Verkleij AJ. Effects of low temperature on Bovine sperm plasma membrane. *Cryobiology* 1988; 25: 561-2.
- Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, Martinez-Madrid B, Van Langendonck A. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004; 364:1406-10.
- Eppig JJ. A comparison between oocyte growth in co-culture with granulosa cells and oocytes with granulosa cell-oocyte junctional contact maintained in vitro. *J Exp Zool* 1979; 209: 345-53.
- Fahy GM. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology* 1986; 23:1-13.
- Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C. *Hum Reprod* 1994; 9: 597-603.
- Guenasena KT, Villines PM, Critser ES, Critser JK. Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries. *Hum Reprod* 1997a; 12:101-6.
- Guenasena KT, Lakey JRT, Villines PM, Critser ES, Critser JK. Allogeneic and xenogeneic transplantation of cryopreserved ovarian tissue to athymic mice. *Biol Reprod* 1997b; 57:226-31.
- Hinkorska-Galcheva V, Petkova D., Koumanov K. Changes in the phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation. *Cryobiology* 1989; 26: 70-5.
- Lee DM. Live birth after ovarian tissue transplant. *Nature* 2004; 428:137-8.
- Newton H, Fisher J, Arnold JRP, Pegg DE, Faddy MY, Gosden RG. Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. *Hum Reprod* 1998; 13: 376-80.
- Oktay K, Newton H, Aubard Y, Salha O, Gosden RG. Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology? *Fertil. Steril* 1998; 69: 1-7.
- Petroianu A., Alberti L. R., Vasconcellos L. S. Allogeneic ovarian orthotopic transplantation in rabbits without a vascular pedicle: morphological, endocrinologic, and natural pregnancy assessment. *Transplant Proc* 2006; 38(9): 3092-3.
- Prates LFS, Massote F, Souza JHK, Geber S. Transplante autólogo de tecido ovariano para o peritônio de ratas após congelamento e descongelamento. *Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida* 2008; 12: 27-31.
- Rieger D, Bruyas JF, Lagneaux D. et al. The effect of cryopreservation on the metabolic activity of day 6,5 horse embryos. *J Reprod Fertil* 1991; Suppl. 44: 411-7.
- Sanders J, Hawley J, Levy W. Pregnancies following high-dose cyclophosphamide with or without high-dose busulphan or total body irradiation and bone marrow transplantation. *Blood* 1996; 87: 3045-52.
- Shaw JM, Cox SL, Trounson AO, Jenkin G. Evaluation of the long-term function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 161:1668-73.
- Wilson JM, Caceci T, Potter GD. et al. Ultrastructure of cryopreserved horse embryos. *J Reprod Fertil* 1987; Suppl. 35: 405-17.

# Resultados del co-cultivo de embriones sobre células endometriales autólogas en pacientes que realizan un primer procedimiento de reproducción asistida.

Resultado do co-cultivo de embriões sobre células endometriais autólogas em pacientes no 1º ciclo de reprodução assistida.

The use of autologous endometrial co-culture in patients attempting assisted reproduction (AR) techniques for the first time

V.Eyheremendy, F.G.E.Raffo, M. Papayannis, J. Barnes, C Granados, J Blaquier

Centro Médico FERTILAB, Buenos Aires, Argentina.  
Trabajo subsidiado por El Fondo tecnológico Argentino, FONTAR.

Presentado en el 9º Taller General Red latinoamericana de Reproducción Asistida  
Contacto: Maria Victoria Eyheremendy. victoriae@fertilab.com.ar

## RESUMEN

**Objetivos:** Analizar el efecto del co-cultivo autólogo endometrial sobre la calidad embrionaria, la tasa de embarazo y la tasa de implantación en pacientes que realizan un procedimiento de reproducción asistida por primera vez.

**Métodos:** Se analizaron 81 pacientes: grupo control 41, grupo de estudio (co-cultivo) 40.

La biopsia endometrial se obtuvo 7-10 días luego de la ovulación en algún ciclo previo al tratamiento. Las células endometriales aisladas, fueron criopreservadas. El día en que la paciente presentó el criterio para HCG las células endometriales son descongeladas y cultivadas. Los cigotos obtenidos fueron cultivados sobre la monocapa de células endometriales hasta el día 3 de desarrollo.

**Resultados:** En ambos grupos se analizó el porcentaje de embarazo según edad; 1) menores de 35 años control y con co-cultivo: 42% vs 67% ( $P < 0.0001$ ); 2) entre 36 y 39 años control y co-cultivo: 33% vs 61.5% ( $P < 0.0001$ ); 3) mayores de 40 años control y co-cultivo: 28.5% vs 55.5% ( $P < 0.0001$ ). También se evaluaron las causas de infertilidad y se observó una diferencia en el porcentaje de embarazo con co-cultivo en los pacientes que presentaban asociación de factor masculino y femenino como causa de infertilidad: 21% vs 63,6% ( $P < 0.0001$ ). Se observó una diferencia estadísticamente significativa al comparar la tasa de embarazo clínico y la tasa de implantación en ambos grupos: 36% vs 62 % ( $P < 0.0001$ ) y 20 % vs 34 % ( $P = 0.02$ ).

**Conclusiones:** La utilización de co-cultivo mejora las posibilidades de pacientes en su primer ciclo de reproducción asistida.

**Palabras claves:** Co-cultivo, endometrio, implantación, embarazo, reproducción asistida.

## RESUMO

**Objetivos:** Analisar o efeito do co-cultivo autólogo endometrial sobre a qualidade embrionária, a taxa de gravidez e a taxa de implantação em pacientes que realizam o procedimento de reprodução assistida pela primeira vez.

**Métodos:** Foram analisadas 81 pacientes: grupo controle 41, grupo de estudo (co-cultivo) 40.

A biopsia endometrial se deu 7-10 dias antes da ovulação em algum ciclo prévio ao tratamento. As células endometriais isoladas foram criopreservadas. No dia em que a paciente apresentou o critério clínico para o HCG, as células endometriais foram descongeladas e cultivadas. Os zigotos obtidos foram cultivados sobre a mono-camada de células endometriais até o dia 3 de desenvolvimento.

**Resultados:** Em ambos os grupos se analisou a porcentagem de gravidez segundo a idade; 1) menores de 35 anos controle e com co-cultivo: 42% vs 67% ( $P < 0.0001$ ); 2) entre 36 e 39 anos controle e co-cultivo: 33% vs 61.5% ( $P < 0.0001$ ); 3) maiores de 40 anos controle e co-cultivo: 28.5% vs 55.5% ( $P < 0.0001$ ). Também se avaliou as causas de infertilidade e se observou diferença na porcentagem de gravidez com co-cultivo nas pacientes que apresentavam associação de fator masculino e feminino como causa da infertilidade: 21% vs 63,6% ( $P < 0.0001$ ). Observou-se diferença estatisticamente significativa ao comparar a taxa de gravidez clínica e a taxa de implantação em ambos os grupos: 36% vs 62 % ( $P < 0.0001$ ) e 20 % vs 34 % ( $P = 0.02$ ).

**Conclusões:** A utilização de co-cultivo melhora as possibilidades de pacientes em seu primeiro ciclo de reprodução assistida.

**Palavras chaves:** Co-cultivo, endométrio, implantação, gravidez, reprodução assistida.

## ABSTRACT

**Objective:** to study the effect of endometrial cell co-culture (ECC) upon embryo quality, implantation and pregnancy rates (PR) in patients undergoing assisted reproduction treatment (ART) for the first time.

**Methods:** the population was composed of 81 patients. Forty one underwent conventional ART while 40 employed ECC simultaneously. The endometrial sample was obtained 7-10 days after ovulation in a previous cycle, purified, multiplied in culture and cryopreserved. Thawing was performed on the day of HCG and the embryos cultured on a monolayer of these cells until transfer on day 3.

**Results:** pregnancy rate for the entire population was 36% for control and 62% for ECC ( $P < 0.001$ ) and implantation rate 20% and 34% respectively ( $P < 0.02$ )

When segregated by age group PR were: below 35 years-old: control 42% and ECC 67% ( $P < 0.001$ ); 36 to 39 years-old: 33% and 61.5% respectively ( $P < 0.001$ ); 40 years old and older: 28,5% vs 55.5% ( $P < 0.001$ ). Regarding the cause of infertility, it was observed that in cases presenting both male and female factors, the results were 21% PR for control and 63,6 for ECC ( $P < 0.001$ ).

**Conclusion:** The use of ECC improves the possibility of obtaining pregnancy or those patients attempting ART for the first time.

**Key-words:** co-culture; endometrium, implantation, pregnancy , ART

## INTRODUCCION

Trabajos anteriores publicados por otros grupos y por nosotros (Spandorfer et al., 2004, Namita Kattal et al., 2008, Eyheremendy et al., 2007) demostraron el efecto beneficioso del co-cultivo sobre la tasa de implantación y embarazo en pacientes que habían realizado varios intentos previos fallidos de Reproducción Asistida.

Dado el éxito obtenido, la baja agresividad del método adicional empleado y su costo razonable fue que comenzamos este estudio piloto en el cual se comparan los resultados de FIV o ICSI en pacientes que lo intentan por primera vez y a quienes se les ofreció realizar el co-cultivo (CCEA).

Uno de los aspectos más importantes para el éxito de los procesos de reproducción asistida es obtener las condiciones adecuadas para el cultivo de embriones in vitro. Los factores tróficos específicos requeridos para que el embrión in vitro adquiera una capacidad de implantación y crecimiento similar a la que tiene in vivo, aún no son conocidos en su totalidad (Bongso et al., 1991, Bongso et al., 1999, Barnat et al., 1998).

Luego de años de experimentación en cultivo con diferentes especies animales y varios tipos celulares, algunos autores han publicado resultados alentadores del co-cultivo de embriones humanos con células somáticas endometriales, sobre el desarrollo de blastocistos y el aumento de las tasas de embarazo (Javot et al., 1995, Rubio et al., 2000, Mercader et al., 2003). Ciertas publicaciones incluso manifiestan la obtención de embriones con mayor cantidad de blastómeros y menor porcentaje de fragmentación (Barnat et al., 1998, Barnat et al., 1999) utilizando co-cultivo.

El desarrollo de un sistema donde las pacientes utilicen sus propias células endometriales hace que esta técnica de CCEA sea segura y factible para todas las pacientes. El objetivo de este trabajo es analizar el efecto del cultivo de embriones sobre una capa de células endometriales propias, en pacientes en su primer intento de reproducción asistida, midiendo la calidad embrionaria, la tasa de embarazo y la tasa de implantación

## MATERIALES Y METODOS

### Población del estudio:

Desde junio de 2007 hasta diciembre de 2008, seleccionamos un grupo 81 pacientes con indicación de Tratamiento de Reproducción Asistida (TRA) por primera vez. En este estudio no se utilizaron gametos donados.

Del total de pacientes, 40 optaron por realizar el CCEA y los restantes 41 hicieron el procedimiento convencional (grupo control). Los procedimientos de ambos grupos de pacientes fueron realizadas por el mismo cuerpo medico y de laboratorio en el mismo periodo de tiempo.

Métodos de reproducción asistida

Las 81 pacientes fueron tratadas con un protocolo de estimulación con FSH recombinante (a partir de Día 2), en distintas dosis según cada caso, y antagonistas de GnRh (a partir de un folículo de 14mm). La maduración final se indujo con HCG 10.000 UI cuando hubo al menos 3 folículos de 17 mm. La punción folicular se realizó a las 36 hs de la inyección de HCG.

El soporte de la fase lútea se realizó con progesterona 600 mg por día vía vaginal. Se realizaron métodos convencionales de FIV o ICSI según la patología del paciente. Los embriones obtenidos fueron transferidos a la paciente a las 72hs de la punción y los excedentes se criopreservaron para una futura transferencia.

El criterio utilizado para evaluar la calidad embrionaria es el de Bolton (Bolton et al., 1989) que toma en cuenta la presencia de fragmentos citoplasmáticos y el tamaño y cantidad de blastómeros en embriones de día 2 ó 3: el embrión tipo 4 es el de mejor morfología. Consideramos embriones de buena calidad aquellos con morfología 4 ó 3. Se considera embarazo clínico la presencia de un saco gestacional observado mediante ecografía, luego de cuatro semanas post-transferencia embrionaria. Los resultados se analizan sobre embarazos clínicos solamente.

### Cultivo de endometrio

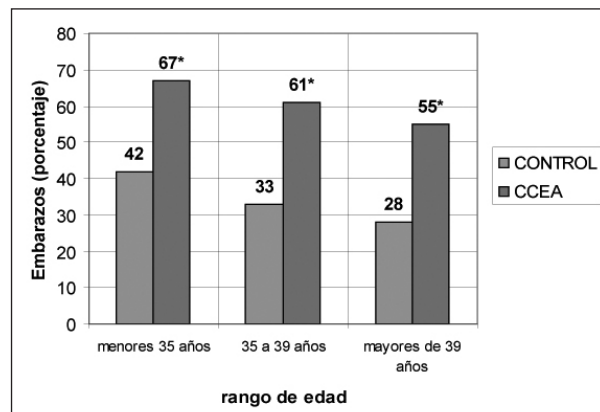
Las células se obtuvieron a partir de una biopsia de endometrio realizada entre 7 y 10 días luego de producida la ovulación, en un ciclo previo al procedimiento de reproducción asistida. El tejido se obtuvo por aspiración endometrial con la cánula externa de un Set de Frydman para transferencia de embriones (Short Frydman Set) (Spandorfer et al., 1998). Luego de separar una pequeña porción para su estudio histológico, el tejido se procesó según el método descripto por Spandorfer (Spandorfer et al., 2000) modificado. En resumen: el tejido se colocó en una cápsula con medio Hank's (Gibco 2402117) suplementado con Penicilina y Estreptomina, se cortó en pequeños trozos de 1 a 2 mm y estos fueron tratados con colagenasa al 0.2% (GIBCO 171005) a 37°C durante 5 minutos con agitación. Este procedimiento se realizó 4 veces, separándose los tipos celulares por gravitación: en el precipitado, células glandulares y en el sobrenadante, células estromales y pequeñas glándulas intactas, que fueron luego separadas por gravitación, durante 45 minutos para obtener células estromales purificadas. Se determina vitalidad (Azul Tripán) y recuento celular. Las células se cultivan en medio DMEM (Gibco 11995065) suplementado con suero fetal bovino (Gibco 1027006) durante 7 días a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Al final de este período las células se criopreservan, utilizando como crioprotector DMSO-dimetilsulfóxido (Sigma). El día anterior a la administración de HCG, se descongelan las células estromales y glandulares determinando sobrevida post-descongelamiento. Se cultivan ambos tipos celulares hasta llegar a confluencia. Los embriones se colocan sobre el cultivo

**Tabla 1.** Análisis de la población

	Control	CCEA	
Ovocitos MII/aspiración (promedio)	7,2±4.5	7±4.18	NS
Nº de embriones transferidos/paciente (promedio)	2.2±0.7	2.25±0.63	NS
Porcentaje de embriones de buena calidad	69,3%	87.5%	P<0.001
Porcentaje subunidad beta +	41,4 (17/41%)	70 (28/40%)	P<0.0001
Tasa embarazo clínico	15/41 (36,5%)	25/40 (62,5%)	P<0.0001
Tasa implantación	20/101 (19,8%)	31/90 (34%)	P=0.024

**Tabla 2.** Causas de esterilidad y su relación con el porcentaje de embarazo.

Causas de esterilidad	Control	CCEA	
	Nº % Embarazo	Nº % Embarazo	
Factores Femeninos (FF)	15 6/15(40%)	10 5/10 (50%)	NS
Factor masculino (FM)	12 6/12 (50%)	19 13/19(68%)	P<0.01
Factores combinados (FM+FF)	14 3/14 (21%)	11 7/11 (63,6%)	P<0.0001

**Gráfico 1.** Porcentaje de embarazo según la edad de las pacientes

\*P&lt;0.0001

en el estadio de pronúcleos. El medio utilizado en esta etapa es ECM (Irvine Scientific) suplementado con HSA (SAGE). Se incuban 72hs hasta la transferencia o criopreservación embrionaria.

### Análisis estadístico

Los datos presentados como media y su desviación estándar fueron analizados con un test no paramétrico, Wilcoxon Test, y su significancia con Test de Student. Los datos categóricos fueron comparados utilizando el Test de Fisher.

## RESULTADOS

### Análisis de la población

La edad promedio de las 41 pacientes control fue 35.6±4.1 años en tanto que la edad de las 40 pacientes que realizaron CCEA fue 35.27±4.63 años.

Análisis de la calidad embrionaria, las tasas de implantación y embarazo:

La Tabla 1 compara la media del número de ovocitos maduros obtenidos por aspiración, el promedio del número de embriones transferidos, el porcentaje de embriones con calidad tipo 4 y tipo 3, la tasa de embarazo clínico y la tasa de implantación.

Observamos que no existe diferencia en ambos grupos en cuanto a la respuesta a la inducción y a la media de embriones transferidos. Sin embargo la calidad embrionaria de las pacientes control fue menor a la de aquellas que efectuaron CCEA. Como consecuencia la tasa de embarazo y la tasa de implantación también fueron significativamente mayores en las pacientes de CCEA.

En la tabla 2 se muestran las diferentes causas de esterilidad en ambos grupos de pacientes y su porcentaje de embarazo clínico.

Dado el bajo nº de pacientes analizadas y que el tipo y número de las causa de esterilidad fueron estadísticamente no significativas en ambos grupos de estudio, agrupamos los diferentes factores femeninos (FF) y los diferentes factores masculinos (FM) para comparar el porcentaje de embarazo.

Los resultados de embarazo fueron mayores en todos los casos con co-cultivo. Pero solo el grupo con factores combinados, como causa de esterilidad, presento una diferencia estadística extremadamente significativa, en el porcentaje de embarazos.

En el gráfico 1 se analizan los resultados de la tasa de embarazo según la edad de las pacientes. Encontramos un aumento en la tasa de embarazo en todos los grupos de edades cuando los embriones fueron co-cultivados.

### CONCLUSIÓN

La gran mayoría de los trabajos de co-cultivo se han realizado en pacientes que han fallado en uno o más procedimientos de RA, o con el objeto de mejorar el medio de crecimiento embrionario para obtener un mayor número de blastocistos.

Nuestro trabajo explora que ocurre en pacientes que necesitan reproducción asistida, sin experiencias anteriores, transfiriendo embriones de 72 hs de desarrollo.

En el grupo de pacientes analizadas, se ha detectado una mejora en la calidad embrionaria, a diferencia de lo observado en las pacientes repetidoras (Eyheremendy et al., 2007). Esto podría tener relación con los controles utilizados en cada estudio: las pacientes de primera vez no se pueden comparar contra si mismas como ocurre con las pacientes repetidoras.

Cuando analizamos los resultados según la indicación médica para efectuar un TRA, encontramos que el co-cultivo beneficia levemente a aquellas causas de esterilidad relacionadas con los factores masculinos, pero el máximo beneficio se da en las parejas que tienen problemas masculinos y femeninos. Aquí el co-cultivo podría tener un efecto potenciador de la reparación del embrión principalmente cuando las gametas se han formado o almacenado en un ambiente inadecuado.

Aparentemente el cultivo de endometrio proporciona un ambiente mejorado para el desarrollo embrionario (Simon et al., 1995). Esto podría ser la explicar por que tanto pacientes jóvenes como añosas aumentan su tasa de embarazo e implantación en forma significativa con el

co-cultivo, dado que han utilizado el mismo medio de crecimiento e idénticas condiciones de laboratorio que el grupo control.

Se han postulado diversos mecanismos de acción del cocultivo: a detoxificación del medio de cultivo por las células de la monocapa (Spandorfer et al., 2004), metabolización de glucosa por las células somáticas, regulando su concentración de glucosa a niveles tolerables por el embrión, en sus diferentes etapas y la secreción de sustancias embriotróficas, por ejemplo el TGF- $\alpha$  (Transforming Growth Factor), TGF- $\beta$ 1 epidermal growth factor, PDGF- $\alpha$  (Platelet Derived Growth Factor) e IGF-I y II (Insulin Like Growth Factor) y GMC-CSF (Granulocyte macrophage colony stimulating factor) que tienen un efecto directo sobre el desarrollo embrionario. (Namita Kattal et al., 2008. Spandorfer et al., 2008. Spandorfer et al., 2001).

Es importante destacar la importancia del momento del ciclo de la paciente en que se toma la biopsia endometrial (Barnat et al., 2002). Algunas publicaciones reportan que los cocultivos originados de células endometriales obtenidas entre el día 5 y 12 después de la ovulación producen embriones con mejor tasa de implantación que los obtenidos en otros momentos del ciclo.

Nuestros resultados, si bien preliminares debido al pequeño número de pacientes analizadas, demuestran que la técnica de co-cultivo mejora las posibilidades de embarazo en pacientes que realizan tratamientos de reproducción asistida por primera vez.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barnat LI, Liu HC, Spandorfer SD, Veek L, Damario M, Rosenwaks Z : Human preembryo development on autologous endometrial coculture versus conventional medium. *Fertil Steril* 1998; 70: 1109 – 1113.

Barnat LI, Liu HC, Spandorfer SD :Autologous endometrial co-culture in patients with repeated failures of implantation after in vitro fertilization-embryo transfer. *J Assist Reprod Genet.* 1999;16:121-7.

Barnat LI, Liu HC, Spandorfer SD, Veek L, Damario M, Rosenwaks Z: Importance of the biopsy date in autologous endometrial cocultures for patients with multiple implantation failures. *Fertil Steril* 2002; 77: 1209-1213.

Bolton VN, Hawes SM: Development of spare human preimplantation embryos in vitro: an analysis of the correlations among gross morphology, cleavage rates and development to the blastocyst. *J In vitro Fert Embryo Transfer* 1989, 6: 30-35.

Bongso A, Ng SC, Fong C-Y, Ratman S: Cocultures: A lead in embryo quality improvement for assisted reproduction. *Fertil Steril* 1991; 67:120-122.

Bongso A : *Blastocyst Culture . Handbook*(1999).

Eyheremendy V, F.G.E.Raffo, M. Papayannis, J. Barnes, C Granados, J Blaquier. Centro Médico Beneficial effect of autologous endometrial cell coculture in patient with repeated implantation failure. *Fertil Steril* 2008 article in press.

Jayot S, Parneix I, Verdaguer S: Coculture of embryos on homologous endometrial cells in patient with repeated failures of implantation. *Fertil Steril* 1995, 63: 109-114.

Mercader A, Garcia-Velazco J, Escudero E, Remohi J, Pellicer A, Simon C : Clinical experience and perinatal outcome of blastocyst transfer after coculture of human embryos with human endometrial epithelial cells: *Fertil Steril* 2003, 80: 1162-1168.

Namita Kattal, M.D.,<sup>a</sup> Jerry Cohen, M.S., M.P.H.,<sup>b</sup> and Larry I. Barnat, M.D.<sup>c</sup>  
Role of coculture in human in vitro fertilization: a meta-analysis. *Fert Steril* 2008 article in press.

Rubio C, Simon C, Mercader A : Clinical experience employing co-culture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells. *Human Reprod* 2000; 15 (Suppl 6):31-8.

Simon C, Pellicer A : Interleukin-1 system crosstalk between embryo and endometrium in implantation. *Human Reprod* 1995;10 (Suppl1):11.

Spandorfer SD, Barnat LI, Liu HC, Mele C, Veek L, Rosenwaks Z: Interleukin-1: Granulocyte macrophage stimulating factor production by autologous endometrial co-culture is associated with outcome for IVF patient with a history of multiple implantation failures. *Am J Reprod Immunol* 1998; 40:377-381.

Spandorfer SD, Neuer A, Liu HC, Bivis L, Clarke R, Veek L, Rosenwaks Z: Interleukin-1 levels in the supernatant of conditioned media of embryos grown in autologous endometrial co-culture: Correlation with embryonic development and outcome for patient with a history of multiple implantation failures. *Am J Reprod Immunol* 2000;42:6-11.

Spandorfer SD, Navarro J, Levy D, Black AQR, Liu HC, Veek L, Witkin SS, Rosenwaks Z: Autologous endometrial co-culture in patient with IVF failures: Correlation of outcome with leukemia inhibiting factor (LIF) production. *Am J Reprod Immunol* 2001;46:375-380.

Spandorfer SD, Pascal P, Parks J, Clark R, Veek L, Davis OK, Rosenwaks Z: Autologous endometrial co-culture in patients with IVF failures Outcome of the first 1030 cases. *J Reprod Med.* 2004;49:463-7

# Eficácia da injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) de resgate após falha de fertilização *in vitro* convencional.

## Efficacy of rescue ICSI after conventional IVF failure

Sarah Nacheff, Aparecida dos Santos Canha, Agnes Mayumi Takahira, Gilberto da Costa Freitas, Artur Dzik, Mario Cavagna

Divisão de Reprodução Humana do Centro de Referência da Saúde da Mulher, Hospital Pérola Byington, São Paulo.

### RESUMO

**Objetivos:** Avaliar a eficiência da injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) de resgate em oócitos não fertilizados com a técnica de fertilização *in vitro* (FIV) convencional.

**Métodos:** Foram avaliadas, de janeiro de 2004 a julho de 2008, 46 pacientes submetidas a FIV convencional que tiveram ausência total de fertilização, no Centro de Referência de Saúde da Mulher. Os oócitos em metáfase II foram submetidos a reinseminação por ICSI, e os resultados foram avaliados.

**Resultados:** Em 661 ciclos de FIV realizados em casais sem fator masculino, falha completa de fertilização foi observada em 46 pacientes (6,95%). A idade média das pacientes foi de 35,9 anos. Entre 240 oócitos coletados, 204 eram MII (85%), e a ICSI de resgate foi realizada em 176 oócitos, aproximadamente 24 horas após a FIV inicial. Após a ICSI de resgate observou-se taxa de fertilização de 60,23% (n=106) e taxa de clivagem de 62,23% (n=66). A transferência de embriões foi realizada em 24 pacientes (52,17%). Duas gestações clínicas (saco gestacional com batimentos cardíacos) foram obtidas (8,33%), que resultaram em nascidos vivos. A taxa de implantação foi de 3%.

**Conclusões:** Apesar do limitado sucesso na taxa de implantação (3,0%) observado neste estudo, as taxas de fertilização (60,23%) e de clivagem (62,23%) sugerem que a ICSI de resgate após falha de FIV convencional pode ser um procedimento aceitável para evitar o cancelamento do ciclo. Postula-se que a ICSI de resgate associada ao diagnóstico genético pré-implantacional, que não foi feito neste estudo, possa melhorar os resultados do procedimento.

**Palavras chave:** ICSI de resgate, FIV, falha de fertilização.

### ABSTRACT

**Objectives:** The aim of this investigation is to evaluate the efficacy of rescue ICSI in mature oocytes after complete fertilization failure in conventional IVF.

**Methods:** We retrospectively evaluated the outcomes of reinsemination by ICSI in 46 patients who underwent conventional IVF cycles and who showed complete and unexplained fertilization failure, at the Women's Health Reference Center IVF Unit, São Paulo, Brazil, from January 2004 to July 2008.

**Results:** Among 661 IVF cycles performed in couples without male factor, complete fertilization failure was

observed in 46 patients (6.95%). The mean age of these patients was 35.9 years. Among 240 oocytes retrieved, 204 were MII (85%) and rescue ICSI was performed in 176 oocytes, approximately 24 hours after the initial IVF procedure. After rescue ICSI, the rates of fertilization and cleavage were 60.23% (n = 106) and 62.23% (n = 66), respectively. The embryo transfer was performed in 24 patients (52.17%). Two single clinical pregnancies (gestational sac with heartbeats) were achieved (8.33%), both of which resulted in live births. The implantation rate was 3.0%.

**Conclusions:** Despite the limited success of rescue ICSI in terms of implantation rate (3.0%) observed in this study, the rates of fertilization (60.23%), cleavage (62.23%) and clinical pregnancy (8.33%) suggest that emergency rescue ICSI after complete failure in conventional IVF can be performed in order to avoid cycle cancellation. It remains to be determined whether rescue ICSI in combination with preimplantation genetic diagnosis, which was not carried out in our study, would furthermore improve the results of this procedure.

**Key words:** rescue ICSI, IVF, failure of fertilization.

### INTRODUÇÃO

A injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) foi introduzida inicialmente, em casos de fator masculino grave de infertilidade, que não podiam ser beneficiados pela FIV convencional (Palermo *et al.*, 1992, van Steirteghem *et al.*, 1993, 1998). Atualmente, muitos serviços realizam a ICSI rotineiramente, enquanto outros grupos preferem a fertilização "in vitro" (FIV) convencional para os casos onde o fator masculino não se reveste de gravidade acentuada. A falha total de fertilização após FIV convencional, nos casos em que os espermatozóides apresentam-se com número, motilidade e morfologia adequados para tal técnica, é uma das mais frustrantes experiências para o casal infértil, bem como para a equipe de reprodução assistida. Uma alternativa, ainda mal avaliada, apesar de introduzida há mais de dez anos (Sjogren *et al.*, 1995; Tsigotis *et al.*, 1995), seria a reinseminação dos oócitos não fertilizados por ICSI, conhecida como ICSI de emergência ou ICSI de resgate. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência da ICSI de resgate nos casos de falha total da FIV convencional, observando-se as taxas de fertilização, clivagem, gravidez e implantação.

## MÉTODOS

Foram avaliados, retrospectivamente, os resultados da reinseminação por ICSI em 46 pacientes que apresentaram falha total de fertilização após FIV convencional, no setor de reprodução humana do Centro de Referência de Saúde da Mulher, em São Paulo, entre janeiro de 2004 a julho de 2008.

### Estimulação Ovariana e Captação Oocitária

Todas as pacientes foram submetidas a protocolo de estimulação ovariana controlada com bloqueio longo do eixo hipotálamo-hipofisário mediante a administração de análogo agonista do GnRH na forma de depósito (acetato de leuprolide 3,75 mg) entre o 18º e 22º dia do ciclo menstrual. A partir de janeiro de 2008, o protocolo foi modificado, passando-se a utilizar meia ampola de leuprolide para o bloqueio (1,875 mg). Após 14 a 20 dias do bloqueio, iniciou-se a estimulação ovariana, através da administração diária de 150 UI de gonadotropinas urinárias ou recombinantes (Gonal F® Serono, Brasil; Puregon®, Organon, Brasil; Merional®, Meizler, Brasil) em pacientes com menos de 35 anos, e 225 ou 250 UI de gonadotropinas urinárias ou recombinantes em pacientes com 35 anos ou mais. O desencadeamento da maturação folicular final foi realizado com 5.000 UI de gonadotropina coriônica humana (hCG), na presença de folículos com diâmetro máximo  $\geq 17$  mm. A aspiração folicular foi realizada por via ultrassonográfica, sob sedação, 35-36 horas após o hCG.

### Preparo de sêmen

O sêmen foi coletado por masturbação, após 2 a 5 dias de abstinência sexual, em frascos estéreis. O frasco com ejaculado foi colocado sobre placa aquecida (37°C) e examinado após liquefação de 30 minutos. Foram analisadas através da luz do microscópio (Nikon E200) amostras de 5  $\mu$ L de sêmen em câmara de Makler, para concentração ( $\geq 20$  milhões de espermatozoides/mL) e motilidade ( $\geq 50\%$  A+B) espermática. O processamento do sêmen foi realizado com a técnica de gradiente descontínuo de densidade, *Isolate* (Irvine Scientific). Após o preparo do sêmen, a amostra foi utilizada para FIV convencional e posteriormente, para ICSI de urgência, quando houve falha de FIV convencional.

### Fertilização in vitro convencional

Os oócitos foram lavados e colocados em placa *Nunc* (Falcon), com meio de cultivo HTF suplementado com 10% soro sintético substituto (Irvine Scientific) e deixados em incubadora com 5,5% de CO<sub>2</sub> e temperatura a 37°C. Após 3-4 horas de incubação, foram inseminados com 150 mil espermatozoides para cada oócito e colocados novamente em incubadora. A fertilização foi avaliada após 18 horas da inseminação, com a remoção das células do complexo cúmulus-corona do oócito com um delicado capilar afilado. A ausência dos dois pró-núcleos e do segundo corpúsculo polar no espaço perivitelíneo, foram provas de que a fertilização não ocorreu. Então a ICSI foi realizada nos oócitos em que houve falha de fertilização, e que se apresentavam em estágio de metáfase II.

### ICSI

Os oócitos em metáfase II foram micro injetados imediatamente após a observação da falha de fertilização. A técnica de ICSI foi realizada em microscópio invertido (Nikon) com aumento de 400 vezes equipado com óptica de Hoffman e micro manipulador Narashige (Narashige, Japão) utilizando micropipeta *holding* e micro agulha *injection* (Humagen Fertility Diagnostics, USA). Para

realizar a ICSI, uma placa de cultura foi preparada com três a quatro gotas centrais de 4  $\mu$ L de polivinilpirrolidone (PVP) (Irvine Scientific) e cinco gotas de 5  $\mu$ L HTF com hepes suplementado com 10% de soro sintético substituto (Irvine Scientific). Toda a placa foi coberta com óleo mineral (Irvine Scientific). Em duas gotas de PVP foram colocados 1  $\mu$ L da amostra de sêmen preparadas no dia da FIV convencional. Os oócitos foram colocados nas gotas de HTF com hepes suplementado com 10% de soro sintético substituto e então foi realizada ICSI. A micropipeta de injeção foi primeiramente introduzida em uma gota limpa de PVP para eliminar o óleo mineral que se introduziu por capilaridade. A seguir, foi colocada na gota de PVP com espermatozoides, selecionando nela um espermatozoide móvel, com aspecto morfológico normal e imobilizando-o mediante pressão e aspirando-o pela cauda. O oócito a ser injetado foi posicionado com uma ligeira sucção através da micropipeta *holding*, com o corpúsculo polar na posição 6 ou 12 horas, evitando-se desta forma que a pipeta de injeção transpasse a placa metafásica. Com o oócito posicionado corretamente, a micropipeta de injeção com o espermatozoide foi colocada próxima do oócito, atravessando a zona pelúcida e a membrana, até a micropipeta chegar no centro do ooplasma, onde com uma ligeira aspiração foi comprovado o rompimento da membrana, assegurando a presença do espermatozoide no interior do ooplasma. Após depositar o espermatozoide com a menor quantidade de PVP possível, delicadamente a micro agulha foi retirada do oócito e em seguida foi liberado pela micropipeta. A fertilização dos oócitos foi avaliada 18 horas após a ICSI de resgate. As clivagens foram avaliadas 48 e 72 horas após a realização da ICSI.

## RESULTADOS

Em 661 ciclos de FIV realizados em casais sem fator masculino grave, falha total de fertilização foi observada em 46 pacientes (6,95%). A média de idade das mulheres foi de 35,9 anos. Em 240 oócitos coletados (média: 5,2 por paciente), 204 (85%) encontravam-se em metáfase II (MII). A ICSI de resgate foi realizada em 176 oócitos, aproximadamente 24 horas após a falha inicial da FIV, obtendo-se fertilização em 106 oócitos (60,23%), e observando-se clivagem em 66 (62,23%). Foram realizadas transferências embrionárias em 24 mulheres (52,17%), com uma média de 2,75 embriões por paciente; o número de embriões transferidos variou de um a quatro. Houve duas gestações clínicas (sacos gestacionais únicos com batimentos cardíacos observados), que resultaram em nascidos vivos. A taxa de gravidez por transferência foi de 8,33%, e a taxa de gravidez entre as 46 pacientes que se submeteram à ICSI de resgate foi de 4,35%. A taxa de implantação foi de 3,0%.

## DISCUSSÃO

Dados da literatura referem taxa de falha de FIV convencional entre 10 e 25% (Chen *et al.*, 1995; Kuczynski *et al.*, 2002). Nossos resultados revelam falha total de fertilização em 6,95% dos casos sem fator masculino grave. A falha de fertilização nesses casos pode estar relacionada com fatores hormonais decorrentes do protocolo de estimulação ovariana utilizado (Benadiva *et al.*, 1999), defeitos nos espermatozoides (Kruger *et al.*, 1988; Liu & Baker, 2000), distúrbios na interação espermatozoide-oócito e anormalidades oocitárias (Bedford & Kim, 1993; Van Blerkom *et al.*, 1994; Zhivkova, 2003). A ausência de fertilização pressupõe anormalidades nos oócitos ou nos espermatozoides. Quando o sêmen se apresenta dentro dos parâmetros normais segundo o critério de avaliação,

um defeito morfológico não observado pode estar presente (Kruger *et al.*, 1988). A zona pelúcida do oócito desempenha um importante papel na barreira fisiológica e seleção dos espermatozoides morfológicamente normais. Liu & Baker (2000) confirmaram que a presença de anormalidade espermática é o fator mais frequente, contribuindo para o defeito na penetração e interação espermatozoide-zona pelúcida. Entretanto, Bedford & Kim (1993) sugerem que anormalidades no oócito podem determinar resistência na zona pelúcida à passagem de espermatozoides, causando um bloqueio que pode ser a principal causa da falha de fertilização. A incapacidade de espermatozoides aparentemente competentes para penetrar na zona pelúcida foi frequentemente associada com anomalias do ooplasma (um ou mais prónucleos, com um ou nenhum corpúsculo polar, e outras anormalidades ocasionais). Observaram, estes autores, que anomalias em 79,4% dos oócitos não fertilizados; por outro lado, 27,4% dos oócitos não fertilizaram devido a defeitos espermáticos.

Dados da literatura referem o sucesso da ICSI de resgate após falha de FIV convencional. As taxas de fertilização e gestação relatadas variam entre 24-48% e 6-20%, respectivamente (Sjogren *et al.*, 1995; Tsirigotis *et al.*, 1995; Morton *et al.*, 1997; Yuzpe *et al.*, 2000). Ressalte-se que Pehlivan *et al.* (2004) não recomendam a ICSI de resgate, em virtude de terem encontrado alta taxa de anormalidades cromossômicas nos embriões obtidos. DeUgarte *et al.* (2006) registram que a combinação de ICSI de resgate com diagnóstico genético pré-implantacional (PGD) poderia contornar esse problema e promover uma gravidez normal. Chen & Kattera (2003), em estudo utilizando a ICSI após 22 horas em oócitos com falha de FIV convencional, apresentaram taxa de fertilização de 48,5% e 5% de gestação. Esfandiari *et al.* (2008) relatam gravidez gemelar obtida após ICSI de resgate em oócitos de morfologia anormal não fertilizados por FIV convencional. Em nossos resultados, observamos taxas de fertilização (60,23%, n=53) e clivagem (62,23%, n=33), e duas gestações, que evoluíram para o termo (8,33%). A taxa de implantação obtida foi de apenas 3%. As baixas taxas de gravidez e implantação indicam que pode estar presente algum defeito intrínseco ou de desenvolvimento dos oócitos em casos de falha de fertilização após FIV com sêmen normal. Alterações oocitárias decorrentes do atraso da fertilização é provavelmente uma das razões para os maus resultados. Podemos concluir que, apesar do limitado sucesso na taxa de gestação (8,33%) confirmado neste estudo, as taxas de fertilização (60,23%) e de clivagem (62,23%) sugerem que realizar a ICSI após falha de FIV convencional pode ser um procedimento aceitável no laboratório de fertilização *in vitro*, evitando-se o cancelamento da transferência embrionária. A associação da ICSI de resgate com técnicas de PGD, que não foram utilizadas neste estudo, pode contribuir para a melhora dos resultados finais.

#### Correspondência para:

Mario Cavagna  
Avenida Brigadeiro Luís Antônio, 683, 4º andar.  
01317-001 - São Paulo, SP, Brasil.  
Telefone: (11) 3212-1210  
e-mail: mariocavagna@yahoo.it

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bedford JM, Kim HH. Sperm/egg binding patterns and oocyte cytology in retrospective analysis of fertilization failure in vitro.

Hum Reprod. 1993; 8: 453-63.

Benadiva CA, Nulsen J, Siano L, Jennings J, Givargis HB, Maier D. Intracytoplasmic sperm injection overcomes previous fertilization failure with conventional in vitro fertilization. Fertil Steril. 1999; 72: 1041-4.

Chen HL, Copperman AB, Grunfeld L, Sandler B, Bustillo M, Gordon JW. Failed fertilization in vitro: second day micromanipulation of oocytes versus reinsemination. Fertil Steril. 1995; 63: 1337-40.

Chen C, Kattera S. Rescue ICSI of oocytes that failed to extrude the second polar body 6 h post-insemination in conventional IVF. Hum Reprod. 2003; 18: 2118-21.

DeUgarte CM, Li M, Jordan B, Hill D, DeCherney A, Surrey M. Rescue intracytoplasmic sperm injection and preimplantation genetic diagnosis in combination can result in pregnancy. Fertil Steril. 2006; 86:200-2.

Esfandiari N, Claessens EA, Burjaq H, Gotlieb L, Casper RF. Ongoing twin pregnancy after rescue intracytoplasmic sperm injection of unfertilized abnormal oocytes. Fertil Steril. 2008; 90:199e5-7.

Kuczynski W, Dhont M, Grygoruk C, Pietrewicz P, Redzko S, Szamatowicz M. Rescue ICSI of unfertilized oocytes after IVF. Hum Reprod. 2002; 17: 2423-7.

Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. Fertil Steril. 1988; 49: 112-7.

Liu DY, Baker HWG. Defective sperm-zona pellucida interaction: a major cause of failure of fertilization in clinical in-vitro fertilization. Hum Reprod. 2000; 15: 702-8.

Morton PC, Yoder CS, Tucker MJ, Wright G, Brockman WD, Kort HI. Reinsemination by intracytoplasmic sperm injection of 1-day-old oocytes after complete conventional fertilization failure. Fertil Steril. 1997; 68: 488-91.

Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet 1992; 340:17-18.

Pehlivan T, Rubio C, Ruiz A, Navarro J, Remohí J, Pellicer A, Simón C. Embryonic chromosomal abnormalities obtained after rescue intracytoplasmic sperm injection of 1-day-old unfertilized oocytes. J Assist Reprod Genet. 2004; 21:55-7.

Sjögren A, Lundin K, Hamberger L. Intracytoplasmic sperm injection of 1 day old oocytes after fertilization failure. Hum Reprod. 1995; 10: 974-5.

Tsirigotis M, Nicholson N, Taranissi M, Bennett V, Pelekanos M, Craft I. Late intracytoplasmic sperm injection in unexpected failed fertilization in vitro: diagnostic or therapeutic? Fertil Steril. 1995; 63: 816-9.

van Blerkom J, Davis P, Merriam J. Fertilization and early embryology: A retrospective analysis of unfertilized and presumed parthenogenetically activated human oocytes demonstrates a high frequency of sperm penetration. 1994; 9: 2381-8.

van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smits J, Wisanto A, Devroey P. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 1993; 8: 1061-6.

Yuzpe AA, Liu Z, Fluker MR. Rescue intracytoplasmic sperm injection (ICSI)-salvaging in vitro fertilization (IVF) cycles after total or near-total fertilization failure. Fertil Steril. 2000; 73: 1115-9.

Zhivkova R. Ploidy and chromatin status of human oocytes after failed in vitro fertilization. Eur J Obstet Gyn Rep Biol. 2003; 109:185-9.

# América Latina e busca por reprodução assistida: perfil da paciente em um serviço público de referência no Rio de Janeiro (Brasil).

Latin America and search for assisted reproduction: the patient profile at a public reference in Rio de Janeiro (Brazil).

Tonia Costa <sup>1</sup>, Eduardo Navarro Stotz<sup>2</sup>, Ronir Luiz<sup>1</sup>, Maria do Carmo Borges de Souza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro

Bióloga, Doutora em Ciências, Professora Assistente IV

Estatístico. Professor Adjunto do Instituto de Estudos em Saúde Coletiva

Médica. Doutora em Ginecologia. Professora Adjunta IV

<sup>2</sup>Sociólogo, Doutor em Saúde Pública. Pesquisador Titular da Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.

**Instituição onde o trabalho foi realizado:** Instituto de Ginecologia – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

Apresentado no 9º Taller General da Redlatinoamericana de Reproducción Asistida- Cancún, 2009

Contato: Tonia Costa

E-mail: toniac@terra.com.br

## RESUMO

O objetivo deste estudo é definir o perfil da paciente em um hospital público, referência no Rio de Janeiro. Método- Estudo descritivo, transversal, de abordagem quantitativa. Foram selecionados, aleatoriamente, 20% do total de 1617 prontuários de pacientes de primeira consulta. Os dados foram registrados e analisados pelo Excel/ Office 2003 e SPSS versão 13.0. Resultados e conclusão: O perfil destas usuárias revela iniquidades no tocante ao direito à saúde reprodutiva. A maioria (73,2%) não tem filhos, a despeito de estar em idade reprodutiva (63,9% entre 26 e 35 anos). 65,8% já possuía história de busca por período entre 3 a 8 anos e 69,9% veio encaminhada pela rede pública. A análise das frequências dos diagnósticos encontrados nos registros dos prontuários revela maior incidência de fator tuboperitoneal (35,1%), reflexo do baixo nível sócio-econômico e/ou da carência/ insuficiência de atenção primária nas camadas populares. A apreciação mais ampla dos resultados aponta a necessidade de desenvolvimento de políticas públicas visando equidade em saúde reprodutiva, possibilitando o caminho para a efetiva democratização da vida social.

**Palavras-chave:** perfil de pacientes; equidade, políticas públicas, saúde reprodutiva.

**Objective:** This study aims at defining the patients' profile at a public hospital, reference in Rio de Janeiro. Method: This descriptive, transversal study, takes a quantitative approach. of 20% of the total of 1617 files of patients on first consultation. They were randomly selected. The data were registered and analyzed by Excel/ Office 2003 e SPSS version 13.0 software.

**Results and conclusion:** The profile of those patients reveals inequities related to the right to reproductive health. The majority (73,2%) do not have children, although they were in reproductive age (63.9% between 26 and 35 years). 65,8% searched for treatment around 3-8 years and 69.9% have been conducted by the Brazilian *public health system (SUS)*. Diagnostics' frequencies analysis shows a high incidence of tuboperitoneal factor (35,1%), as a consequence of low socio-economic level and/or the lack/ deficiency of primary care to popular classes. These results point the necessity of development of public politics aiming at equity in reproductive health, making possible the way to the effective democratization of social life.

**Key-words:** profile of patients; equity, public policy, reproductive health.

## INTRODUÇÃO

Embora a infertilidade seja uma doença que acomete cerca de 15% dos casais em idade reprodutiva (Abdallah & Merali, 2002), não vêm recebendo a devida atenção pelos serviços públicos brasileiros, nem sendo contemplada por políticas específicas. Há carência de dados acerca de centros de reprodução assistida e dos procedimentos realizados. Estima-se a existência de aproximadamente 120 centros, a maioria de iniciativa privada, localizados nas regiões sudeste, sul e centro-oeste. Do total de 26.664 registros da REDLARA em 2005, 45% dos ciclos se deu em território brasileiro (11.859 ciclos) (Souza, 2008).

Ainda que os números sejam expressivos e que os poucos serviços públicos recebam pacientes até mesmo de outros estados, há insuficiência de dados sistema-

tizados acerca de quem é a paciente que recorre aos serviços públicos de reprodução assistida no país (Souza, 2008; Okazaki, 2002). Tais informações seriam de suma importância para o desenvolvimento de políticas públicas relacionadas a aquisição e/ou manutenção da saúde reprodutiva humana.

O objetivo deste estudo foi sistematizar dados pessoais e relativos à história clínica da busca por solução para a infertilidade em um serviço público de referência na cidade e no estado do Rio de Janeiro. Assim, por meio de análise documental, configurou-se o perfil das usuárias.

## METODOLOGIA

A pesquisa configura-se como Estudo descritivo, transversal, de abordagem quantitativa (Luiz et al., 2005; Arango, 2005). Todas as pacientes do Hospital Universitário onde o estudo foi desenvolvido, com prontuário de "primeira vez" entre janeiro de 2003 e dezembro de 2005 integraram o universo pesquisado. Foram selecionados, aleatoriamente, 20% do total de 1617 prontuários de pacientes de primeira consulta (prontuário zero), configurando amostra aleatória simples (Bolfarine & Bussab, 2005), assim estruturada: 89 prontuários do ano de 2003, 118 de 2004 e 120 de 2005, totalizando 327.

Para o perfil demográfico, as variáveis consideradas foram: (1) idade, (2) locais de residência (classificados segundo o plano estratégico da cidade do Rio de Janeiro, elaborado pela Prefeitura Municipal), acrescidos de localidades da Baixada fluminense, Niterói e outros municípios do Rio de Janeiro.

A (3) atividade laboral foi classificada em população ativa (AE) ou não ativa economicamente (NAE), distribuída em subclasses da Classificação Nacional de Atividades Econômicas (CNAE 2,0, aprovada pela Comissão Nacional de Classificação – CONCLA) (IBGE, 2006). Em relação à (4) escolaridade, foi considerado o período em que a paciente frequentou a escola regularmente, categorizado em anos de estudo.

Quanto à história da saúde reprodutiva da paciente, foram considerados: tempo de tentativa, se chegou ao serviço encaminhada ou por demanda espontânea, se havia histórico de abortos e os diagnósticos.

As categorias endometriose e laqueadura tubária/suspeita de laqueadura foram destacadas em separado, a princípio com a finalidade de dimensionar cada um dos diagnósticos. Sobre a laqueadura/suspeita de laqueadura há relatos na literatura sobre seu arrependimento (Machado et al., 2005), motivo pelo qual as pacientes buscaram o serviço.

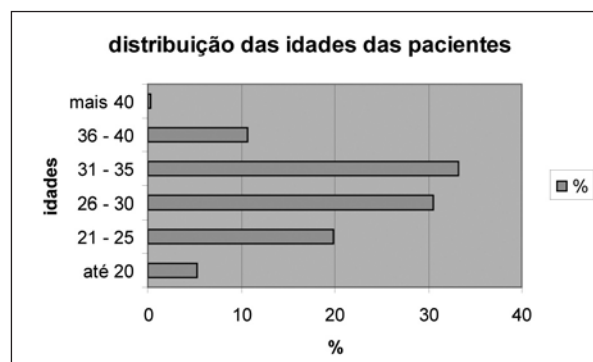
A pesquisa foi realizada seguindo as rotinas e normas do Hospital Universitário, com seu consentimento e aprovação. Não houve danos aos sujeitos participantes. Todas assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), segundo as normas preconizadas pela Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CONEP, 1996).

Os dados dos prontuários foram registrados e arquivados em ordem numérica, segundo a data da coleta. Posteriormente integraram um banco de dados no programa Excel/Office 2003 e no *Special Program for Social Sciences* (SPSS) versão 13,0 com todas as variáveis descritas anteriormente. Foi feita a distribuição das frequências das variáveis para definir o perfil da paciente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil das usuárias demonstra que 63,9% possuem idades entre 26 e 35 anos (gráfico e tabela1):

**Gráfico 1.** distribuição das idades das pacientes

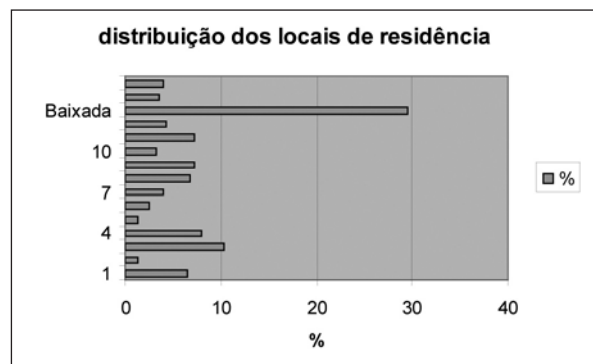


**Tabela 1.** percentuais das idades das pacientes

Idade (anos)	%
até 20	5,2
21 - 25	19,9
26 - 30	30,6
31 - 35	33,3
36 - 40	10,7
mais de 40	0,3

Dentre as pacientes, 29,5% residem na Baixada fluminense; 10,4% na região de Campo Grande; 7,9% na do Centro; 7,2% na da Leopoldina ou Norte; 6,8% na de Jacarepaguá e 6,5% na de Bangu (gráfico e tabela 2):

Gráfico 2. Distribuição dos locais de residência das pacientes, segundo plano estratégico do Rio de Janeiro, elaborado pela Prefeitura Municipal do Rio de Janeiro (disponível em <<http://www.rio.rj.gov.br/planoestrategico/>>).



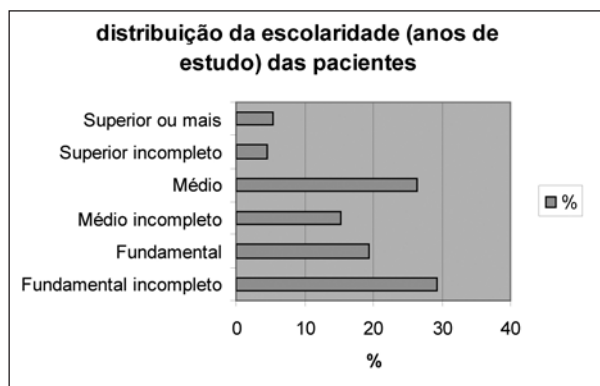
**Tabela 2.** Percentuais dos locais de residência das pacientes segundo 12 planos estratégicos elaborados pela Prefeitura Municipal do RJ e acrescidos da região da baixada fluminense, Niterói e outros municípios do Rio de Janeiro.

residência	%
1	6,5
2	1,4
3	10,4
4	7,9
5	1,4
6	2,5
7	4,0
8	6,8
9	7,2
10	3,2
11	7,2

12	4,3
Baixada	29,5
Niterói	3,6
outros municípios	4,0

Do total das pacientes, 29,3% têm até 7 anos de estudo, o que corresponde ao Ensino Fundamental incompleto, sendo uma analfabeta e 26,3% têm 11 anos de estudo, ou seja, concluíram o Ensino Médio (gráfico e tabela 3).

**Gráfico 3.** distribuição da escolaridade das pacientes (segundo período em que freqüentou a escola regularmente, categorizados em anos de estudo).

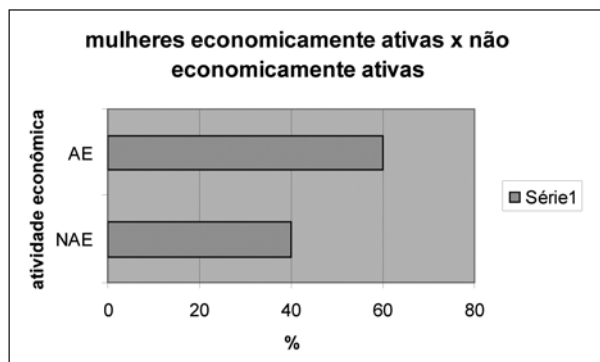


**Tabela 3** Percentuais de escolaridade das pacientes.

escolaridade	%
Fundamental incompleto	29,3
Fundamental	19,3
Médio incompleto	15,2
Médio	26,3
Superior incompleto	4,5
Superior ou mais	5,3

Com relação à atividade econômica, aproximadamente 40% das pacientes são não ativas economicamente (NAE), conforme ilustram o gráfico e a tabela 5.4, a seguir:

**Gráfico 4.** Distribuição dos percentuais de mulheres economicamente ativas (AE) e de não ativas economicamente (NAE).

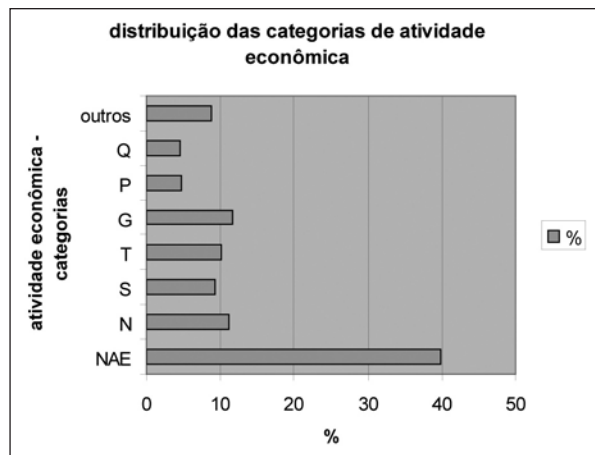


**Tabela 4.** Comparação entre mulheres quanto à atividade econômica (subclasses da Classificação Nacional de Atividades Econômicas - CNAE 2,0 aprovada pela Comissão Nacional de Classificação - CONCLA) e população não ativa economicamente (NAE).

NAE	39,9
AE	60,1

Cerca de 60% são ativas economicamente (AE), exercendo atividades administrativas e serviços complementares (11,2%), serviços domésticos (10,1%), trabalhando no comércio (11,6%), no setor de serviços (9,3%) e nas áreas de educação (4,8%) e de saúde humana e serviços sociais (4,5%), segundo demonstrado no gráfico e tabela 5:

**Gráfico 5.** distribuição das categorias de atividade econômica (subclasses da Classificação Nacional de Atividades Econômicas - CNAE 2,0 aprovada pela Comissão Nacional de Classificação - CONCLA/ IBGE, 2006).

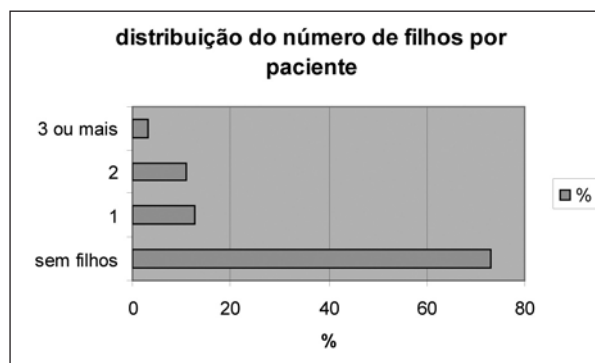


**Tabela 5.** percentuais de categorias profissionais das pacientes ativas economicamente (segundo a categorização da CONCLA/ IBGE, 2006).

profissão	%
NAE	39,9
N	11,2
S	9,3
T	10,1
G	11,6
P	4,8
Q	4,5
outros	8,8

A maioria das mulheres (73%) não tem filhos ou têm um (12,6%) ou dois (11,2%), dados apresentados no gráfico e tabela 6:

**Gráfico 6.** Distribuição do número de filhos por paciente.



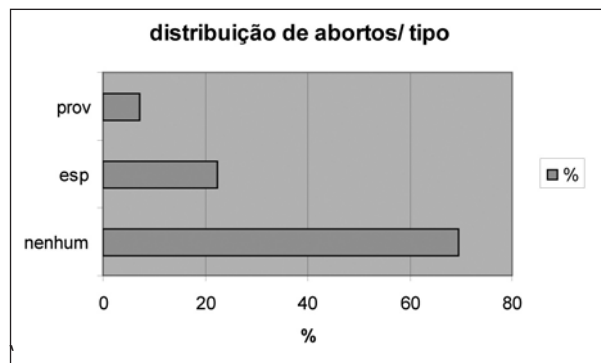
**Tabela 6.** Percentuais do número de filhos por paciente.

filhos	%
sem filhos	73,2
1	12,6

2	11,1
3 ou mais	3,1

Do total, 69,6% das mulheres não sofreu abortos ou estes foram espontâneos (22,3%). Apenas 7,3% das pacientes os provocaram (gráfico e tabela 7).

**Gráfico 7.** Distribuição de abortos ocorridos nas pacientes, por tipo.

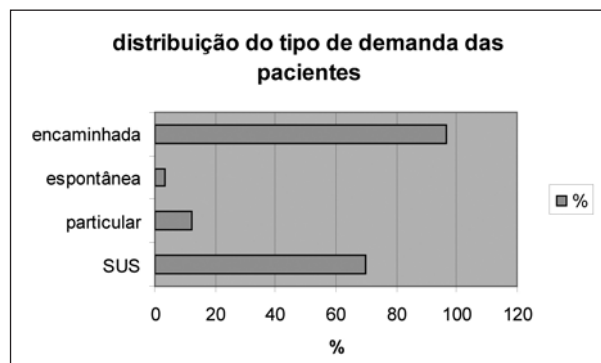


**Tabela 7.** percentuais da ocorrência e dos tipos de abortos sofridos pelas pacientes.

abortos	%
nenhum	69,6
espontâneos	22,3
provocados	7,3

A grande maioria (96,5%) veio encaminhada por outros serviços. Embora em 14,5% das pacientes não tenha sido possível identificar a origem, 69,9% era proveniente do Sistema Único de Saúde. Apenas 3,5% vieram por demanda espontânea (gráfico e tabela 8).

**Gráfico 8.** Distribuição da demanda das pacientes.

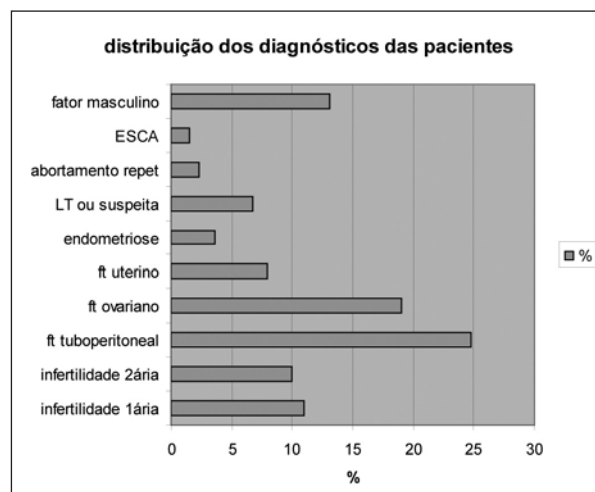


**Tabela 8.** percentuais dos tipos de demanda das pacientes.

demanda	%
SUS	69,9
particular	12,1
espontânea	3,5
encaminhada	96,5

Do total, 65,8% das mulheres declarou estar buscando tratamento por período entre 3 a 8 anos. Quanto aos diagnósticos para a infertilidade, o gráfico e a tabela 5.9. ilustram a predominância dos de fator tuboperitoneal (24,8%), ovariano (19,0%) ou masculino (13,1%). Se forem incluídas as pacientes laqueadas e os diagnósticos de endometriose, o fator tuboperitoneal responde por 35,1%.

**Gráfico 9.** Distribuição dos diagnósticos das pacientes



**Tabela 9.** percentuais dos diagnósticos de infertilidade das pacientes.

Diagnóstico	%
infertilidade 1 <sup>ária</sup>	11,0
infertilidade 2 <sup>ária</sup>	10,0
ft tuboperitoneal	24,8
ft ovariano	19,0
ft uterino	8,0
endometriose	3,6
LT ou suspeita	6,7
abortamento repet	2,3
ESCA	1,5
fator masculino	13,1

## 6. CONCLUSÃO

A análise do perfil das usuárias deste serviço, referência na cidade do Rio de Janeiro revela iniquidades no tocante ao direito à saúde reprodutiva. A maioria (73%) não tem filhos, a despeito de estar em idade reprodutiva (63,9% na faixa entre 26 e 35 anos). Cerca de 65,8% já possuía história de busca por período entre 3 a 8 anos, ou seja, já havia transitado por outro(s) serviço(s), especializados (ou não), públicos ou privados.

Aproximadamente 95% chegou ao Hospital Universitário mediante encaminhamento por outros locais de atendimento. Em 69,9% dos casos, pela rede pública, ou seja, pelo próprio Sistema Único de Saúde (SUS). Os dados diferem do estudo de Gobbi (2002), em que a maioria – 41,7% – decorria de demanda espontânea.

A análise das freqüências dos diagnósticos encontrados nos registros dos prontuários das pacientes revela a maior incidência de fator tuboperitoneal (35,1%). Este achado está de acordo com os estudos de Meirelles et al. (2001) e de Franco et al. (1999), que corroboram este fator como causa mais freqüente de infertilidade. A maior prevalência dentre as camadas populares é ressaltada por Luna (2001), reflexo do baixo nível sócio-econômico e da carência/ insuficiência de atenção primária. Estas condições explicam a recorrência de processos inflamatórios pélvicos e conseqüente infertilidade.

A apreciação mais ampla dos resultados aponta para a necessidade de desenvolvimento de políticas públicas no sentido de promover a discussão para equidade em saúde reprodutiva, minimizando disparidades evitáveis e seus determinantes (Fonseca, 2005; Almeida et al., 2005), possibilitando o caminho para a efetiva democratização da vida social.

A identificação de que os centros públicos em sua maioria estão ligados às Universidades e apresentam dificuldades/ deficiência de recursos em todos os níveis, permite o reconhecimento do comprometimento pessoal para que muitos se mantenham (Souza, 2008).

Assim, a implementação de políticas permitirá o equacionamento das atividades dos centros já existentes, seu aparelhamento e ampliação, mas sobretudo a articulação entre diferentes áreas do saber, visando a formação de profissionais melhor qualificados para trabalhar em reprodução assistida na vertente da promoção da saúde. Assim sendo, bem qualificados tecnicamente e comprometidos com a justiça social e com a aquisição/ resgate da cidadania da população assistida.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdallah SD, Merali Z. Infertility and social suffering: the case of art in developing countries. In: Vayena E, Rowe PJ, GRIFFIN PD. Current practice and controversies in assisted reproduction. WHO. 2002; 1: 15-21.
- Almeida NAM, Silva LA, Araújo NM. Conhecimento de acadêmicas de enfermagem sobre disfunções sexuais femininas. *Revista Eletrônica de Enfermagem*. 07(2): 138-147, 2005. Disponível em <<http://www.fen.ufg.br>>. Acessado: 15/02/2009.
- Arango HG. Bioestatística teórica e computacional. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.
- Brasil. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Resolução 196/96 – Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas envolvendo Seres Humanos, 1996. [online]. Brasil; 1996. Disponível em <http://conselho.saude.gov.br/comissao/conep/resolucao.html>. Acessado: 13/01/2006.
- Bolfarine H, Bussab WO. Elementos de amostragem. São Paulo: Edgard Blucher; 2005.
- Fonseca, RMGS. Equidade de gênero e saúde das mulheres. *Rev Esc Enferm USP*. 2005; 39(4):450-9.
- Franco RC, Ferreira RA, Romão GS, Ferriani RA, Sala MM. Avaliação de pacientes más respondedoras em um programa de reprodução assistida. *Reprod. Clim.* 1999; 14(4): 195 – 9.
- Gobbi DR. O sonho da maternidade: representação social de mulheres que vivenciaram abortamentos recorrentes. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo – Escola de Enfermagem. São Paulo; 2002.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (IBGE). Comissão Nacional de Classificação (CONCLA). Classificação Nacional de Atividades Econômicas (CNAE) Subclasses 2,0. [online] Brasil; 2006. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/concla/>. Acessado: 02/01/2006.
- Luiz RR, Costa AJL, Nadanovsky P. Epidemiologia e estatística na pesquisa odontológica. Rio de Janeiro: Atheneu; 2005.
- Luna F. Reproducción asistida y "sabor local": contexto y mujer in Latinoamérica. *Bioética*. 2001; 9(2): 83 – 98.
- Machado KMM, Ludermit AB, Costa AM. Mudanças na estrutura familiar e arrependimento da laqueadura tubária. *Cadernos de Saúde Pública*. 2005 nov-dez; 21 (6).
- Meirelles AJC; Cavalcante JCW.; Sakiyama MAK.; Souza MJS. Incidência de fatores etiológicos de infertilidade em pacientes do Serviço de reprodução Humana da Universidade federal do Pará/ Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará. *Rev. Para. Méd.* 2001; 15 (1): 54 – 8.
- Okazaki ELFJ. Perfil biológico e social das parturientes do Hospital Geral do Grajaú. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Santo Amaro para obtenção do título de Mestre em Saúde Materno Infantil. São Paulo; 2002.
- Prefeitura Municipal do Rio de Janeiro. Plano Estratégico do Município. [online] Rio de Janeiro, Brasil; 2006. Disponível em: <http://www.rio.rj.gov.br/planoestrategico/>. Acessado: 01/09/2006.
- Souza MCB. Current Practice of management of infertility in low-resource settings: a Brazilian perspective. Apresentado no "Assisted Reproductive Technologies: Common Terminology and Management in Low-Resource Settings". World Health Organization WHO/ ICMART/ LIVFF –2008; Geneve, December 2-4.

# Uso dos marcadores da reserva e variáveis da resposta ovariana à estimulação gonadotrófica como preditores da implantação embrionária em ciclos de ICSI

## Use of ovarian reserve markers and variables of response to gonadotropic stimulus as predictors of embryo implantation in ICSI cycles

Bruno Ramalho de Carvalho <sup>1,2,4</sup>, Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva <sup>1,3</sup>, Júlio César Rosa e Silva <sup>1</sup>, Rosana Maria dos Reis <sup>1</sup>, Rui Alberto Ferriani <sup>1</sup>, Marcos Felipe Silva de Sá <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Setor de Reprodução Humana, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo.

<sup>2</sup> Genesis – Centro de Assistência em Reprodução Humana, Brasília, Distrito Federal.

<sup>3</sup> Correspondência: Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia – 1º andar, Av. Bandeirantes, 3900, Campus da Universidade de São Paulo, Bairro Monte Alegre, Ribeirão Preto, São Paulo, CEP: 14.048-900, Telefone: (16) 3602-2926, E-mail: anasars@fmrp.usp.br.

### RESUMO

**Objetivo:** Avaliar a capacidade preditiva da implantação embrionária dos marcadores de reserva folicular e das variáveis da resposta ovariana ao estímulo com gonadotrofinas exógenas em ciclos de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). **Métodos:** Foram prospectivamente avaliados 45 ciclos de ICSI em mulheres com idade  $\leq 38$  anos, ciclos menstruais regulares, sem patologias endócrinas ou endometriose, com fator masculino exclusivo, com ambos os ovários e sem tratamento hormonal recente. A reserva ovariana foi inferida pelas dosagens basais dos hormônios anti-mülleriano (AMH), estradiol (E2) e folículo estimulante (FSH) e a resposta ao estímulo, pela contagem dos folículos dominantes no dia da hCG, do total de oócitos aspirados e de oócitos morfologicamente maduros. Curvas *Receiver Operating Characteristic* (ROC – AUC) foram traçadas para avaliação da capacidade discriminatória de cada variável em identificar implantação embrionária. **Resultados:** nenhum dos marcadores de reserva ovariana apresentou capacidade discriminatória significativa de implantação embrionária. Entre as variáveis de resposta ovariana, foram significativas as capacidades discriminatórias do número de folículos dominantes no dia da hCG (ROC-AUC = 0,748;  $p < 0,01$ ) e do número total de oócitos aspirados (ROC-AUC = 0,665;  $p < 0,05$ ). **Conclusões:** A avaliação da resposta ovariana a partir da contagem de folículos dominantes no dia de administração da hCG e do total de oócitos aspirados parece trazer alguma perspectiva quanto à predição da implantação embrionária em mulheres submetidas a ICSI.

### PALAVRAS-CHAVE

Infertilidade; ICSI; Reserva Ovariana; Resposta Ovariana; Reprodução Assistida; FSH; AMH; Estradiol.

### ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the potential to predict embryo implantation from endocrine markers of follicular reserve and variables of ovarian response to exogenous gonadotropic stimulus in cycles of intracytoplasmic sperm injection (ICSI). **Methods:** We prospectively evaluated 45

ICSI cycles in women with 38 years of age or less, regular menstrual cycles, with no endocrine diseases or endometriosis, with male factor of infertility, with both ovaries and no recent hormonal treatment. Ovarian reserve was assessed by basal measurements of estradiol, follicle-stimulating hormone and anti-müllerian hormone, and ovarian response to stimulus was assessed by dominant follicles count in the day of hCG administration, total number of oocytes retrieved from follicular aspiration and the number of morphologically mature oocytes retrieved. *Receiver Operating Characteristic* curves (ROC – AUC) were obtained to determine discriminatory capacity of each variable to identify embryo implantation. **Results:** None of ovarian reserve markers presented significant capacity to predict embryo implantation. Among the variables of ovarian response, we observed significant capacity of dominant follicles in the day of hCG administration (ROC-AUC = 0,748;  $p < 0,01$ ) and of the total number of oocytes retrieved (ROC-AUC = 0,665;  $p < 0,05$ ) to assess embryo implantation. **Conclusions:** The evaluation of ovarian response by dominant follicles count in the day of hCG the total number of oocytes retrieved seems to be of good perspective in regard to prediction of embryo implantation in women submitted to ICSI.

### KEYWORDS

Infertility; ICSI; Ovarian Reserve; Ovarian Response; Assisted Reproduction; FSH; Estradiol; AMH.

### INTRODUÇÃO

O aumento na prevalência dos quadros de infertilidade e a procura cada vez maior por técnicas de reprodução assistida (TRA) exigem da equipe assistencial esforços contínuos na melhoria do aconselhamento, o que inclui estimativas das chances de gestação. Conquanto não garanta o “bebê em casa” de fato, o diagnóstico hormonal de gestação pode sinalizar tratamento bem sucedido, mas os marcadores propedêuticos atualmente disponíveis não são efetivos nessa predição (Broekmans et al., 2006; Carvalho et al., 2008).

**Tabela 1.** Capacidade de predição de gestação de marcadores de reserva e resposta ovariana em ciclos de ICSI.

	Valor de corte	ROC-AUC	p	Sensibilidade	Especificidade
E2 (ng/mL)	> 53,1	0,59	NS	40	88
FSH (UI/mL)	> 6,26	0,504	NS	55	64
AMH (pmol/L)	> 14,05	0,532	NS	50	64
Folículos ≥ 18 mm (n)	> 03	0,748	0,0014	73,7	70,8
Oócitos (n)	> 07	0,665	0,046	65	68
Oócitos MII (n)	> 03	0,646	NS	85	44

Legenda: E2 = Estradiol basal; FSH = Hormônio Folículo-Estimulante basal; AMH = Hormônio Anti-Mülleriano basal; ROC-AUC = Área sob a curva do tipo Receiver Operating Characteristic. Sensibilidade e especificidade expressas em porcentagens. NS = Não significativo. Nível de significância  $p < 0,05$ . ROC-AUC = 1,0 resultado da perfeita capacidade do teste para prever a ocorrência de gestação e ROC-AUC = 0,5 resultado da ausência completa da capacidade discriminatória.

A falta de uniformidade na caracterização do que seria a resposta ovariana adequada ao estímulo em TRA é um dos principais fatores para a dificuldade em se determinar um bom preditor de sucesso no tratamento; é possível, contudo, que não os marcadores de reserva, mas as variáveis da resposta ovariana estejam melhor relacionadas aos resultados em TRA, traduzindo a saúde oocitária necessária à formação de embriões de boa qualidade. Seja para a resposta avaliada pelo crescimento folicular (Jenkins et al., 1991; Evers et al., 1998), seja para as distintas contagens de oócitos aspirados após estímulo (Bancsi et al., 2002; Elgindy et al., 2008; Klinkert et al., 2005; La Marca et al., 2007; Luna et al., 2008), não encontramos na literatura, contudo, bastantes estudos associando-os à ocorrência de gestação após TRA, ainda que elementos sinalizadores da boa resposta, como a contagem de folículos antrais, tenham sido, de algum modo, relacionados ao sucesso gestacional (Muttukrishna et al., 2005).

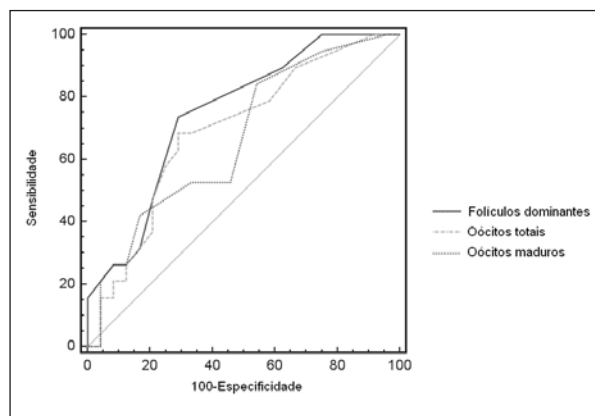
O objetivo deste estudo, assim, foi avaliar e comparar as capacidades dos marcadores endócrinos da reserva folicular e das variáveis da resposta ovariana ao estímulo com gonadotrofinas exógenas de predição da ocorrência de gravidez em ciclos de TRA de alta complexidade.

## METODOLOGIA

### A. Casuística

Entre junho de 2006 e fevereiro de 2008, foram prospectivamente avaliados 278 ciclos consecutivos de indução de ovulação para procedimentos de reprodução assistida no serviço de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. A execução deste estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição e todas as pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido concordando com o uso dos dados obtidos dos ciclos de TRA a que se submeteram em pesquisa.

Os critérios de inclusão neste estudo foram: (1) infertilidade primária ou secundária, associada exclusivamente a fator masculino; (2) idade  $\leq 38$  anos; (3) ciclos menstruais com 23 a 32 dias de duração; (4) presença de ambos os ovários; (5) ausência de doenças endócrinas com possível efeito deletério sobre a função reprodutiva (doenças tireoidianas, hiperprolactinemia, anovulação hiperandrogênica, alterações do metabolismo glicídico); (6) ausência de endometriose confirmada por videolaparoscopia diagnóstica realizada nos doze meses antecedentes ao início do estudo; (7) eleição da técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI); (8) ausência de tratamento hormonal nos três meses antecedentes à inclusão no estudo.



**Figura 1.** Áreas sob as curvas do tipo Receiver Operating Characteristic (ROC-AUC) para folículos  $\geq 18$  mm no dia da hCG (dominantes), total de oócitos aspirados e oócitos maduros aspirados.

Preencheram os critérios de inclusão 50 ciclos, tendo sido posteriormente excluídos do estudo 3 ciclos em cujas pacientes apresentavam antecedente de cirurgia ovariana com perda tecidual (em razão da possível interferência negativa sobre a reserva folicular ovariana) e 2 ciclos em cujas pacientes apresentavam volumosos cistos ovarianos de aspecto folicular à ultrassonografia transvaginal basal. Como casuística final do estudo, foram estudados, assim, 45 ciclos consecutivos de ICSI.

### B. Avaliação da reserva ovariana

Foram coletadas amostras de sangue entre o 3º e o 5º dia do ciclo menstrual prévio ao início da indução de ovulação. Após serem centrifugadas, os respectivos soros foram armazenados em temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  para dosagem em único momento dos níveis basais do hormônio folículo-estimulante (FSH), do estradiol (E2) e do hormônio anti-mülleriano (AMH). O E2 basal foi determinado por quimioluminescência (Immulate 2000, DPC, USA), com coeficiente de variação intra-ensaio de 2,95%. O FSH basal foi determinado por quimioluminescência (Immulate 2000, DPC, USA), com coeficientes de variação interensaios de 2,9% a 4,2% e intra-ensaio de 4,2%. A dosagem do AMH basal foi realizada por teste imunoenzimático ultrasensível – ELISA (Immunotech Inc, France), com coeficientes de variabilidade inter e intra-ensaios de 14,2% e 12,3%, respectivamente.

### C. Protocolo de tratamento

Todas as pacientes iniciaram uso de contraceptivo hormonal oral combinado (COC) após a coleta das amostras de sangue. Na fase médio-luteal do ciclo imediatamente

te antecedente à data programada para início do tratamento, iniciava-se a inibição hipofisária pela administração subcutânea diária de 10 UI acetato de leuprolida (Lupron® - Abbott). Após 10 dias de uso do análogo do GnRH, suspendia-se o uso do COC e, com a ocorrência do fluxo menstrual, realizava-se a avaliação ultrassonográfica basal bidimensional por aparelho ATL HDI 3000 (ATL Ultrasound, Bothel, WA, USA), com sonda endovaginal na frequência de 4,0 a 9,0 MHz.

A estimulação ovariana era iniciada após a avaliação ultrassonográfica, com doses diárias de folitrofina recombinante (Gonal-F® - Merck Serono, Germany) ou de gonadotrofina pós-menopausal purificada (Menopur® - Ferring Pharmaceuticals, Switzerland), com monitoração ultrassonográfica endovaginal a partir do sétimo dia de tratamento e, quando necessário, reajuste individualizado das doses por protocolo *step-down*. A administração subcutânea da gonadotrofina coriônica recombinante (hCG-r) (Ovidrel® - Merck Serono, Germany), em dose única de 250µg para indução de ovulação, era realizada quando dois ou mais folículos dominantes monitorados atingiam diâmetro médio  $\geq 18$  mm. A aspiração folicular para captação oocitária era realizada pela via endovaginal, 36 horas após a administração da hCG-r.

#### D. Avaliação da resposta ovariana

A resposta ovariana à estimulação foi aferida a partir: (a) do número de folículos com diâmetro médio  $\geq 18$  mm no dia de administração da hCG (folículos dominantes); (b) do número total de oócitos aspirados 36 horas após a administração da hCG; e (c) do número de oócitos morfolologicamente maduros (presença de um corpúsculo polar extruso) aspirados 36 horas após a administração da hCG.

#### D. ICSI, transferência embrionária e diagnóstico de gravidez

Após período de incubação de 2 a 6 horas e banho de 30 a 60 segundos em solução de hialuronidase, procedia-se a remoção desta e das células do *cumulus*, e classificação dos oócitos quanto ao grau de maturação; em todos os casos, a ICSI foi realizada nos oócitos morfolologicamente maduros. A ocorrência da fertilização foi confirmada em tempo de 14 a 20 horas após a ICSI, pela presença de dois pró-núcleos e dois corpúsculos polares.

As transferências embrionárias (TE) foram realizadas utilizando-se cateter do tipo *Frydman*, no segundo dia (D2) — para os casos com até três embriões obtidos — ou terceiro dia (D3) após a ICSI, adotando como critérios para escolha dos melhores embriões o número de células (quatro células em D2, oito células em D3), a simetria entre os blastômeros e a taxa de fragmentação destes. Em nenhum dos casos houve transferência de quantidade superior a três embriões.

O diagnóstico de gravidez foi realizado pela dosagem sérica de  $\beta$ -HCG no 14º dia após a realização da TE.

#### E. Análise estatística

As capacidades para predição da implantação embrionária dos marcadores de reserva e resposta ovariana foram aferidas a partir do traçado de curvas tipo Receiver Operating Characteristic (ROC), a partir das quais se estabeleceram as áreas sob as curvas (ROC-AUC), valores de corte, sensibilidade e especificidade. Para tanto, utilizou-se o programa MedCalc versão 9.3.7.0 (2007), considerando-se ROC-AUC = 1,0 resultado da perfeita capacidade do teste para predizer a ocorrência de gestação e ROC-AUC = 0,5 resultado da ausência completa de tal capacidade discriminatória. A significância dos

resultados foi estabelecida pelo  $\alpha = 0,05$ . Por se tratar de análise retrospectiva de prontuários referentes a todos os ciclos de TRA realizados no período selecionado, não foi realizado cálculo amostral.

## RESULTADOS

A idade média das pacientes incluídas no estudo foi de  $33,33 \pm 4,4$  anos (variação de 24-38 anos) e o índice de massa corporal (IMC) médio, de  $24,11 \pm 3,73$  kg/m<sup>2</sup>. Para estimulação, a dose média de FSH recombinante utilizada foi de 2015  $\pm$  710 UI. Os níveis médios dos marcadores basais de reserva ovariana foram: E2 =  $64,85 \pm 89,13$  pg/mL; FSH =  $6,56 \pm 2,56$  UI/mL; e AMH =  $14,74 \pm 12,67$  pmol/L. Após o estímulo, houve o crescimento médio de  $4,1 \pm 2,56$  folículos dominantes e foram aspirados em média  $9,0 \pm 5,9$  oócitos, sendo  $5,38 \pm 3,14$  oócitos morfolologicamente maduros.

A partir das curvas traçadas para E2 (ROC-AUC = 0,59;  $p > 0,05$ ), FSH (ROC-AUC = 0,504;  $p > 0,05$ ) e AMH (ROC-AUC = 0,532;  $p > 0,05$ ), não observamos capacidade de predição de gravidez para os marcadores de reserva ovariana. Entre as modalidades de resposta ovariana ao estímulo gonadotrófico exógeno, o número de folículos dominantes no dia de administração da hCG foi a mais significativamente capaz de predizer a ocorrência de gestação (ROC-AUC = 0,748;  $p < 0,01$ ), com sensibilidade de 73,7 % e especificidade de 70,8% para contagens superiores a três unidades. O número total de oócitos aspirados também apresentou capacidade preditiva de gestação (ROC-AUC = 0,665;  $p < 0,05$ ), mas com sensibilidade e especificidade menos expressivas (Tabela 1). As áreas sob as curvas para variáveis de resposta ovariana estão representadas na Figura 1.

## DISCUSSÃO

Com este estudo, sugerimos que a contagem de folículos dominantes no dia da administração da hCG e o número total de oócitos aspirados podem predizer a ocorrência da implantação embrionária em ciclos de ICSI, o que não se observa para marcadores da reserva ovariana ou número de oócitos morfolologicamente maduros.

O papel dos marcadores séricos da reserva ovariana na predição de sucesso em ciclos de reprodução assistida tem sido questionado e não existe um consenso sobre a verdadeira aplicabilidade dos diversos marcadores na prática clínica. Quanto à capacidade de predizer especificamente a ocorrência de gestação, vários estudos encontrados não foram capazes de suportar utilidade para marcadores como E2 (Scott et al., 1989; Licciardi et al., 1995; Smotrich et al., 1995), FSH (van Montfrans et al., 2000; Klinkert et al., 2005; van der Steeg et al., 2007; Luna et al., 2007) e AMH (Gnoth et al., 2008).

No caso do FSH basal, um dos marcadores mais estudados para propedêutica em TRA (Silberstein et al., 2006), Watt et al. determinaram valor de corte basal de 11,1 mUI/mL, acima do qual não ocorreria gestação; não avaliaram, contudo, a resposta folicular propriamente dita e por se tratarem de ciclos de FIV, alterações no espermograma podem ter interferido negativamente nos resultados (Watt et al., 2000). Ashrafi et al., por sua vez, constataram que mulheres submetidas a FIV apresentando níveis de FSH  $\geq 15$  UI/mL tiveram menos oócitos aspirados e maior número de ciclos cancelados (Ashrafi et al., 2005), concordando com os resultados de Klinkert et al., que sugeriram taxas menores de gestação (mas sem significância) para os níveis referidos (Klinkert et al., 2005).

Embora os estudos mencionados tenham sugerido que FSH  $\geq 15$  UI/mL esteja relacionado diretamente ao mau prognóstico de gravidez em TRA, a ocorrência de gravi-

dez foi demonstrada em aproximadamente metade das mulheres com FSH > 12,5 UI/L (van Montfrans et al., 2000) e Luna et al. demonstraram que as taxas de gravidez em mulheres < 35 anos e FSH basal elevado foram melhores que as de mulheres mais velhas, com níveis normais da gonadotrofina (Luna et al., 2007), reforçando que a idade é superior ao hormônio como ferramenta propedêutica.

É plausível acreditar que a resposta ovariana ao estímulo gonadotrófico exógeno apresente capacidade de prever a ocorrência de gestação superior à apresentada por marcadores de reserva ovariana ou características da paciente. Infelizmente, estudos fazendo essa avaliação são escassos na literatura. Roest et al. demonstraram que o sucesso em ciclos de fertilização *in vitro* (FIV) está melhor relacionado à qualidade da resposta ao estímulo que à idade da mulher (Roest et al., 1996). Acreditamos no desenvolvimento folicular como o principal variável de resposta ovariana ao estímulo exógeno e, assim, na sua adoção como um dos principais critérios de sucesso em RA, por não sofrer interferências de eventuais dificuldades na aspiração oocitária ou perdas de oócitos durante o esvaziamento do cateter e a manipulação laboratorial. Nosso estudo corrobora nossa crença ao demonstrar que o número de folículos dominantes realmente pode prever a ocorrência de implantação embrionária em ciclos de ICSI; mas não contradiz a tendência atual de se considerar o número de oócitos aspirados como critério de sucesso em ciclos de RA, já que houve significância da capacidade dessa variável na predição da implantação, embora com ROC-AUC pouco expressiva. Discordando dos nossos dados, o estudo retrospectivo de Ng et al. apontou taxas de implantação e gestação independentes do número de folículos dominantes no dia de administração da hCG em ciclos de fertilização *in vitro* (Ng et al., 2006).

Não se pode deixar de apontar as limitações deste estudo: (1) a possível interferência do fator masculino de infertilidade na ocorrência de gravidez, embora todas as pacientes tenham sido submetidas a ICSI, o que supostamente reduz significativamente a interferência do fator masculino sobre os resultados finais; e (2) a amostra limitada de ciclos/pacientes, podendo se tornar mais claro o papel dos preditores de implantação embrionária quando estudados em maior número de casos.

Concluindo, marcadores de reserva ovariana podem ser ferramentas propedêuticas importantes no aconselhamento de casais inférteis candidatos a ciclos de RA, mas sua capacidade de prever a ocorrência de gestação não pôde ser demonstrada neste estudo. Entretanto, a avaliação das variáveis de resposta, principalmente a contagem de folículos dominantes no dia de administração da hCG exógena, parece trazer alguma perspectiva quanto à predição da ocorrência de gravidez, caracterizando-se como importante elemento do aconselhamento ao casal e do acompanhamento da paciente pela equipe médica.

#### Endereço para Correspondência:

Bruno Ramalho de Carvalho, Genesis - Centro de Assistência em Reprodução Humana, Centro Clínico Sul - Ala Leste, SHLS 716, Bloco "L", Salas "L" 328/331, Brasília, Distrito Federal, CEP: 70.390-907, Telefone: (61) 3345-8030, E-mail: bruno@genesis.med.br.

Não houve ou há conflitos de interesse para a divulgação deste trabalho.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ashrafi M, Madani T, Tehranian AS, Malekzadeh F. Follicle stimulating hormone as a predictor of ovarian response in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation for IVF. *Int J*

*Gynaecol Obstet.* 2005;91:53-7.

Bancsi LFJMM, Broekmans FJM, Eijkemans MJC, de Jong FH, Habbema JDF, te Velde ER. Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil Steril.* 2002;77:328-36.

Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update.* 2006;12:685-718.

Carvalho BR, Rosa e Silva ACJS, Rosa e Silva JC, Reis RM, Ferriani RA, Silva de Sá MF. Ovarian Reserve Evaluation: State of the art. *J Assist Reprod Gen.* 2008; 25:311-22.

Cole LA, Ladner DG, Byrn FW. The normal variabilities of the menstrual cycle. *Fertil Steril.* 2009;91:522-7.

Elgindy EA, El-Haieg DO, El-Sebaey A. Anti-Müllerian hormone: correlation of early follicular, ovulatory and midluteal levels with ovarian response and cycle outcome in intracytoplasmic sperm injection patients. *Fertil Steril.* 2008;89:1670-6.

Evers JL, Slaats P, Land JA, Dumoulin JC, Dunselman GA. Elevated levels of basal estradiol-17beta predict poor response in patients with normal basal levels of follicle-stimulating hormone undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1998;69:1010-4.

Gnoth C, Schuring AN, Friol K, Tigges J, Mallmann P, Godehardt E. Relevance of anti-Müllerian hormone measurement in a routine IVF program. *Hum Reprod.* 2008; 23:1359-65.

Jenkins JM, Davies DW, Devonport H, Anthony FW, Gadd SC, Watson RH, Masson GM. Comparison of 'poor' responders with 'good' responders using a standard buserelin/human menopausal gonadotrophin regime for in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1991;6:918-21.

Klinkert ER, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD, te Velde ER. The antral follicle count is a better marker than basal follicle-stimulating hormone for the selection of older patients with acceptable pregnancy prospects after in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2005;83:811-4.

La Marca A, Giulini S, Tirelli A, Bertucci E, Marsella T, Xella S, Volpe A. Anti-Müllerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts ovarian response in assisted reproductive technology. *Hum Reprod.* 2007;22:766-71.

Licciardi FL, Liu HC, Rosenwaks Z. Day 3 estradiol serum concentrations as prognosticators of ovarian stimulation response and pregnancy outcome in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1995;64:991-4.

Luna M, Grunfeld L, Mukherjee T, Sandler B, Copperman AB. Moderately elevated levels of basal follicle-stimulating hormone in young patients predict low ovarian response, but should not be used to disqualify patients from attempting in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2007;87:782-7.

Ng EH, Yeung WS, Ho PC. Patients with three or less dominant follicles may not be associated with reduced pregnancy rate of in vitro fertilization treatment. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006;129:54-9.

Roest J, van Heusden AM, Mous H, Zeilmaker GH, Verhoeff A. The ovarian response as a predictor for successful in vitro fertilization treatment after the age of 40 years. *Fertil Steril.* 1996;66:969-73.

Scott RT, Toner JP, Muasher SJ, Oehninger S, Robinson S, Rosenwaks Z. Follicle-stimulating hormone levels on cycle day 3 are predictive of in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril.* 1989;51:651-4.

Silberstein T, MacLaughlin DT, Shai I, Trimarchi JR, Lambert-Messerlian G, Seifer DB, Keefe DL, Blazar AS. Müllerian inhibiting substance levels at the time of HCG administration in IVF cycles predict both ovarian reserve and embryo quality. *Hum Reprod.* 2006;21:159-63.

Smotrich DB, Widra EA, Gindoff PR, Levy MJ, Hall JL, Stillman RJ. Prognostic value of day 3 estradiol on in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril.* 1995;64:1136-40.

van der Steeg JW, Steures P, Eijkemans MJC, Habbema JDF, Hompes PGA, Broekmans FJ, Bouckaert PXJM, Bossuyt PMM, van der Veen F, Mol BWJ. Predictive Value and Clinical Impact of Basal Follicle-Stimulating Hormone in Subfertile, Ovulatory Women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:2163-8.

van Montfrans JM, Hoek A, van Hooft MH, de Koning CH, Tonch N, Lambalk CB. Predictive value of basal follicle-stimulating hormone concentrations in a general subfertility population. *Fertil Steril.* 2000;74:97-103.

Watt AH, Legedza ATR, Ginsburg ES, Barbieri RL, Clarke RN, Hornstein MD. The prognostic value of age and follicle-stimulating hormone levels in women over forty years of age undergoing in vitro fertilization. *J Assist Reprod Gen.* 2000;17:264-8.

# Avaliação comparativa do rFSH preenchido por bioensaio versus rFSH preenchido por massa em inseminação intra-uterina.

## A comparison between rFSH filled-by bioassay and rFSH filled-by-mass in intrauterine insemination.

Martha de Moraes Calvente Bulus<sup>a,b</sup>, Maria do Carmo Borges de Souza<sup>a,b</sup>, Ana Cristina Allemand Mancebo<sup>a</sup>, Gutemberg Leão de Almeida Filho<sup>a</sup>, Carlos André Henriques<sup>a</sup>, Kátia Silveira da Silva<sup>c</sup>

<sup>a</sup> G&O Barra, RJ. Reprodução Humana

<sup>b</sup> Instituto de Ginecologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro

<sup>c</sup> Departamento de Pesquisa Clínica do Instituto Fernandes Figueira- Fiocruz, RJ.

### RESUMO

**Objetivo:** Este estudo retrospectivo teve por objetivo comparar as taxas de gravidez e resultados da estimulação ovariana utilizando rFSH preenchido por massa ou preenchido por bioensaio para inseminação intra-uterina (IIU) em casais com ESCA e fator masculino leve/moderado.

**Métodos:** Foram analisados 51 ciclos de pacientes que utilizaram rFSH bioensaio e outros 51 ciclos de pacientes que utilizaram rFSH preenchido por massa. A estimulação ovariana foi iniciada com 75UI de rFSH em dias alternados a partir do 3º dia do ciclo com ajustes de 37,5UI a 75UI quando necessário. O hCG recombinante (rhCG) foi utilizado na presença de pelo menos um e no máximo 3 folículos pré-ovulatórios ( $\geq 18\text{mm}$ ). A IIU foi realizada 30-40 horas após o uso de rhCG.

**Resultados:** As taxas de gravidez por ciclo e gravidez por paciente foram respectivamente 9,8% e 10,9% no grupo que utilizou rFSH bioensaio, 5,8% e 7,7% no grupo que utilizou rFSH preenchido por massa, não sendo estatisticamente significativas ( $p=0,71$  e  $0,84$  respectivamente). Não foi encontrado diferença no resultado da estimulação ovariana entre os grupos: dose média de rFSH utilizada assim como o número de folículos entre 14 e 17mm, número de folículos  $\geq 18\text{mm}$ , espessura endometrial no dia do hCG e dosagens de estradiol e LH no dia do hCG.

**Conclusão:** Não encontramos diferença nas taxas de gestação entre os grupos que utilizaram rFSH preenchido por bioensaio ou preenchido por massa.

Os resultados da estimulação ovariana nos dois grupos também não foram capazes de mostrar diferença no uso de uma ou outra formulação.

**Palavras chaves:** Inseminação intra-uterina, FSH recombinante, gonadotrofinas.

### ABSTRACT

**Objective:** The aim of this retrospective study was to compare the pregnancy rates and characteristics of ovarian stimulation between rFSH filled by mass or filled by bioassay for intrauterine insemination in couples with unexplained and male subfertility.

**Methods:** We assessed 51 cycles of patients that had used rFSH bioassay and 51 cycles of patients that had used rFSH filled-by-mass. Ovarian stimulation was

performed with 75 UI of rFSH every other day from cycle day 3. Dose adjust was made when necessary with 37,5-75 UI rFSH. Intrauterine insemination was performed 30-40 hours after recombinant hCG (rhCG). The presence of at least one and maximum of three follicles  $\geq 18\text{mm}$  was the criteria for using r hCG.

**Results:** Pregnancy rates per cycle and per patient were respectively 9,8% and 10,9% in the rFSH bioassay group, 5,8% e 7,7% in the rFSH filled-by-mass group, with no significance ( $p=0,71$  and  $0,84$ ). Also, we did not find differences between ovarian stimulation characteristics: rFSH total doses, follicles between 14-17mm, follicles  $\geq 18\text{mm}$ , endometrial thickness on hCG day, estradiol and LH dosages on hCG day.

**Conclusion:** We did not find differences in pregnancy rates when using rFSH filled-by -mass or rFSH filled-by-bioassay. The ovarian stimulation characteristics were similar between the two groups.

**key words:** Intrauterine insemination, gonadotrophins, recombinant FSH.

### INTRODUÇÃO

A estimulação ovariana controlada com medicações melhora a taxa de fecundidade por ciclo (ou seja, a possibilidade de gestar em 1 ciclo definido) em parte por aumentar o número de folículos disponíveis para serem fertilizados pelos espermatozoides e também corrigindo possíveis disfunções ovulatórias na mulher em tratamento. Combinada com a inseminação intra-uterina, a estimulação ovariana tem sido recomendada para casos de infertilidade, quando não há comprometimento tubário (Hugues et al, 1998; Guzick et al, 1999).

Para a estimulação ovariana, atualmente dispõe-se de diversos fármacos sendo que os que apresentam melhores resultados por estimularem diretamente a produção de estrogênio pelos folículos ovarianos são as gonadotrofinas. As mesmas têm sido utilizadas por mais de 30 anos para produzir a ovulação em mulheres inférteis (Requeña et al, 2003). Em 1960, Lunenfeld e cols publicaram a primeira gravidez obtida depois da estimulação com gonadotrofina menopáusic humana (HMG).

As primeiras gonadotrofinas sintetizadas eram derivadas da urina de mulheres pós menopausadas (HMG) e

possuíam em sua formulação concentrações de FSH e LH em proporções semelhantes (MACKLON, 2005). Na década de 80, um medicamento mais purificado denominado gonadotrofina urinária purificada (u-FSH) foi introduzido no mercado. Este possuía menor proporção de LH em relação ao conteúdo de FSH porém ainda em quantidades significativas. (SHOHAM & YUVAL, 2002). O FSH é o hormônio gonadotrófico chave durante a fase folicular e os níveis excessivos de LH nesta fase podem produzir efeitos negativos sobre as taxas de fecundação e gravidez. No final de 1970 foram desenvolvidas técnicas de filtragem em gel que foram capazes de obter FSH altamente purificado (u-hFSH) com o que se conseguia um alto grau de pureza do produto, sem conter LH. Apesar de resultados clínicos adequados com relação a estimulação ovariana, as gonadotrofinas urinárias tem sua produção limitada por depender da coleta de grande quantidade de urina. Além disso acabava por conter FSH em concentrações variáveis e com proteínas contaminantes em quantidades também variáveis o que poderia determinar riscos maiores de complicações como síndrome de hiperestímulo ovariano (SHO) e multigestelaridade.

Com o advento da tecnologia recombinante, foi possível a síntese de FSH recombinante (r-FSH). O FSH recombinante provém de uma linha celular ovariana de hamster chinês à qual se incorporaram os genes que codificam as duas subunidades do FSH. O resultado é uma molécula altamente purificada, semelhante ao FSH humano, e completamente desprovida de atividade LH (LE COTONNEE, 1994). Além de ter sua produção ilimitada, se provou mais segura de ser utilizada e tem resultados clínicos superiores às gonadotrofinas urinária. As gonadotrofinas recombinantes, assim como as urinárias eram estimadas em sua atividade por Unidades Internacionais (UI). Inicialmente, esta tecnologia trouxe o FSH com 99% de pureza, porém trazia ainda uma inconsistência dos lotes em relação a quantidade exata de FSH por ampola, podendo variar entre 10 a 25%. Isto significava que uma ampola fabricada com o conteúdo de 75UI poderia variar sua atividade biológica entre 60 e 94UI (HUGUES, 2005). Isto acontecia porque os preparados de FSH podiam ser preenchidos e liberados apenas através do bioensaio de Steelman-Pohley, onde o método para determinação da bioatividade era a realização de um bioensaio de ganho de peso *in vivo*, com ratos.

A partir de 2004, uma nova tecnologia substituiu com sucesso o bioensaio por uma técnica analítica altamente precisa, chamada Cromatografia Líquida de Alta Performance com Exclusão por Tamanho (*Size Exclusion High Performance Liquid Chromatography*, SE-HPLC). Desta forma, foi eliminada a variabilidade intrínseca do bioensaio em ratos e foi garantida uma alta consistência de lote para lote e de frasco para frasco do conteúdo de r-hFSH, sendo a variabilidade desta técnica de apenas  $\pm 2\%$  (DRIEBERGEN & BAER, 2003). A potência do r-hFSH passou a ser expressa em unidades de massa ( $\mu\text{g}$ ), onde uma ampola de 75UI equivale a 5,5 $\mu\text{g}$ . O processo de Preenchimento por Massa (Fbm- *filled by mass*) ao reduzir a variabilidade intrínseca associada com o bioensaio, tem sido associado com melhor consistência da resposta clínica.

Souza e cols. em 2002 já haviam levantado a possibilidade do uso das gonadotrofinas em doses mais baixas, em dias alternados, padronizando este protocolo para indução da ovulação para coito programado ou para IIU.

A comparação dos resultados clínicos observados neste estudo visou buscar evidências da importância da mudança de tecnologia na fabricação desta medicação.

## MÉTODOS

Neste estudo longitudinal retrospectivo comparativo foi realizada a análise de 102 ciclos de 83 pacientes inférteis que realizaram inseminação intra-uterina (IIU) na clínica G&O Barra, clínica privada no Rio de Janeiro entre o período de dezembro de 2001 a dezembro de 2008. Estas 83 pacientes foram divididas em dois grupos de acordo com o tipo de FSH recombinante (Gonal F®-Serono) utilizado na estimulação ovariana: FSH recombinante preenchido por massa (r-FSH Fbm) ou FSH recombinante bioensaio (r-FSH bio). Como os lotes de FSH recombinante preenchido por massa começaram a ser distribuídos no Brasil em março de 2004, as pacientes que realizaram inseminação intra-uterina antes deste ano foram incluídas no grupo r-FSH bio, enquanto as que realizaram inseminação após 2004 foram incluídas no grupo r-FSH Fbm.

Todas as pacientes que participaram do estudo apresentavam idade inferior ou igual a 38 anos, diagnóstico de infertilidade masculina leve a moderada de acordo com a OMS (concentração de espermatozoides móveis após a capacitação maior que 5 milhões por ml e com morfologia estrita de Kruger maior que 4%) ou infertilidade sem causa aparente (ESCA) por pelo menos 1 ano. O diagnóstico de infertilidade masculina foi dado quando pelo menos 2 amostras de sêmen mostraram uma concentração total de espermatozoides menor do que 20 milhões sem que nenhuma outra anormalidade fosse encontrada na investigação do casal. Os casos de infertilidade sem causa aparente foram diagnosticados quando nenhuma anormalidade foi encontrada na investigação do casal. Em ambos os casos, a indicação de IIU seguiu-se após comprovação de integridade e perviabilidade de pelo menos uma tuba uterina.

Excluiu-se as pacientes que realizaram IIU em 2004 para evitar o período de transição dos lotes de medicação no mercado. Além disso, foram excluídas pacientes que tivessem alguma outra patologia associada, como endometriose, sorologia positiva para HIV, hepatites B ou C. Da mesma forma, as pacientes que apresentavam dosagem de FSH no 2º dia do ciclo maior ou igual a 10UI/l, que haviam sido submetidas a qualquer tratamento hormonal nos últimos 3 meses e os casos de anovulação foram excluídos.

A caracterização do perfil das pacientes foi apresentada através da idade da paciente, tipo e causa de esterilidade e concentração de espermatozoides inseminados. As taxas de gravidez por ciclo e por paciente foram os desfechos principais do estudo. Também foram analisados os resultados da estimulação ovariana nos dois grupos: dose total de medicação utilizada, número de folículos entre 14 e 18 mm, número de folículos  $\geq 18$  mm, dosagem de estradiol e LH no dia do rhCG, espessura do endométrio no dia do rhCG, síndrome de hiperestímulo ovariano e gestação múltipla. Classificou-se em fácil e difícil o procedimento de IIU quando havia nenhuma (fácil) ou alguma (difícil) resistência à passagem do cateter de Frydman durante a IIU. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro em agosto de 2008.

As pacientes foram submetidas a estimulação ovariana utilizando-se rFSH bio (grupo 1) ou rFSH Fbm (grupo 2) na dose de 75UI- 5,5 $\mu\text{g}$  a cada 48 horas a partir do 3º dia do ciclo (3º, 5º e 7º dias do ciclo), por via subcutânea, segundo a experiência do Serviço (Souza et al, 2002; Souza, 2005). Todas as pacientes foram submetidas a ultra-sonografia transvaginal (USTV) basal no início do ciclo, antes do início da medicação com o objetivo de se avaliar o aspecto e a espessura endometrial, a reserva ovariana e descartar a presença de cistos ovarianos. A monitorização da ovulação foi iniciada no 8º dia do ciclo

por ultra-sonografia transvaginal. O aparelho utilizado foi um GE Logic 400 - Pró series com transdutor de uso intra-vaginal na frequência de 6,0 MHz.

As doses subsequentes de r-FSH foram ajustadas de acordo com o tamanho dos folículos da seguinte forma:

- na ausência de folículos com diâmetro de 10-12 mm as doses foram aumentadas em 37,5 a 75 UI, mantendo-se em dias alternados.

- na presença de folículos de 14-15 mm as 75UI foram mantidas e reavaliadas em 2 dias.

- quando os folículos atingiram o diâmetro de 16-17 mm a medicação foi interrompida e a paciente foi reavaliada em 24 horas com novo USG.

Ao ser obtido pelo menos um folículo maior ou igual a 18 mm, a ovulação foi desencadeada com hCG recombinante (rhCG) em dose única de 250µg, por via subcutânea. Neste dia foi colhido sangue para dosagem de estradiol e LH. Os ciclos foram cancelados quando não houve resposta folicular que alcançasse diâmetro de 14mm até o 15º dia do ciclo ou na presença de mais de três folículos acima de 18mm (folículos pré-ovulatórios).

Informações sobre efeitos adversos das medicações foram coletados durante o período de tratamento das pacientes. As amostras de sêmen foram obtidas por masturbação imediatamente antes da IIU, após um período de 2 a 5 dias de abstinência sexual, coletadas em frascos de boca larga, estéreis, de polipropileno e mantidas a 37°C por no máximo 60 minutos até a total liquefação. O material foi então analisado quanto à concentração e motilidade dos espermatozoides, utilizando-se câmara de Makler (Counting Chamber Makler® - Self Medical Instruments - Israel). O preparo seminal foi obtido através da técnica de gradientes de densidade, com objetivo de promover a remoção do plasma seminal, de vírus e bactérias, bem como a capacitação dos espermatozoides.

A inseminação intra-uterina ocorreu de 30 a 40h após o uso do hCG. O suporte da fase lútea foi feito com uso diário de progesterona micronizada por via vaginal (Utrogestan® - Farmoquímica) iniciado 4 dias após o uso do rhCG. O teste de gravidez foi realizado 14 dias após a inseminação. Foi considerado gestação química a dosagem sérica de β-hCG positiva, e neste caso o uso de progesterona foi mantido até a 12ª semana de gestação. Um exame ultra-sonográfico transvaginal foi realizado 2 semanas após o teste de gravidez positivo (aproximadamente na 6ª semana de gestação) com finalidade de detectar a presença do embrião (gestação clínica).

A análise estatística foi realizada pelos seguintes métodos:

- para comparação de variáveis numéricas (idade, total de gonadotrofinas, espessura endometrial, nº de folículos) entre os dois grupos foi utilizado o teste *t* de Student para amostras independentes ou o teste de Mann-Whitney (não-paramétrico);

- para comparação de dados qualitativos (taxa de gestação) foi utilizado o teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ou o teste exato de Fisher.

Foi utilizado método não-paramétrico, pois algumas variáveis não apresentaram distribuição normal (distribuição Gaussiana) devido à dispersão dos dados e/ou a escala discreta das variáveis. O nível de significância foi de 5%. O risco relativo foi estimado com o respectivo intervalo de confiança. O Programa Epi Info versão 3.5.1.(2008) foi utilizado para as análises de dados.

## RESULTADOS

Um total de 83 pacientes realizaram IIU e foram divididas em dois grupos. O grupo que foi submetido a estimulação ovariana com rFSH bioensaio (rFSH bio) foi composto por 44 pacientes, enquanto 39 pacientes fizeram parte do

grupo que realizou estimulação ovariana com rFSH preenchido por massa.

Os dois grupos foram semelhantes quanto à média de idade das pacientes, incidência de infertilidade primária, incidência de ESCA e fator masculino como causa de infertilidade. Também não houve diferença significativa quanto a concentração de espermatozoides inseminados e número de ciclos realizados como demonstrado na tabela 1.

Cada grupo teve 51 ciclos analisados. No grupo rFSH bio, 7(13,7%) pacientes realizaram mais de 1 ciclo de IIU, enquanto que no grupo rFSH Fbm 12 (30,8%) pacientes foram submetidas a mais de 1 ciclo (p=0,60) (tabela 2).

A taxa de gestação por paciente encontrada foi de 11,36% no grupo rFSH bio e 7,7% no grupo rFSH Fbm, sem diferença estatística significativa, RR 1,33 (IC 95% 0,3-5,2). Da mesma forma, a taxa de gestação por ciclo, 9,8% (3/51) versus 5,8% (5/51) não mostrou diferença estatística significativa, RR 1,67 (IC 95% 0,4-6,6) (tabela 3 e gráfico 1).

Dentre as gestações do grupo rFSH bio, 1 evoluiu para abortamento com 8 semanas e 4 evoluíram como gestação clínica com parto a termo (taxa de bebê em casa de 9,0%). No caso do grupo rFSH Fbm, 1 gestante abortou ainda no primeiro trimestre e 2 evoluíram com gestação clínica com parto a termo (taxa de bebê em casa de 5,1%). Não houve casos de gestações gemelares ou síndrome de hiperestímulo ovariano em nenhum dos grupos.

A dose média de rFSH utilizada foi de 370,58 ± 128,26 no grupo que utilizou rFSH bioensaio e 363,97 ± 157,73 no grupo que utilizou rFSH preenchido por massa, sem diferença estatisticamente significativa. Comparamos também o número de folículos entre 14 e 17 mm e maiores de 18 mm encontrados ao exame de ultra-sonografia no dia do hCG. No grupo rFSH bio foram encontrados exatamente 9 folículos com tamanho entre 14 e 17 mm no total de 51 ciclos observados (17,6%), semelhante ao rFSH Fbm, onde foram encontrados 10 folículos destes tamanhos (19,6%). Com exceção de apenas uma paciente do grupo que utilizou o rFSH bio que apresentou 2 folículos ≥ 18 mm, todas as outras tiveram apenas 1 folículo ≥ 18 mm no dia do hCG, não havendo portanto diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

A média da espessura endometrial no dia do hCG se mostrou semelhante nos 2 grupos assim como as dosagens de estradiol e LH no mesmo dia.

A tabela 4 mostra os resultados da estimulação ovariana nos dois grupos.

No grupo rFSH bio, 80% (41/51) dos procedimentos foram considerado fáceis contra 53% (27/51) no grupo rFSH Fbm. Embora esta diferença tenha sido significativa (p = 0,0059), não representou diferença no resultado final de gestação nesta amostra.

**Tabela 1** Perfil clínico das pacientes

Variáveis	rFSH bio	rFSH Fbm	P valor
Nº de ciclos	51	51	
Idade	33,05 ± 2,95	33,72 ± 2,42	0,21
Esterilidade primária (%) secundária (%)	82,45 (42/51) 17,65 (9/51)	78,43 (40/51) 21,57 (11/51)	0,80
Causa ESCA (%) Masculina (%)	66,66 (34/51) 33,34 (17/51)	64,70 (33/51) 35,30 (18/51)	1
Conc. spztz (x106/ml)*	53,17 ± 39,34	44,79 ± 28,46	0,22

Valores expressos em percentagem ou média ± DP.

\*Conc. Spztz = concentração de espermatozoides inseminados.

**Tabela 2.** Taxa de gestação segundo número de ciclos de IIU realizados em cada grupo.

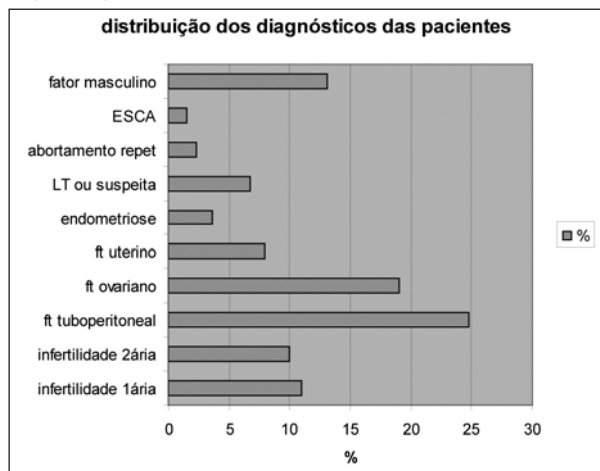
	rFSH bio n	Taxa de gestação %	rFSH Fbm n	Taxa de gestação %	p
1 ciclo	44	6,8 (3/44)	39	5,1 (2/39)	0,55
2 ou + ciclos	7	28,6 (2/7)	12	8,3 (1/12)	0,29
Total	51	5/51	51	3/51	0,71

\*Teste de Fisher

**Tabela 3.** Riscos relativos referentes às taxas de gestação/ciclo e gestação/paciente obtidos a partir da comparação entre os dois grupos.

	rFSH bio	rFSH Fbm	RR (IC 95%)*	p
Nº ciclos	51	51		
Gestação/ciclo (%)	9,8 (5)	5,8 (3)	1,67 (0,4-6,6)	0,71
Nº pacientes	44	39		
Gestação/paciente(%)	11,36 (5)	7,7 (3)	1,33 (0,3-5,2)	0,84

\*RR= % gestações no grupo rFSH bio / % gestações no grupo rFSH Fbm

**Gráfico 1.** Taxas de gestação (%) por ciclo e por paciente segundo grupo de tratamento**Tabela 4.** Resultados da estimulação ovariana nos 2 grupos

Variáveis	rFSH bio	rFSH Fbm	p
Dose total rFSH (UI)	370,58 ± 128,26	363,97 ± 157,73	0,81
Endométrio (mm)	9,62 ± 2,46	9,35 ± 1,91	0,53
Fol 14-17mm (%)	17,6	19,6	1
Fol* ≥ 18mm	1 ± 0,2	1 ± 0	0,16
LH (mIU/ml)	12,96 ± 11,84	11,22 ± 14,48	0,63
Estradiol (pg/ml)	285,26 ± 148,09	323,88 ± 191,89	0,43

Valores expressos em percentuais ou média ± DP. \*Fol = número de folículos

## DISCUSSÃO

As implicações clínicas potenciais do rFSH preenchido por massa são aspectos importantes para a prática clínica. Neste contexto, no estudo realizado por Hugues et al. em 2003, onde foram analisados 4 lotes de rFSH preenchido

por bioensaio e 4 lotes de rFSH preenchido por massa, as pacientes que utilizaram o rFSH preenchido por massa tiveram uma resposta ovariana significativamente mais consistente, possibilitando um melhor controle da dose de FSH administrada (BALASH,2004).

Ao se considerar que a resposta de cada paciente ao estímulo ovariano é altamente variável, a estabilidade da droga utilizada no estímulo ovariano por si já representa um viés a menos. Embora a maioria dos trabalhos comparando-se estímulo ovariano com protocolos de rFSH estejam restritos a ciclos de alta complexidade, seria natural interrogarmos se haveria uma melhora na qualidade oocitária também em protocolos de baixa complexidade, onde não estamos checando diretamente o grau de maturação oocitária.

Um número significativo menor de ampolas de rFSH Fbm foi necessário para a estimulação ovariana nos ciclos de FIV/ICSI encontrados no estudo de Abuzeid et al. (WICKLAND, 2006). Embora comparando procedimentos de alta com baixa complexidade, poderíamos esperar também uma menor dose de rFSH Fbm requerida no nosso estudo o que, entretanto, não foi confirmado.

No estudo de Yeko et al. (2004) embora tenham encontrado diferenças no resultado de indução da ovulação com as duas formulações no que diz respeito a menos dias de estímulo e, novamente, menor número de ampolas utilizadas, a população estudada era diferente. Tratava-se na etiologia de pacientes anovuladoras do grupo II (WHO), diferindo na etiologia das pacientes com ESCA e/ou fator masculino, abordados no nosso trabalho.

Os resultados que obtidos seja no número de folículos entre 14 e 17 mm ou maiores de 18mm foram semelhantes nos dois grupos assim como as demais variáveis clínicas relacionadas: dose total de rFSH utilizada, dosagem plasmática de estradiol e LH no dia do hCG e espessura endometrial.

Torna-se muito importante o achado da população folicular entre 14 e 17 mm apenas na faixa de 20%, pois isto significa que os ciclos foram mono-ovulatórios em pelo menos 80% das vezes.

As taxas de gestação obtidas estão de acordo com os dados da literatura para os ciclos de IIU e novamente não evidenciaram diferença entre as formulações do rFSH.

Apesar de nossos achados terem se baseado em um pequeno número de pacientes/ ciclos e ter a limitação de um estudo retrospectivo, os grupos em análise foram definidos com critérios restritos a fim de torná-los o mais semelhante possível, reduzindo o potencial de fatores de confundimento que pudessem interferir nos resultados. Estes critérios foram, inclusive, os que limitaram o tamanho amostral, já que o universo original das pacientes era muito heterogêneo.

Mesmo sem encontrar diferenças nos resultados da estimulação ovariana realizada com as duas formulações nesta amostra, os benefícios associados à maior pureza das drogas recombinantes são consideráveis, principalmente pela maior segurança potencial em termos de riscos de contaminação, riscos estes existentes nos produtos de origem urinária.

A taxa de gestação múltipla após indução da ovulação é um ponto muito discutido atualmente considerando-se que pelo menos um terço dos gemelares e maioria de trigêmeos e gestações múltiplas de grande ordem são resultantes de procedimentos mais simples de indução da ovulação (HUGUES, 2005). O rFSH Fbm, pela sua consistência de lotes, poderia então beneficiar pacientes com anovulação crônica, onde um ajuste sutil da dose deve ser buscado para se prevenir o risco de desenvolvimento multifolículo e gestação múltipla.

Nos ciclos de FIV, o risco de síndrome de hiperestímu-

lo pode ser reduzido pela punção do grande número de folículos visualizados a ultra-sonografia transvaginal e, no caso de gestação múltipla, controlando o número de embriões a serem transferidos (FAUSER, 2004), o que não é possível nos procedimentos de baixa complexidade. Neste caso, o maior controle do desenvolvimento de múltiplos folículos observados por ultra-sonografia associada a protocolos que permitam pequenos e consistentes ajustes de dose se torna fundamental. Neste contexto, nossa amostra não evidenciou nenhum caso de gestação múltipla ou síndrome de hiperestímulo ovariano, o que mostra segurança na sua utilização.

A IIU é um procedimento considerado fácil e de menor custo do que a FIV, sendo mais acessível à maioria dos casais inférteis e, portanto, a primeira opção de tratamento para casais com ESCA e fator masculino leve a moderado (DANKERT, 2007). No entanto, como comprovado pela escassa quantidade de publicações encontrada na revisão deste tema, a maioria dos estudos apenas levam em consideração procedimentos de FIV/ICSI. Diversos autores comparam os custos de tratamento com FIV/ICSI versus IIU e indicam que o tratamento inicial com IIU se mostra mais custo-efetivo na maioria dos casos de ESCA e infertilidade masculina moderada. Surpreendentemente e apesar dos argumentos baseados em evidências, estudos realizados na Austrália e Nova Zelândia mostram claramente que quase um terço dos centros de tratamento de infertilidade, apesar de convencidos destes valores, realizam FIV/ICSI como primeira linha de tratamento mesmo nos casos de normalidade espermática e tubas patentes (OMBELET et al., 2008).

Apesar de resultados não tão promissores em taxas de gestação, a IIU deve ser considerada uma boa alternativa para tratamento de casais jovens e de menor poder aquisitivo, principalmente nos países em desenvolvimento. Aliado a isto, o uso do rFSH, ao possibilitar menor ajuste de doses, podem contribuir também para o menor custo dos tratamentos de infertilidade.

## CONCLUSÃO

Não encontrou-se diferença nas taxas de gestação entre os grupos que utilizaram rFSH preenchido por bioensaio ou preenchido por massa. Os resultados da estimulação ovariana também não foram capazes de mostrar diferença no uso de uma ou outra formulação quanto às outras variáveis clínicas. Ambas as drogas no protocolo estudado mostraram-se seguras quanto ao risco de hiperestímulo ovariano ou gestação múltipla, o que reassegura sua aplicação em tratamentos de baixa complexidade.

## Correspondência:

Martha de Moraes Calvente Bulus

Av. das Américas 4.666 grupos 312/313

Barra da Tijuca- Rio de Janeiro- RJ

Cep 22.649-900 Brasil

Tel: (55) (21) 2430 90 60 Fax: (55) (21) 2430 90 70

E-mail: marthacalvente@gmail.com

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Balash, J. et al. Outcome from consecutive assisted reproduction cycles in patients treated with recombinant follitropin alfa filled-by-bioassay and those treated with recombinant follitropin alfa filled-by-mass. *RBM on line* 2004; 8 (4):408-413.

Dankert, T.; Kremer, J.A.M.; Cohlen, B.J.; et al. A randomized clinical trial of clomiphene citrate versus low dose recombinant

FSH for ovarian hyperstimulation in intrauterine insemination cycles for unexplained and male subfertility. *Hum Rep* 2007; 22, 792-797.

Driebergen, R.; Baer, G. Quantification of follicle stimulating hormone (follitropin alfa): Is in vivo bioassay still relevant in the recombinant age? *Curr Med Res Opin* 2003;9 (1):41-46.

Fauser, B.C.J.M; Macklon, N.S. Chapter 31: Medical approach to ovarian stimulation for infertility. In: Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology – Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management. 5<sup>th</sup> edition; Pennsylvania: Elsevier Saunders;2004. p.965-1001.

Guzick DS, Carson SA, Coutifaris C et al. Efficacy of superovulation and intrauterine insemination in the treatment of infertility. National Cooperative Reproductive Medicine Network. *N Engl J Med* 1999; 340: 177-83.

Hugues, EG.; Collins JA.; Gunby J. A randomized controlled trial of three low-dose gonadotrophin protocols for unexplained infertility. *Hum Reprod* 1998; 15(6):1527-1531.

Hugues, JN.; Barlow, DH.; Rosenwacks, Z. et al. Improvement in consistency of response to ovarian stimulation with recombinant human follicle stimulating hormone resulting from a new method for calibrating the therapeutic preparation. *RBM on line* 2003; (6):185-190.

Hugues, JN.; Durnerin, CI. Gonadotrophins- filled-by-mass versus filled-by-bioassay. *RBM online*, 2005; 10 (3):11-17.

Le Cotonee, JY.; Purchet, H; Beltramiv, F et al. Clinical pharmacology of recombinant human follicle-stimulating hormone (FSH). Comparative pharmacokinetics with urinary human FSH. *Fertil Steril* 1994; 61:669-781.

Macklon, NS.; Fauser, BCJM. Gonadotrophins in ovulation induction. *RBMOnline* 2005;10 (3): 25-31.

Martinez, G et al. A comparison between follitropin  $\alpha$  filled by mass and follitropin  $\alpha$  filled by bioassay in the same egg donors. *RBM on line* 2007; 14 (1): 26-28.

Ombelet, W.; Campo, R.; Bosmans, E.; NIJS, M. Intrauterine insemination (IUI) as a first-line treatment in developing countries and methodological aspects that might influence IUI success. In: ESHRE Special Task Force on Developing Countries and Infertility, 2008. p. 64-72.

Requena, A.; Villasante, G. Protocolos de Estimulação e suas Indicações. In BScheffer (ed). *Reprodução Humana Assistida*. 1ª edição; São Paulo, Atheneu, 2003. p. 83-94.

Shoham, Z; Yuval, O. Urinary Gonadotrophins and recombinant FSH. In: *Ovulation Induction, European Practice in Gynaecology and Obstetrics*, 1<sup>st</sup> edition, France, Elsevier;2002. p. 185-196, 2002.

Souza, MCB ; Oliveira,, JBA ; Henriques, CA ; Mancebo, ACA ; Rocha, CA . Recombinant FSH and low complexity cycles:towards simpler protocols. In: Congress of The European Society of Human Reproduction and Embriology, 2002, Viena. *Hum Reprod*. Londres : Oxford University Press, 2002. v. 17. p. 150-151.

Souza, M C B. Indução da Ovulação. In: J G Ramos;A A Urbanetz. (Org.). *PROAGO*. 1 ed. Porto Alegre: Artmed/Panamericana, 2005, v. 2, p. 157-175.

Wickland, M.; Hugues, JN.; Howles, C. Improving the consistency of ovarian stimulation: follitropin alfa filled-by-mass. *RBM Online* 2006; 12 (6):663-668.

Yeko, T; Pasqualini, SR.; Alam, V et al. Cumulative ovulation and pregnancy rates according to recombinant human follicle stimulating hormone (r-hFSH) dosing: comparison of a new formulation of follitropin alfa vials versus the standard formulation of follitropin alfa in ampoules. *Fert Steril* 2004, 82 (2), S 119.

# Métodos de preservação da capacidade reprodutiva

## Methods of preservation of reproductive function

Luis Felipe Victor Spyer Prates<sup>1</sup>, Selmo Geber<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Endoscopia Ginecológica, Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas

<sup>2</sup>Clínica ORIGEN, BH

Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte - MG -

### RESUMO

Um dos principais dilemas enfrentados pela Medicina reprodutiva, atualmente, é a dificuldade de preservação da capacidade reprodutiva feminina nas pacientes que têm seus ovários inativados pelo uso da química/radioterapia ou cirurgicamente retirados. Nesses casos, a criopreservação ovariana serviria tanto como fonte de reserva de oócitos para a preservação da função reprodutiva futura, bem como uma alternativa à terapia hormonal. Nesse artigo, fazemos uma breve revisão da literatura apresentando as principais causas da falência ovariana e os principais métodos atualmente disponíveis para preservação da função endócrina ovariana, com especial ênfase nos avanços em relação a criopreservação ovariana.

*Palavras-chave:* Transplante, ovário, criopreservação, ratos

### ABSTRACT

One of the major problems against reproductive medicine is the incapacity of oocyte preservation in patients submitted to chemotherapies, radiotherapies and mutilating surgeries. In these cases, ovary preservation could restore hormonal e fertility capacity. In this article, we describe the main causes of ovarian failure and the alternatives to preserve ovarian function, especially the advances in ovarian cryopreservation.

*Key-words:* Transplantation, ovary, cryopreservation, rats

### INTRODUÇÃO

A necessidade de preservação dos gametas femininos e o problema da reposição hormonal relacionado à melhor droga, dose e via de administração, indicações e efeitos colaterais são assuntos que vêm sendo discutidos há décadas e que até o momento não apresentam soluções definitivas (Barros et al., 2001). O banco de tecido ovariano pode ser uma das alternativas possíveis para atender estas questões e encontra-se em investigação experimental tanto em animais quanto em humanos, ainda em fases iniciais. Ele pode ser uma solução para a preservação da fertilidade em pacientes com câncer,

situação em que o tratamento levará à falência ovariana, assim como o que ocorre em pacientes com endometriose grave ou tumores ovarianos benignos. Essa questão torna-se especialmente importante para mulheres solteiras e crianças, nas quais não é possível o uso do congelamento de embriões. Além disso, acredita-se que o transplante ovariano possa restaurar a função endócrina da mulher, sendo uma alternativa à terapia hormonal. Outra possível indicação seria para pacientes que retardam a concepção para um período avançado da vida reprodutiva, quando a reserva ovariana encontra-se diminuída ou esgotada, hoje candidatas a tratamento com doação de oócitos.

No ano de 2006, foram estimados 1.399.790 novos casos de câncer nos Estados Unidos, sendo 679.540 em mulheres e 8% disso em mulheres abaixo de 40 anos (Jemal et al., 2006). Estima-se que em 2010, uma em cada 250 pessoas adultas serão sobreviventes de câncer na infância (Blatt, 1999). Os grandes avanços obtidos no diagnóstico e tratamento do câncer em crianças, adolescentes e adultos aumentou a expectativa de vida de mulheres sobreviventes na pré-menopausa, entretanto resultou numa população crescente de adolescentes e adultos curados de neoplasias malignas que experimentarão problemas de infertilidade devido a falência ovariana prematura (Blatt, 1999). Os efeitos das quimioterapias, radioterapias e cirurgias mutiladoras no futuro da fertilidade são matéria de estudos e preocupações das pacientes e de seus familiares.

## 1 – FALÊNCIA OVARIANA

### 1.1 – Falência Ovariana Pós-Quimioterapia

A quimioterapia, especialmente quando se utilizam agentes alquilantes, é reconhecidamente gonadotóxica. A gonadotoxicidade das drogas varia entre elas, sendo algumas extremamente tóxicas (ciclofosfamida, melphalan, clorambucil, ifosfamida, thiotepa e mostarda nitrogenada) e outras com efeitos mínimos ou nulos sobre a reserva folicular ovariana (Metotrexate, 5-fluoracil, vincristina) (Sonmezer & Oktay, 2004). A perda folicular é também dose dependente, sendo que cada curso

de quimioterapia resulta em perda adicional proporcional à reserva (Akar & Oktay, 2005). O risco de falência ovariana aumenta com a idade, simplesmente como consequência da menor reserva ovariana em mulheres mais velhas (Meirow & Nugent, 2001). Mulheres novas possivelmente não experimentarão falência ovariana imediata com drogas altamente gonadotóxicas, mas eventualmente elas desenvolverão infertilidade e menopausa precoce (Poniatowski et al., 2001). Desse modo, a restauração de ciclos menstruais regulares não garante a fertilidade normal (Demeestere et al., 2007).

Em uma recente revisão, Lobo (2005) mostrou que a chance de gravidez espontânea após o tratamento é de 28% em mulheres abaixo de 20 anos e de apenas 5% em mulheres acima de 25 anos. Além disso, relata que a terapêutica preconizada para o transplante de medula óssea induz falência ovariana em mais de 80% dos casos, mesmo em crianças.

### 1.2 – Falência Ovariana Pós-Radioterapia

A radiação induz dano gonadal através de efeitos citotóxicos diretos e indiretos (formação de radicais livres) no DNA. A dose de radiação calculada para destruir 50% da reserva oocitária é estimada em menos de 2 gray (Gy) (Wallace et al., 2003). Enquanto um total de 20 Gy pode induzir falência ovariana em mulheres abaixo de 40 anos, uma dose baixa, como 6 Gy, é suficiente para levar à falência mulheres acima de 40 anos. Pacientes que mantêm ciclos regulares, após irradiação pélvica, também não estão livres de desenvolver menopausa precoce (Wallace et al., 1989).

Além da radioterapia pélvica e abdominal utilizada em tumores pélvicos e doença de Hodgkin, a irradiação crânio-espinal em tumores cerebrais e leucemia linfoblástica aguda e irradiação total usada conjuntamente aos procedimentos de transplante de células tronco também estão intimamente associadas a falência endócrina ovariana. O fracionamento da dose total permite uma menor toxicidade (Wallace et al., 2003). Além do mais, a exposição uterina a doses de irradiação tão baixas quanto 10 Gy pode comprometer a vascularização e musculatura uterina e levar à perda de distensibilidade, tendo como consequência altas taxas de aborto e infertilidade por fator uterino (Wallace et al., 1989).

Algumas condições tidas como benignas podem também levar à perda da função endócrina ovariana em decorrência do tratamento instituído. Doenças como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide, a doença de Behçet e outras auto-imunes podem ser tratadas com quimioterapia e/ou radioterapia nos dias atuais (Mattle et al., 2005).

### 1.3 – Falência Ovariana Após Cirurgia

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 493.000 novos casos de cânceres do colo uterino no mundo estão estimados para 2008, sendo o tumor que mais acomete as mulheres em idade fértil (WHO, 2008). Quase 80% dos casos novos ocorrem em países em desenvolvimento, onde, em algumas regiões, é o câncer mais comum entre as mulheres (INCA, 2008). A *American Cancer Society* (ACS) preconizou que, em 2007, ocorreriam 22.430 eventos novos em relação aos

tumores ovarianos e 11.150 eventos de tumor do colo uterino (ACS, 2008).

Já, no Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima 18.680 novas ocorrências de câncer de colo, em 2008, representando 19 para cada 100.000 mulheres. É o tumor mais incidente, em mulheres na região Norte, com incidência de 22:100.000. Na região sudeste brasileira, é o terceiro em frequência, com 17 casos novos em cada grupo de 100.000 mulheres. Importante ressaltar que, nessas estatísticas, não estão sendo computados os cânceres de pele não-melanoma. A incidência do câncer de colo de útero torna-se mais evidente na faixa etária de 20 a 29 anos e o risco aumenta rapidamente até atingir seu pico, geralmente entre 45 e 49 anos, dados que esclarecem a importância de sua consequência sobre a fertilidade feminina (INCA, 2008).

Pacientes jovens podem, nessas situações, ter seus ovários retirados cirurgicamente como alternativa terapêutica. Além dos casos de câncer, algumas doenças benignas como cistos ovarianos extensos, de natureza progressiva e/ou recorrentes semelhante ao que ocorre em alguns casos de endometriose, cistos mucinosos e teratomas podem ter indicação de ooforectomia bilateral, o que levaria à perda da função endócrina ovariana e de 100% da reserva folicular (Sonmezer & Oktay, 2004).

Sklar et al. (2006) estudaram 2.819 sobreviventes femininas de tumores e as compararam com 1.065 de suas irmãs, em relação à ocorrência de menopausa prematura. Observaram que esta ocorreu em 126 mulheres que sobreviveram ao tumor e em 33 no grupo das irmãs (controle). Entre estas, a ooforectomia cirúrgica foi verificada em 61 (48%) e em 31 (94%) mulheres dos dois grupos, respectivamente. Entretanto, viram que a incidência cumulativa de menopausa prematura não-cirúrgica é de 8% nas sobreviventes do câncer e de 0,8% nas mulheres do grupo-controle, o que representa risco relativo da ordem de 13,21 de um grupo em relação ao outro. Daí, conclui-se que a menopausa não cirúrgica é mais frequente nas sobreviventes de tumores malignos e que, em mulheres em idade fértil que têm menopausa precoce, a castração cirúrgica responde por 98%.

## 2 – MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DA FUNÇÃO ENDÓCRINA OVARIANA

A primeira opção para preservação da função ovariana e fertilidade futura será a utilização de drogas menos gonadotóxicas e menores doses possíveis de radioterapia. Não sendo isso possível, deve-se partir para alternativas que visem diminuir a ação dos quimioterápicos e da radiação nos ovários. Isso inclui a transposição dos ovários ou ooforopexia, a utilização concomitante aos quimioterápicos de agonistas e/ou antagonistas dos hormônios liberadores das gonadotrofinas hipofisárias (GnRH) (Demeestere et al., 2007) e novas drogas antagonistas da apoptose – *Sphingosine-1-Phosphate* (Kim, 2006).

### 2.1 – Ooforopexia

Na ooforopexia, os ovários são retirados do campo de irradiação, evitando, assim, os efeitos diretos da radiação ionizante. A transposição dos ovários tem sido utilizada por décadas, com o objetivo de preservar a função ovariana. Antigamente, era feita conjuntamente à lapa-

rotomia para estadiamento na doença de Hodgkin ou à histerectomia radical no câncer de colo uterino. Atualmente, com o desenvolvimento das técnicas de videolaparoscopia, esse tem sido o procedimento de escolha, devido à sua simplicidade, segurança e efetividade (Kim, 2006). A eficácia na prevenção da falência ovariana nunca foi muito boa, variando nos estudos entre 16 e 90 %. Essa grande variação é devido às diferentes doses utilizadas, ao grau de comprometimento da vasculatura, à idade da paciente e à concomitância ou não de quimioterapia (Bisharah & Tulandi, 2003). Diversas complicações são associadas ao procedimento, diminuindo ainda mais sua efetividade e incluem: isquemia da trompa, dor pélvica crônica, formação de cistos ovarianos e migração dos ovários de volta à sua posição original antes do início da radioterapia (Meirow & Nugent, 2001). Quando a ooforopexia é realizada, a gravidez espontânea torna-se inviável, a não ser que seja realizado um novo procedimento cirúrgico. Assim, como essas pacientes necessitarão de Fertilização *In Vitro* (FIV) no futuro, a coleta de oócitos será um grande desafio. Desse modo, pacientes candidatas à transposição devem ser cuidadosamente escolhidas, analisando-se as diversas variáveis que podem afetar o resultado final. Finalizando, nunca se deve indicar o procedimento a pacientes que serão submetidas conjuntamente à quimio e radioterapia (Sonmezer & Oktay, 2004).

## 2.2 – Análogos do GnRH

Considerando a possibilidade de preservação da função testicular em homens submetidos a quimioterapia nos quais foi realizada supressão gonadal e na premissa que garotas pré-púberes não são afetadas pela gonadotoxicidade dos quimioterápicos, foi aventada a hipótese de que a supressão ovariana pode ser protetora (Kim, 2006). Estudos realizados em animais demonstraram menor perda de folículos primordiais quando foi utilizado o análogo em animais submetidos à quimioterapia (Blumenfeld, 2007). Entretanto, falhou em mostrar os mesmos benefícios quando os animais foram submetidos à radioterapia (Sonmezer & Oktay, 2004). Em humanos, Blumenfeld et al. (1996) demonstraram claramente os efeitos benéficos da utilização do GnRH: no grupo tratado com o análogo, 15 de 16 pacientes (94%) reassumiram ciclos menstruais regulares entre 3 e 8 meses após o fim da quimioterapia, enquanto no grupo controle 61% apresentou falência ovariana. Já no estudo de Waxman (1987), não houve benefício com o uso do análogo, já que, após 3 meses de *follow-up*, 4 de 8 mulheres no grupo tratado e 6 de 9 no grupo controle ficaram amenorréicas. Em estudo publicado recentemente, Blumenfeld et al. (2008) mostraram novamente os benefícios da utilização do GnRH. No grupo que recebeu o GnRH, menos de 7% desenvolveu amenorréia hipergonadotrópica irreversível, ao passo que todas as outras voltaram a ter ciclos menstruais regulares, além de 33 terem engravidado espontaneamente 46 vezes. Alguns estudos randomizados fase III se encontram em andamento e irão, provavelmente, resolver a questão a respeito do uso de agonistas de GnRH na preservação da função ovariana e fertilidade em mulheres jovens na menacme, expostas à quimioterapia gonadotóxica (Blumenfeld, 2007).

## 2.3 – Antagonista do GnRH

Tem sido sugerido que novos estudos devem avaliar os antagonistas do GnRH, ao contrário dos agonistas, com o objetivo de se conseguir uma dessensibilização hipofisária mais rápida, eliminando a necessidade de aguardar os 7-14 dias que os segundos levam para provocar o bloqueio hipofisário. Meirow et al. (2004) realizaram um estudo com animais, com o objetivo de testar o efeito protetor do Cetrorelix contra a ciclofosfamida e demonstraram que este existe, mas é dose dependente, diminuindo com o aumento da dose do quimioterápico. Outro estudo concluiu que, apesar dos efeitos benéficos conhecidos com os agonistas, os antagonistas de GnRH não conseguiram proteger o ovário dos efeitos danosos da ciclofosfamida (Danforth et al., 2005), colocando em dúvida a afirmação de que os antagonistas poderão, num futuro próximo, substituir os agonistas na proteção ovariana contra quimioterapia gonadotóxica (Blumenfeld, 2007).

## 2.4 – Sphingosine-1-Phosphate (Antagonista de Apoptose)

Os oócitos possuem intrinsecamente um mecanismo de apoptose que pode ser ativado por diversos estímulos, entre eles radiação e quimioterapia. Na teoria, então, a morte oocitária poderia ser evitada se o programa de apoptose pudesse ser inativado. Em estudo com ratos, a supressão da depleção de *pools* de folículos imaturos foi obtida com uma única injeção na bursa ovariana de *Sphingosine-1-Phosphate*, 2 horas antes da irradiação (Morita et al., 2000). Outro estudo (Paris et al., 2002) demonstrou que a proteção à radiação que ocorre devido a *Sphingosine-1-Phosphate* não está associada à propagação de danos genômicos a nível anatômico, histológico, bioquímico ou citológico, promovendo, assim, credibilidade prospectiva à utilização da droga. Apesar de ser uma droga promissora na preservação da função ovariana e da fertilidade após quimioterapia e irradiação, sua eficácia e aplicabilidade prática em humanos ainda precisa ser testada (Kim, 2006; Blumenfeld, 2007).

## 2.5 – Congelamento de Embriões

O único método estabelecido até o momento e rotineiramente utilizado em clínicas de reprodução assistida é a criopreservação de embriões, mas essa opção requer estimulação ovariana, coleta de oócitos e fertilização *in vitro*, o que pode levar entre 2-5 semanas. Assim, o atraso no início do tratamento quimioterápico para o armazenamento de embriões não é factível para algumas pacientes e pode ser, até mesmo, um risco em alguns tipos de câncer. Mais ainda, esse método não deve ser considerado uma opção em garotas pré-puerperais e é freqüentemente inaceitável por mulheres que não possuem parceiro fixo e naquelas que não desejam utilizar espermatozóide de doadores (Kim, 2007). Há dúvidas sobre a segurança da estimulação ovariana em mulheres que apresentam tumores hormônio dependentes, como o câncer de mama, apesar de terem surgido novos protocolos de estimulação com o uso do Tamoxifeno e de inibidores da aromatase (Letrozole), mostrando resultados animadores (Oktay et al., 2005). Desse modo, o congelamento de embriões deve ser considerado como primeira opção na preservação da fertilidade

em mulheres com parceiro fixo e com disponibilidade para ser submetida a pelo menos um ciclo de FIV.

## 2.6 – CRIOPRESERVAÇÃO DE OÓCITOS

Outra alternativa é a criopreservação de oócitos, que pode ser utilizada em mulheres sem parceiro sexual definido e que tenham condições de serem submetidas a um ciclo de estimulação ovariana antes do início da quimioterapia (Jain & Paulson, 2006). Apesar do primeiro nascimento ocorrido a partir de oócitos congelados ter sido relatado em 1986 por Chen e das altas taxas de sucesso obtidas com o congelamento de embriões e espermatozoides, os resultados obtidos, a partir de FIV após oócitos descongelados, eram ruins, com baixas taxas de sobrevivência, de fertilização e de gravidezes (Sonmezer & Oktay, 2004). Entretanto, a partir de significativa melhora obtida nas técnicas de congelamento e descongelamento, houve um pequeno incremento nas taxas de sobrevivência de oócitos congelados/descongelados e até de gravidezes (Borini et al., 2004). Uma revisão de estudos realizada em 2004 mostrou uma taxa de sobrevivência média de 47%, uma taxa de fertilização média de 52,5% e de gravidez por oócito descongelado de 1 a 5% (Donnez et al., 2006; Sonmezer & Oktay, 2004). Meta-análise publicada por Oktay et al. (2006) mostrou: taxa de nascimento por oócito descongelado variando de 1,9 a 2,0%; taxa de nascimento por oócito injetado de 3,4% e por embrião transferido de 21,6%. As novas tecnologias adotadas que possibilitaram essa melhoria incluem: aumento na concentração de sucrose, tempo de descongelamento mais lento e equilibrado e uso de meios com depleção de sódio, além da técnica de vitrificação (Donnez et al., 2006). Pode ser considerado um método promissor, mas ainda assim apresenta baixas taxas de sucesso.

Nos últimos dois anos, resultados cada vez mais animadores têm sido descritos com métodos de congelamento lento, vitrificação e maturação *in vitro* (Tulandi et al., 2008). Albani et al. (2008) publicaram dados de um estudo retrospectivo com mais de 7500 oócitos descongelados mostrando melhora nas taxas de gravidez e de implantação nos últimos anos (6,7% e 2,4 % em 2001 e 15% e 8,2% em 2007 respectivamente). Boldt et al. (2006) mostraram taxa de sobrevivência de 60,6% por oócito congelado, taxa de fertilização de 62% por oócito injetado e de gravidez de 32,6% por embrião transferido. Já Chian et al. (2008) reportaram taxa de sobrevivência de 81% após descongelamento e de gravidez de 45%, com o nascimento de 22 bebês. Parmegiani et al. (2009) em estudo multicêntrico utilizando protocolo de congelamento lento após 2 horas da coleta e descongelamento rápido obtiveram 33,24% de embriões de ótima qualidade e taxa de gravidez por oócito descongelado e injetado de, respectivamente, 5,53% e 10,41%. Grifo & Noves (2009) demonstraram taxa de sobrevivência de oócitos de 92%, sendo 14 gravidezes confirmadas com taxa de 57%. Kim et al. (2009) obtiveram ótimos resultados após congelaram 395 oócitos e após descongelamento de 320, injetaram 285. Relataram taxa de fertilização de 72,3%, sendo 53 embriões transferidos em 19 pacientes. Destes, 24 implantaram resultando em 16 gravidezes (80%) e 3 abortos (15%). Também em

2009, Levi Setti et al. publicaram meta-análise mostrando os resultados globais de congelamento de oócitos. Com a utilização da vitrificação foram observadas as melhores taxas: sobrevivência de 83,9%, fertilização de 81,9%, gravidez de 43,3% e implantação de 14,8%. Mas, apesar de todos esses bons resultados, ainda deve ser considerado um método experimental.

## 2.7 – CRIOPRESERVAÇÃO DE OÓCITOS IMATUROS

Esse método surgiu como uma alternativa ao congelamento de oócitos maduros, pois se acredita que por serem mais indiferenciados, não possuem um fuso tão delicado que possa ser lesado e terem cromossomos protegidos por uma membrana nuclear, sejam mais resistentes ao processo. Entretanto, possui baixa taxa de maturação após descongelamento e desenvolvimento embrionário ineficiente (Tulandi et al., 2008). Esse método não será válido até que a maturação do oócito *in vitro* se torne corriqueira (Kim, 2007). Até o momento, apenas algumas gravidezes foram relatadas na literatura com o uso de oócitos imaturos (Wu et al., 2001).

## 2.8 – CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO OVARIANO

A criopreservação de tecido ovariano é a única opção disponível para garotas pré-púberes e para mulheres em que não é possível postergar o início da quimioterapia (Barros et al., 2008). O congelamento de tecido ovariano foi feito, até o momento, por três técnicas: ovário inteiro com pedículo vascular, fragmentos do córtex ovariano e folículos isolados. Até o momento, a maioria das pesquisas animais e em humanos concentra-se em métodos de congelamento e transplante de fragmentos do córtex avascular, sendo que essa técnica foi a única que possibilitou a ocorrência de nascimentos em humanos até o momento (Donnez et al., 2006).

A criopreservação de tecido ovariano apresenta diversas vantagens e traz menos dilemas éticos. Nesse método, centenas de oócitos imaturos podem ser preservados sem necessidade de estimulação. Estes são menores, quiescentes, não apresentam zona pelúcida, nem grânulos corticais (Barros et al., 2008). Realmente, a preservação do tecido ovariano através de congelamento/descongelamento tem se mostrado um sucesso em animais, mas existe ainda a questão de como desenvolver esses folículos imaturos armazenados no tecido congelado e permitir a fertilização.

Teoricamente, existem três estratégias que permitem o desenvolvimento dos folículos: transplante autólogo/heterólogo, transplante xenólogo e cultura *in vitro*.

A estratégia mais desejada seria a que permitisse o desenvolvimento de um meio que possibilitasse o crescimento e maturação *in vitro*, considerando a ausência de novos procedimentos cirúrgicos, melhor acompanhamento do desenvolvimento e risco zero de transmissão de células cancerosas (Shaw et al., 1996). Apesar de já ser possível isolar folículos primordiais de tecido ovariano humano, não se obteve sucesso na sua maturação *in vitro*. Estudos em ratos nesse sentido são promissores, mas, se esse sucesso poderá ser transportado para humanos, ainda é uma incógnita (Sonmezer & Oktay, 2004).

O Xeno-transplante de tecido ovariano humano em ratos

imunodeficientes, com o crescimento e maturação de folículos nestes, mostrou ser essa uma técnica eficaz de desenvolvimento de folículos imaturos armazenados em tecido ovariano congelado (Oktay et al., 1998). Em estudo recente, Kim et al. (Kim et al., 2005) avaliaram a integridade de oócitos humanos obtidos após transplante xenólogo para ratos imunodeficientes e maturação in-vitro do complexo cúmulo-oocitário. Através de análise imunocitoquímica de micro-túbulos e DNA, alguns oócitos apresentaram-se com anormalidades nucleares e maturação citoplasmática. Além disso, a possibilidade de infecção viral trans-espécies, além de questões éticas e de segurança, ainda impedem seu uso na prática clínica (Kim, 2006).

Apesar de diversas tentativas terem sido realizadas durante 100 anos, não foi possível proceder ao congelamento de células vivas até que o primeiro crioprotetor, glicerol, foi descoberto em 1948 em Londres (Kim, 2007). Assim, nos anos 50, surgiram diversas pesquisas a respeito da criopreservação e transplante de ovários. Em 1956, Parkes (1956) mostrou a restauração da função endócrina após transplante autólogo de ovário em ratas. Devido à falta de aplicabilidade clínica, esse método de preservação da fertilidade ficou somente no campo das pesquisas por aproximadamente 30 anos, até que em 1994, Gosden et al. (1994) obtiveram sucesso restaurando a fertilidade em ovelhas após transplante autólogo de tecido ovariano congelado/descongelado e mostraram novas perspectivas, especialmente como estratégia para preservar a função ovariana em mulheres com câncer. Dez anos depois, em 2004, foi descrito o primeiro nascimento após a realização de transplante ortotópico de tecido ovariano humano congelado/descongelado de uma mulher que teve linfoma de Hodgkin (Donnez et al., 2004).

A criopreservação do tecido ovariano através da técnica de congelamento lento e descongelamento rápido tem obtido melhores resultados nos últimos anos, mas ainda não é o ideal. Ao contrário do congelamento de células únicas, o congelamento de tecido é muito mais difícil, visto que há uma grande quantidade de diferentes células (Kim, 2007). O maior dano que ocorre durante o processo é a formação intracelular de cristais e aumento da concentração de sais e, normalmente, a fase em que isso ocorre é durante o congelamento entre -10°C e -40°C. Newton et al. (1996) postularam que, com o objetivo de diminuir a injúria, a taxa de congelamento deveria ser rápida o suficiente para diminuir a exposição das células a altas concentrações intracelulares de eletrólitos e lenta o suficiente para desidratar as células e evitar a formação de cristais. A escolha do crioprotetor com a máxima permeabilidade e mínima toxicidade e potencial de formação de cristais deve ser específico para cada célula e tipo de tecido (Fuller & Paynter, 2004). De acordo com Hovatta (2005), o método padrão para a criopreservação de tecido ovariano deve ser o congelamento lento e programado usando meio contendo albumina humana associado ao propanediol, dimetilsulfóxido ou etileno-glicol como crioprotetor e combinado ou não à sucrose. Com essa metodologia, as melhores taxas de sobrevivência de folículos obtidos de tecido congelado têm ficado em torno de 70 – 80% (Newton et al., 1996).

### 2.8.1 – Transplante Autólogo/Heterólogo Criopreservado em Animais

Os pioneiros no transplante ovariano pós criopreservação demonstraram a capacidade de preservação dos folículos levando à restauração da função ovariana endócrina e fértil. E, apesar dos primeiros esforços na realização dessas pesquisas, a técnica de criopreservação foi abandonada até os anos 1990 devido à falta de crioprotetores efetivos e máquinas automatizadas de criopreservação (Akar & Oktay, 2005).

As taxas de sucesso obtidas após transplante autólogo/heterólogo de fragmentos de tecido ovariano criopreservados observadas na literatura variam consideravelmente dependendo, principalmente, do animal estudado e do local de implantação, sendo que a grande maioria dos estudos, independente das variáveis descritas acima, mostra sucesso (Prates et al., 2008).

Em camundongos, Harp et al. (1994) descreveram 75% de ciclos estrais regulares após o transplante. Candy et al. (1995), já no ano seguinte, mostraram sobrevivência de todos os fragmentos de tecido ovariano criopreservado de camundongos transplantados. Posteriormente, Cox et al. (1996) descreveram 100% de sucesso. Guana-sena et al. (1997) obtiveram gestações em todas as 12 fêmeas de camundongos submetidas a transplante autólogo de ovário fresco e em 8 das 11 fêmeas submetidas a transplante autólogo de ovário após congelamento. Os transplantes foram realizados para a própria bursa ovariana, sem reanastomose vascular. Candy et al. (2000) mostraram restauração da fertilidade em 12 de 13 camundongos que receberam transplante de ovário fresco e em 10 de 12 que receberam-no congelado. Liu et al. (2000) realizaram transplante de fragmentos de vinte e seis ovários congelados e descongelados para a cápsula renal e mostraram que houve desenvolvimento folicular adequado. Também Liu et al. (2001) relataram gravidez após ICSI seguindo a mesma linha de pesquisa. Novamente Liu et al. (2002) realizando o mesmo procedimento, mostraram normalização da citologia vaginal após 11 dias. Wang et al. (2002a) relataram níveis de FSH, progesterona e estrogênio semelhantes nos grupos submetidos a transplante de tecido ovariano descongelado e controle. Salehnia (2002) demonstrou a presença de folículos nos vários estágios de desenvolvimento, após realizar congelamento, descongelamento e transplante em 24 camundongos. Lee et al. (2005) obtiveram sucesso no transplante de tecido ovariano fresco (73%) e congelado (62%) de ratas para subcutâneo, com posterior captação oocitária, FIV e desenvolvimento de blastocistos. Yang et al. (2006) mostraram sinais de desenvolvimento folicular em 100% dos ovários criopreservados transplantados para a cápsula renal de camundongos. Migishima et al. (2006) relataram retorno da fertilidade em camundongos submetidos à radioterapia e posterior transplante de tecido ovariano criopreservado. Soleimani et al. (2008) realizaram transplante de tecido ovariano criopreservado para cápsula renal e músculo e viram desenvolvimento folicular em todos os implantes, além de terem obtido doze embriões através de ICSI, que resultaram em três nascidos vivos.

Em ratas, Sugimoto et al. (2000) demonstraram desenvolvimento folicular através de histologia, após trans-

plantarem fragmentos de ovários para a cápsula renal, em todos os nove animais estudados. Também em 2000, Kagabu & Umezu realizaram transplante de ovários de ratas congelados para a cavidade uterina e mostraram, à histologia, sobrevivência folicular de apenas 11%. Já Yin et al. (2003), relataram gravidez em ratas após transplante de tecido ovariano congelado e descongelado com sobrevivência de 4 dos 7 (57%) fragmentos criopreservados.

Em estudo recente, Prates et al. (2008) demonstraram a viabilidade funcional hormonal do transplante ovariano autólogo para o peritônio de 67 ratas, após o congelamento e descongelamento, através de citologia vaginal seriada e estudo histológico dos ovários transplantados. Souza et al. (2005) demonstraram sucesso após estimular ovários congelados e transplantados para o peritônio de ratas com FSH recombinante. Nesse estudo os autores contaram o número de folículos em crescimento no grupo estimulado e compararam com ovários de ratas transplantados após congelamento, porém sem estímulo hormonal.

Já em ovelhas, Gosden et al. (1994) obtiveram duas gestações normais em 6 animais estudados, sendo uma a partir de transplante autólogo de tecido ovariano fresco e outra após congelamento e descongelamento. Salle et al. (1998) mostraram desenvolvimento normal de folículos em fragmentos corticais de ovário de 6 ovelhas transplantados para o hilo ovariano contralateral após congelamento. Folículos primordiais até os estágios antrais foram encontrados na análise histológica em todos os casos. Baird et al. (1999) descreveram apenas 7% de perda de folículos após congelamento e transplante autólogo em 8 ovelhas. Aubard et al. (1999) observaram desenvolvimento folicular em 6 ovelhas que tiveram ovários congelados reimplantados. Salle et al. (2003) descreveram 4 gestações em ovelhas que receberam ovários descongelados. Também em 2003, Bedaiwy et al. relataram preservação, em curto prazo, de tecido ovariano criopreservado transplantado em 100% dos casos e níveis de FSH semelhantes ao período pré re-implantação. Almodin et al. (2004) realizaram criopreservação de tecido ovariano e o transplantaram após irradiação, obtendo gravidez espontânea nas duas ovelhas. Arav et al. (2005) realizaram transplante de ovário inteiro criopreservado com anastomose vascular para o hilo ovariano contra-lateral e relataram atividade progestogênica, após 24-36 meses do reimplante, em 3 animais. Foi realizado, em duas, coleta oocitária e FIV, com posterior desenvolvimento de embrião de 8 células. Em 2006, Imhof et al. (2006) relataram uma gravidez espontânea após transplante de ovário inteiro com anastomose vascular em ovelhas.

### 2.8.2 – Transplante Autólogo Criopreservado em Humanos

Uma vez que o tecido ovariano foi congelado, ele pode ser transplantado de duas maneiras: Ortotópico – colocando o ovário ou fragmentos de ovário na fossa ovárica próximo ao ligamento infundíbulo-pélvico; Heterotópico – implantando o tecido para o tecido subcutâneo. Uma gravidez espontânea pode, teoricamente, ser obtida quando do transplante ortotópico em uma paciente

com trompas pérvias. No caso do heterotópico, quando os fragmentos são inseridos no subcutâneo abaixo da fáscia braquioradial ou no abdome abaixo da fáscia do músculo reto, a gravidez só será possível através de FIV (Akar & Oktay, 2005).

Em teoria, uma gestação natural pode ser obtida por meio de transplante ortotópico de tecido cortical ovariano congelado/descongelado, nos casos em que as tubas permanecerem intactas.

Em 2000, Oktay & Karlikaya reportaram um transplante via laparoscópica de tecido ovariano congelado/descongelado para a parede pélvica lateral, em uma paciente de 29 anos de idade, que havia sido submetida à ooforectomia bilateral por patologia benigna. Fragmentos do tecido ovariano criopreservado foram descongelados e transplantados. A paciente teve seu tecido ovariano estimulado por meio de gonadotrofinas após 15 semanas e novamente depois de 10 meses. O desenvolvimento folicular foi demonstrado pela ultra-sonografia e a ovulação ocorreu em resposta à administração de hormônio gonadotrófico humano (HCG).

O segundo caso de transplante ortotópico foi relatado por Radford et al. em 2001 e foi realizado em uma mulher de 36 anos com linfoma, que teve seu ovário direito criopreservado antes da realização de quimioterapia. Dezenove meses após, com a paciente em menopausa, dois fragmentos de tecido ovariano descongelado foram transplantados para a fossa ovárica direita e sobre o ovário esquerdo. Cinco meses depois, o estrogênio atingiu 352 pmol/l e a ultrassonografia revelou folículo 20 mm e endométrio 10 mm. Mais dois meses e a paciente não apresentava mais sintomas climatéricos. Posteriormente, (nove meses após o reimplante), o FSH e LH retornaram aos níveis pré-transplante (73 UI/l e 108 UI/l, respectivamente).

O nascimento do primeiro bebê após transplante de tecido ovariano congelado em humanos foi relatado por Donnez et al em 2004. Fragmentos de tecido ovariano de uma paciente com linfoma Hodgkin, que seria submetida a quimioterapia e radioterapia, foram criopreservados. Quatro anos após o fim do tratamento, os fragmentos foram descongelados e implantados em uma janela peritoneal, criada adjacente ao ovário direito. A paciente engravidou espontaneamente. Existe, entretanto, a possibilidade dessa gravidez ter se originado de um ócito que ovulou do ovário remanescente e não do tecido transplantado (Oktay & Tilly, 2004).

No ano seguinte, Meirou et al. (2005) relataram o segundo caso de nascido vivo, após transplante ovariano criopreservado em humanos, em um paciente com falência ovariana prematura, após quimioterapia. A paciente menstruou após 8 meses, e um aumento na dosagem de Hormônio anti-mülleriano e inibina B indicaram a presença de folículos em crescimento e ovulação. Após um ciclo de FIV, um embrião de 4 células foi transferido e a gravidez atingiu o termo.

Também em 2005, Schmidt et al. apresentaram os resultados de três casos de transplante de tecido ovariano para a cavidade peritoneal, próximo do sítio natural ovariano. Todas as três pacientes com ovários transplantados tiveram retorno da função endócrina ovariana confirmada pelo retorno dos ciclos, pela presença visível

de folículos pela ultra-sonografia e pelos níveis hormonais normais. Dois embriões foram obtidos de três oócitos coletados em metáfase II, mas não resultaram em gravidez após a transferência embrionária.

Em 2006, Demeestere et al., utilizando transplante ortotópico e heterotópico, obteve gravidez clínica em uma paciente. Tecido ovariano criopreservado de uma mulher de 29, anos tratada previamente com transplante de medula óssea após doença de Hodgkin, foi transplantado para o ovário, para o peritônio e para o tecido abdominal subcutâneo. Os marcadores de reserva ovariana foram se normalizando após 5 meses. Seis ciclos naturais foram acompanhados e a paciente engravidou durante o sexto, mas abortou após 7 semanas de gestação. Essa paciente continuou a ser acompanhada pelo grupo e, um ano após o primeiro transplante, um aumento no FSH e uma diminuição nos níveis de inibina B sugeriram deterioração dos fragmentos (Demeestere et al., 2007). Um novo transplante ortotópico e heterotópico foi então realizado: dois fragmentos de ovário foram suturados no ovário remanescente e mais dois no tecido subcutâneo abdominal. A partir do terceiro ciclo, o FSH retornou para valores abaixo de 10 UI/l e durante o quinto, 2 folículos de 15 mm cada foram observados no local do ovário remanescente. Um exame de gravidez positivo no 14º dia da fase lútea e batimentos cardíacos fetais à ultrassonografia (US) confirmaram a gestação. Esta transcorreu sem intercorrências e a paciente pariu uma menina saudável com 41 semanas de gravidez (Demeestere et al., 2007).

Ainda não se conhece a longevidade dos fragmentos de tecido ovariano e, desse modo, repetidos transplantes podem ser necessários para permitir a manutenção da função ovariana. Desse modo, o transplante heterotópico se torna mais factível evitando repetidos procedimentos invasivos e anestésias e tornando o acompanhamento e a captação de oócitos mais fácil. Entretanto, ainda não se conhece o melhor sítio para o transplante e o grande desafio é conseguir obter oócitos maduros e saudáveis (Kim, 2007).

O primeiro caso de transplante de tecido ovariano fragmentado para o subcutâneo foi descrito por Oktay et al. (2001) e foi realizado em uma paciente de 35 anos com carcinoma cervical estadió IIIB e que foi submetida a radioterapia pélvica. Após 10 meses do transplante, a ultrassonografia realizada mostrou folículo dominante 15 mm e quatro folículos antrais, enquanto que os níveis de FSH e LH entre 120 e 227 dias ficaram em torno de 8,6 UI/l e 12,8 UI/l, respectivamente.

Kim et al. (2004) realizaram transplante heterotópico de tecido ovariano em três mulheres com câncer de colo uterino. Das duas que sobreviveram, observou-se restauração da função ovariana após 14-18 semanas do transplante e essa função normal vem se mantendo desde então, apesar de novos transplantes terem sido necessários. O FSH basal em 2005 encontrava-se abaixo de 10 UI/l<sup>17</sup>. Os autores investigaram qual o melhor sítio para o transplante e viram que houve uma maior frequência de folículos dominantes quando o transplante foi feito para a parede abdominal, em comparação com mama e coxa, além de ser possível ocorrer ovulação espontânea. O grupo já conseguiu coletar cinco oóci-

tos maduros a partir do implante abdominal e um do implante na coxa.

Oktay et al. (2004) conseguiram obter um embrião de 4 células, após transplante heterotópico de tecido ovariano criopreservado de uma mulher de 36 anos com câncer de mama. Essa paciente havia sido submetida a mastectomia e esvaziamento axilar bilateral, além de ter recebido quimioterapia 6 anos antes. A paciente teve todos os sintomas do climatério e a menopausa após a quimioterapia. Três meses após o transplante, a mulher voltou a apresentar função ovariana e oócitos começaram a ser coletados.

Wolner-Hassen et al. (2005) relataram o transplante de tecido ovariano criopreservado para o antebraço. Apenas dois folículos desenvolveram e o tecido sobreviveu por apenas 7 meses. Os autores alertam sobre o risco de exposição à temperatura baixa, pressão alta e trauma para os fragmentos transplantados para o subcutâneo. Rosendahl et al. (2006) publicaram o caso de uma gravidez bioquímica, ocorrida após transplante ovariano heterotópico de tecido criopreservado. Uma paciente de 28 anos de idade, cujos ovários foram criopreservados previamente ao tratamento quimioterápico para linfoma de Hodgkin, teve fragmentos descongelados implantados no ovário remanescente, na parede pélvica e numa janela criada no retroperitônio. A mulher voltou a apresentar secreção hormonal e folículos desenvolveram-se nos três sítios. Os folículos que se desenvolveram no retroperitônio foram aspirados diversas vezes. Realizou-se Injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) nos óvulos coletados e embriões foram transferidos. Em uma dessas situações, o teste de gravidez ficou positivo 14 dias após a transferência. Entretanto, gravidez clínica não foi detectada.

Apesar de todos esses esforços, até o momento não houve nenhum relato de nascido vivo de tecido ovariano criopreservado transplantado heterotopicamente, o que pode ser atribuído ao fato dos folículos nunca atingirem mais do que 15 mm. Esse desenvolvimento folicular limitado pode ser devido a diferentes temperaturas e pressões que os folículos são submetidos no subcutâneo, quando comparado à cavidade abdominal (Donnez et al., 2006).

Apesar desses relatos de gravidezes em humanos, ainda permanecem dúvidas a respeito da origem desses oócitos, já que, em todos os casos, havia ovário residual que poderia ter reassumido sua função (Oktay, 2006). Diversos estudos (Schimmer et al., 1998; van Kasteren & Shoemaker, 1999) têm mostrado que, apesar de pequena, existe a chance de recuperação da função endócrina ovariana após quimio e radioterapia com posterior gravidez. Sanders et al. (1996) acompanharam 708 mulheres tratadas com altas doses de quimioterápicos e irradiação ionizante para tratamento de anemia aplásica e leucemias e observaram a normalização da função ovariana em 10 e gravidez espontânea em 32. Oktay & Oktem (2005) relataram o caso de uma paciente que, após ser submetida à quimioterapia, apresentou falência ovariana. Após transplante de tecido ovariano para o braço, o ovário voltou a apresentar função normal, levando, inclusive, ao nascimento de uma criança.

### 2.8.3 – Transplante de Ovário Inteiro com Reanastomose Vascular

Outra estratégia que vem sendo estudada é o transplante do ovário inteiro com reanastomose vascular. Através desta técnica, obtém-se fluxo sanguíneo imediato para o órgão transplantado, minimizando a injúria causada pela isquemia, que pode levar a diminuição da reserva folicular e conseqüente sobrevida do tecido. Wang et al. (2002b) descreveram o sucesso que obtiveram com essa técnica em ratas quando congelaram a parte superior do útero, o oviduto, o ovário com sua vascularização e depois realizaram o transplante com anastomose vascular. A função reprodutora normal foi restabelecida em 4 de 7 (57%) animais, sendo que um engravidou. Apesar do sucesso obtido em ratos, o congelamento de ovários inteiros de grandes animais ainda permanece como um desafio devido à dificuldade de difusão adequada do crioprotetor em grandes massas de tecido e à injúria vascular causada pela formação intravascular de gelo. Seguindo este raciocínio, Bedaiwy et al. (2003) relataram a restauração da função ovariana após auto-transplante de ovários intactos de ovelhas com anastomose vascular. Entretanto, deve-se ressaltar que 27% dos ovários foram perdidos durante o *follow-up*, devido a eventos trombóticos no pedículo vascular anastomosado.

Mais recentemente, Imhof et al. (2006) demonstraram que o auto-transplante de ovários inteiros de ovelhas com anastomose vascular pode levar à gravidez. E mais surpreendente é que, em seis dos oito ovários, os vasos estavam livres de trombos e a estrutura do estroma ovariano encontrava-se intacta, após 19 meses do procedimento.

Estudos em humanos já vêm sendo realizados, inclusive com a adoção de protocolos de congelamento. Martinez-Madrid et al. (2004) descreveram o processo de criopreservação e transplante de ovário inteiro com pedículo vascular e mostraram sobrevivência folicular de 75% e estrutura histológica normal. Entretanto, até o momento, ainda não há relatos de nascimentos ou gravidezes na literatura.

Apesar de todos esses resultados favoráveis, não podemos nos esquecer do risco de transmissão de células malignas através do tecido utilizado, com possibilidade de recidiva da doença, após o transplante.

Shaw et al. (1996) mostraram a transmissão de linfoma, em 7 de 7 fêmeas de camundongos, após transplante de tecido ovariano fresco e em 6 de 7 destes animais, que receberam transplante após congelamento. Entretanto, Kim et al. (2001) relataram que tecido ovariano retirado de pacientes com linfoma de alto grau é seguro para o transplante. Essa segurança foi testada através do xeno-transplante de tecido ovariano humano de pacientes com câncer para ratas imunodeficientes, sendo que nenhum dos animais transplantados desenvolveu a doença. No grupo controle, todos os ratos que receberam fatias de linfonodo contendo células de linfoma não Hodgkin desenvolveram linfoma de células B.

### 3 - PERSPECTIVAS

Além de todos os benefícios acima descritos, outras perspectivas futuras surgem para o uso do transplante

ovariano. A sua utilização em substituição à terapia de reposição hormonal do climatério seria uma alternativa mais fisiológica. Com o desenvolvimento de novas drogas imunossupressoras cada vez mais potentes e com menos efeitos colaterais, para a prevenção da rejeição de tecidos não-autólogos e com o aperfeiçoamento das técnicas de criopreservação e de crioprotetores, poderia se pensar em um banco de tecido ovariano. Entre as pacientes que se beneficiariam da existência desse tipo de banco, estão as portadoras de disgenesia gonadal, aquelas com falência ovariana precoce e até mesmo mulheres que tiveram que atrasar o projeto maternidade.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akar M, Oktay K. Restoration of ovarian endocrine function by ovarian transplantation. *Trends Endocrinol Metab.* 2005;16:374-80.
- Albani E, Barbieri J, Novara PV, Smeraldi A, Scaravelli G, Levi Setti PE. Oocyte Cryopreservation. *Placenta.* 2008; 29: S143-S146
- Almodin CG, Minguetti-Câmara VC, Meister H, Ferreira JO, Franco RL, Cavalcante, AA et al. Recovery of fertility after grafting of cryopreserved germinative tissue in female rabbits following radiotherapy. *Hum Reprod.* 2004 ;19:1287-93.
- American Cancer Society (ACS). [www.cancer.org](http://www.cancer.org) - estimated new cancer and death for 2007 and 2008, 02/2008.
- Arav A, Revel A, Nathan Y, Bor A, Gacitua H, Yavin S, et al. Oocyte recovery, embryo development and ovarian function after cryopreservation and transplantation of whole sheep ovary. *Hum Reprod.* 2005;20:3554-9.
- Aubard Y, Piver P, Cogni Y, Fermeaux V, Poulin N, Driancourt MA. Orthotopic and heterotopic autografts of frozen-thawed ovarian cortex in sheep. *Hum Reprod.* 1999;14:2149-54.
- Baird DT, Webb R, Campbell BK, Harkness LM, Gosden RG. Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at -196 C. *Endocrinology.* 1999;140:462-71.
- Barros FV, Oliveira RM, Massote F, Megale R, Geber S. Intra-peritoneal autologous ovarian transplantation. *Fertil Steril.* 2001;76 Suppl.3:S218.
- Barros FSV, Oliveira RM, Alves FMT, Sampaio M, Geber S. Successful ovarian autotransplant with no vascular reanastomosis in rats. *Transplantation.* 2008; 86: 1628-30
- Bedaiwy MA, Jeremias E, Gurunluoglu R, Hussein MR, Siemianow M, Biscotti C, et al. Restoration of ovarian function after autotransplantation of intact frozen-thawed sheep ovaries with microvascular anastomosis. *Fertil Steril.* 2003;79:594-602.
- Bisharah M, Tulandi T. Laparoscopic preservation of ovarian function: an underused procedure. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188:367-70.
- Blatt J. Pregnancy outcome in long-term survivors of childhood cancer. *Med Pediatr Oncol.* 1999;33:29-33.
- Blumenfeld Z, Avivi I, Linn S, Epelbaum R, Ben-Shahar M, Haim N. Prevention of irreversible chemotherapy-induced ovarian damage in young women with lymphoma by a gonadotrophin-releasing hormone agonist in parallel to chemotherapy. *Hum Reprod.* 1996;11:1620-6.
- Blumenfeld Z. How to preserve fertility in young women exposed to chemotherapy? The role of GnRH agonist cotreatment in addition to cryopreservation of embryos, oocytes, or ovaries. *Oncologist.* 2007;12:1044-54.
- Blumenfeld Z, Avivi I, Eckman A, Epelbaum R, Rowe JM, Dann EJ. Gonadotropin-releasing hormone agonist decreases

- chemotherapy-induced gonadotoxicity and premature ovarian failure in young female patients with Hodgkin lymphoma. *Fertil Steril*. 2008;89:166-73.
- Boldt J, Tidswell N, Sayers A. Human oocyte cryopreservation: 5-year experience with a sodium-depleted slow freezing method. *Reprod Biomed Online* 2006; 13:96-100.
- Borini A, Bonu MA, Coticchio G, Bianchi V, Cattoli M, Flamigni C. Pregnancies and births after oocyte cryopreservation. *Fertil Steril*. 2004;82:601-5.
- Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG. Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation. *Hum Reprod*. 1995;10:2334-8.
- Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG. Restoration of a normal reproductive lifespan after grafting of cryopreserved mouse ovaries. *Hum Reprod*. 2000;15:1300-4.
- Chian RC, Huang JY, Tan SL, Lucena E, Saa A, Rojas A. Obstetric and perinatal outcome in 200 infants conceived from vitrified oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008; 16:608-10.
- Cox SL, Shaw J, Jenkin G. Transplantation of cryopreserved fetal ovarian tissue to adult recipients in mice. *J Reprod Fertil*. 1996;107:315-22.
- Danforth DR, Arbogast LK, Friedman CI. Acute depletion of murine primordial follicle reserve by gonadotropin-releasing hormone antagonists. *Fertil Steril*. 2005;83:1333-8.
- Demeestere I, Simon P, Buxant F, Robin V, Fernandez SA, Centner J, et al. Ovarian function and spontaneous pregnancy after combined heterotopic and orthotopic cryopreserved ovarian tissue transplantation in a patient previously treated with bone marrow transplantation: case report. *Hum Reprod*. 2006;21:2010-4.
- Demeestere I, Simon P, Emiliani S, Delbaere A, Englert Y. Fertility preservation: successful transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated for Hodgkin's disease. *Oncologist*. 2007;12:1437-42.
- Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*. 2004;364:1405-10.
- Donnez J, Martinez-Madrid B, Jadoul P, Van Langendonck A, Demylle D, Dolmans MM. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. *Hum Reprod Update*. 2006;12:519-35.
- Fuller B, Paynter S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reprod Biomed Online*. 2004;9:680-91.
- Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C. *Hum Reprod*. 1994;9:597-603.
- Grifo JA, Noyes N. Delivery rate using cryopreserved oocytes is comparable to conventional in vitro fertilization using fresh oocytes: potential fertility preservation for female cancer patients. *Fertil Steril*. 2009; May 11. In press.
- Gunasena KT, Villines PM, Critser ES, Critser JK. Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries. *Hum Reprod*. 1997;12:101-6.
- Harp R, Leibach J, Black J, Keldahl C, Karow A. Cryopreservation of murine ovarian tissue. *Cryobiology*. 1994;31:336-43.
- Hovatta O. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online*. 2005;10:729-34.
- Imhof M, Bergmeister H, Lipovac M, Rudas M, Hofstetter G, Huber J. Orthotopic microvascular reanastomosis of whole cryopreserved ovine ovaries resulting in pregnancy and live birth. *Fertil Steril*. 2006;85 Suppl 1:1208-15.
- Instituto do Cancer (INCA). [www.inca.gov.br/estimativa de câncer para 2008](http://www.inca.gov.br/estimativa-de-cancer-para-2008), 02/2008.
- Jain JK, Paulson RJ. Oocyte cryopreservation. *Fertil Steril*. 2006;86 Suppl 4:1037-46.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, et al. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin*. 2006;56:106-30.
- Kagabu S, Umezu M. Transplantation of cryopreserved mouse, Chinese hamster, rabbit, Japanese monkey and rat ovaries into rat recipients. *Exp Anim*. 2000;49:17-21.
- Kim SS, Radford J, Harris M, Varley J, Rutherford AJ, Lieberman B, et al. Ovarian tissue harvested from lymphoma patients to preserve fertility may be safe for autotransplantation. *Hum Reprod*. 2001;16:2056-60.
- Kim SS, Hwang IT, Lee HC. Heterotopic autotransplantation of cryobanked human ovarian tissue as a strategy to restore ovarian function. *Fertil Steril*. 2004;82:930-2.
- Kim SS, Kang HG, Kim NH, Lee HC, Lee HH. Assessment of the integrity of human oocytes retrieved from cryopreserved ovarian tissue after xenotransplantation. *Hum Reprod*. 2005;20:2502-8.
- Kim SS. Fertility preservation in female cancer patients: current developments and future directions. *Fertil Steril*. 2006;85:1-11.
- Kim TJ, Laufer LR, Hong SW. Vitrification of oocytes produces high pregnancy rates when carried out in fertile women. *Fertil Steril*. 2009; Feb 11. In press.
- Lee RK, Ho HY, Yu SL, Lu CH. Blastocyst development after cryopreservation and subcutaneous transplantation of mouse ovarian tissue. *J Assist Reprod Genet*. 2005;22:95-101.
- Levi Setti PE, Novara PV, Barbieri J, Albani E, Morenghi M, Arfuso V. A worldwide meta-analysis of oocyte cryopreservation experience. *Reprod Biomed Online*. 2009; March 11. In press.
- Liu J, Van Der Elst J, Van Den Broecke R, Dumortier F, Dhont M. Maturation of mouse primordial follicles by combination of grafting and in vitro culture. *Biol Reprod*. 2000;62:1218-23.
- Liu J, Van der Elst J, Van den Broecke R, Dhont M. Live offspring by in vitro fertilization of oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential in vivo transplantation and in vitro maturation. *Biol Reprod*. 2001;64:171-8.
- Liu J, Van der Elst J, Van den Broecke R, Dhont M. Early massive follicle loss and apoptosis in heterotopically grafted newborn mouse ovaries. *Hum Reprod*. 2002;17:605-11.
- Lobo RA. Potential options for preservation of fertility in women. *N Engl J Med*. 2005;353:64-73.
- Martinez-Madrid B, Dolmans MM, Van Langendonck A, Defrère S, Donnez J. Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. *Fertil Steril*. 2004;82:1390-4.
- Mattle V, Behringer K, Engert A, Wildt L. Female fertility after cytotoxic therapy--protection of ovarian function during chemotherapy of malignant and non-malignant diseases. *Eur J Haematol Suppl*. 2005;75:77-82.
- Meirow D, Nugent D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Hum Reprod Update*. 2001;7:535-43.
- Meirow D, Assad G, Dor J, Rabinovici J. The GnRH antagonist cetrorelix reduces cyclophosphamide-induced ovarian follicular destruction in mice. *Hum Reprod*. 2004;19:1294-9.
- Meirow D, Levron J, Eldar-Geva T, Hardan I, Fridman E, Zalel Y, et al. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med*. 2005;353:318-21.
- Migishima F, Suzuki-Migishima R, Quintero RB, Yokoyama M, Behr BR. Successful pregnancies after transplantation of frozen-thawed mouse ovaries into chimeric mice that received lethal-dose radiation. *Fertil Steril*. 2006;86 Suppl 4:1080-7.
- Morita Y, Perez GI, Paris F, Miranda SR, Ehleiter D, Haimovitz-Friedman A, et al. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nat Med*. 2000;6:1109-14.
- Newton H, Aubard Y, Rutherford A, Sharma V, Gosden R. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod*. 1996;11:1487-91.
- Oktaý K, Newton H, Mullan J, Gosden RG. Development of

- human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. *Hum Reprod.* 1998;13:1133-8.
- Oktay K, Karlikaya G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. *N Engl J Med.* 2000;342:1919.
- Oktay K, Economos K, Kan M, Rucinski J, Veeck L, Rosenwaks Z. Endocrine function and oocyte retrieval after autologous transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. *JAMA.* 2001;286:1490-3.
- Oktay K, Tilly J. Livebirth after cryopreserved ovarian tissue autotransplantation. *Lancet.* 2004; 364:2091-2;
- Oktay K, Buyuk E, Veeck L, Zaninovic N, Xu K, Takeuchi T, et al. Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet.* 2004; 363:837-40.
- Oktay K, Buyuk E, Libertella N, Akar M, Rosenwaks Z. Fertility preservation in breast cancer patients: a prospective controlled comparison of ovarian stimulation with tamoxifen and letrozole for embryo cryopreservation. *J Clin Oncol.* 2005; 23:4347-53.
- Oktay K, Oktem, O. Sustained endocrine function and spontaneous pregnancies after subcutaneous transplantation of cryopreserved ovarian tissue in stem cell transplant recipients. *Fertil Steril.* 2005; 84 Suppl 1:S68.
- Oktay K, Cil AP, Bang H. Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. *Fertil Steril.* 2006; 86:70-80.
- Oktay K. Spontaneous conceptions and live birth after heterotopic ovarian transplantation: is there a germline stem cell connection? *Hum Reprod.* 2006; 21:1345-8.
- Paris F, Perez GI, Fuks Z, Haimovitz-Friedman A, Nguyen H, Bose M, et al. Sphingosine 1-phosphate preserves fertility in irradiated female mice without propagating genomic damage in offspring. *Nat Med.* 2002;8:901-2.
- Parkes AS. Survival time of ovarian homografts in two strains of rats. *J Endocrinol.* 1956;13:201-10.
- Parmegiani L, Bertocci F, Garelo C, Salvarani MC, Tambuscio G, Fabbri R. Efficiency of human oocyte slow freezing: results from five assisted reproduction centres. *Reprod Biomed Online.* 2009;18:352-9.
- Poniatowski BC, Grimm P, Cohen G. Chemotherapy-induced menopause: a literature review. *Cancer Invest.* 2001;19:641-8.
- Prates LFS, Massote F, Souza JHK, Geber S. Transplante autólogo de tecido ovariano para o peritônio de ratas após congelamento e descongelamento. *JBRA.* 2008; 12:27-31.
- Radford JA, Lieberman BA, Brison DR, Smith AR, Critchlow JD, Russell SA, et al. Orthotopic reimplantation of cryopreserved ovarian cortical strips after high-dose chemotherapy for Hodgkin's lymphoma. *Lancet.* 2001;357:1172-5.
- Rosendahl M, Loft A, Byskov AG, Ziebe S, Schmidt KT, Andersen AN, et al. Biochemical pregnancy after fertilization of an oocyte aspirated from a heterotopic autotransplant of cryopreserved ovarian tissue: case report. *Hum Reprod.* 2006;21:2006-9.
- Salehnia M. Autograft of vitrified mouse ovaries using ethylene glycol as cryoprotectant. *Exp Anim.* 2002;51:509-12.
- Salle B, Lornage J, Franck M, Isoard L, Rudigoz RC, Guerin JF. Freezing, thawing, and autograft of ovarian fragments in sheep: preliminary experiments and histologic assessment. *Fertil Steril.* 1998;70:124-8.
- Salle B, Demirci B, Franck M, Berthollet C, Lornage J. Long-term follow-up of cryopreserved hemi-ovary autografts in ewes: pregnancies, births, and histologic assessment. *Fertil Steril.* 2003;80:172-7.
- Sanders JE, Hawley J, Levy W, Gooley T, Buckner CD, Deeg HJ, et al. Pregnancies following high-dose cyclophosphamide with or without high-dose busulfan or total-body irradiation and bone marrow transplantation. *Blood.* 1996;87:3045-52.
- Schimmer AD, Quatermain M, Imrie K, Ali V, McCrae J, Stewart AK, et al. Ovarian function after autologous bone marrow transplantation. *J Clin Oncol.* 1998;16:2359-63.
- Schmidt KL, Andersen CY, Loft A, Byskov AG, Ernst E, Andersen AN. Follow-up of ovarian function post-chemotherapy following ovarian cryopreservation and transplantation. *Hum Reprod.* 2005;20:3539-46.
- Shaw JM, Bowles J, Koopman P, Wood EC, Trounson AO. Fresh and cryopreserved ovarian tissue samples from donors with lymphoma transmit the cancer to graft recipients. *Hum Reprod.* 1996;11:1668-73.
- Sklar CA, Mertens AC, Mitby P, Whitton J, Stovall M, Kasper C, et al. Premature menopause in survivors of childhood cancer: a report from the childhood cancer survivor study. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98:890-6.
- Soleimani R, Van der Elst J, Heytens E, Van den Broecke R, Gerris J, Dhont M, et al. Back muscle as a promising site for ovarian tissue transplantation, an animal model. *Hum Reprod.* 2008;23:619-26.
- Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in female patients. *Hum Reprod Update.* 2004;10:251-66.
- Souza JHK, Costa EB, Sales L, Sampaio M, Geber S. Ovulation induction with rFSH after autologous transplantation of frozen/thaw ovaries to rat peritoneum. *Fertil Steril.* 2005; 84:69-69.
- Sugimoto M, Maeda S, Manabe N, Miyamoto H. Development of infantile rat ovaries autotransplanted after cryopreservation by vitrification. *Theriogenology.* 2000 15;53:1093-103.
- Tulandi T, Huang JYJ, Tan SL. Preservation of Female Fertility. *Obstet Gynecol.* 2008; 112:1160-72.
- van Kasteren YM, Schoemaker J. Premature ovarian failure: a systematic review on therapeutic interventions to restore ovarian function and achieve pregnancy. *Hum Reprod Update.* 1999;5:483-92.
- Wallace WH, Shalet SM, Hendry JH, Morris-Jones PH, Gattamaneni HR. Ovarian failure following abdominal irradiation in childhood: the radiosensitivity of the human oocyte. *Br J Radiol.* 1989;62:995-8.
- Wallace WH, Thomson AB, Kelsey TW. The radiosensitivity of the human oocyte. *Hum Reprod.* 2003;18:117-21.
- Wang H, Mooney S, Wen Y, Behr B, Polan ML. Follicle development in grafted mouse ovaries after cryopreservation and subcutaneous transplantation. *Am J Obstet Gynecol.* 2002a; 187:370-4.
- Wang X, Chen H, Yin H, Kim SS, Lin Tan S, Gosden RG. Fertility after intact ovary transplantation. *Nature.* 2002b; 415:385.
- Waxman J. Gonadotrophin hormone releasing analogues open new doors in cancer treatment. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1987;295:1084-5.
- Wølner-Hanssen P, Hägglund L, Ploman F, Ramirez A, Manthorpe R, Thuring A. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue to the right forearm 4(1/2) years after autologous stem cell transplantation. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2005;84:695-8.
- World Health Organization (WHO). [www.who.int/cancer/statistics](http://www.who.int/cancer/statistics), 02/2008.
- Wu J, Zhang L, Wang X. In vitro maturation, fertilization and embryo development after ultrarapid freezing of immature human oocytes. *Reproduction.* 2001;121:389-93.
- Yang HY, Cox SL, Jenkin G, Findlay J, Trounson A, Shaw J. Graft site and gonadotrophin stimulation influences the number and quality of oocytes from murine ovarian tissue grafts. *Reproduction.* 2006;131:851-9.
- Yin H, Wang X, Kim SS, Chen H, Tan SL, Gosden RG. Transplantation of intact rat gonads using vascular anastomosis: effects of cryopreservation, ischaemia and genotype. *Hum Reprod.* 2003;18:1165-72.

**AGENDA DE EVENTOS PARA 2009****FEVEREIRO**

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

**MARÇO**

**11 a 14/03** - 2009 APGO/CREOG

**ABRIL**

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

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

**23 a 25/04** - 9º. Congresso Geral da Redlara - Cancun  
informações: [info@redlara.com](mailto:info@redlara.com)



Conheça a Red-Lara [www.redlara.com](http://www.redlara.com)

**MAIO**

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

**JUNHO**

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

**Plenarium Organização de Eventos**

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

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

[www.plenariumcongressos.com.br](http://www.plenariumcongressos.com.br) / [www.almerweb.com](http://www.almerweb.com)



Red Latinoamericana de  
Reproducción Asistida



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

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

**AGOSTO**

Agosto - Congresso Brasileiro de Reprodução Assistida (SBRA)

**SETEMBRO**

**24 - 26/09** - American Urogynecologic Society

**OUTUBRO**

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

**NOVEMBRO**

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



## **Venha para a SBRA!**

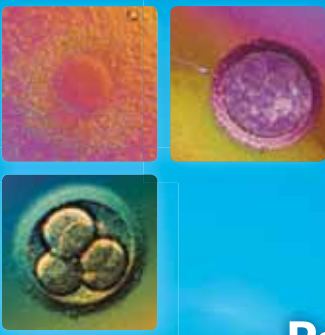
### **Para ser sócio da SBRA:**

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

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

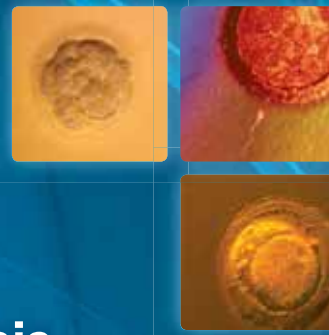
**Benefícios aos Associados:**  
**Recebimento do Jornal SBRA**  
**Desconto na Inscrição para**  
**as reuniões anuais da SBRA**



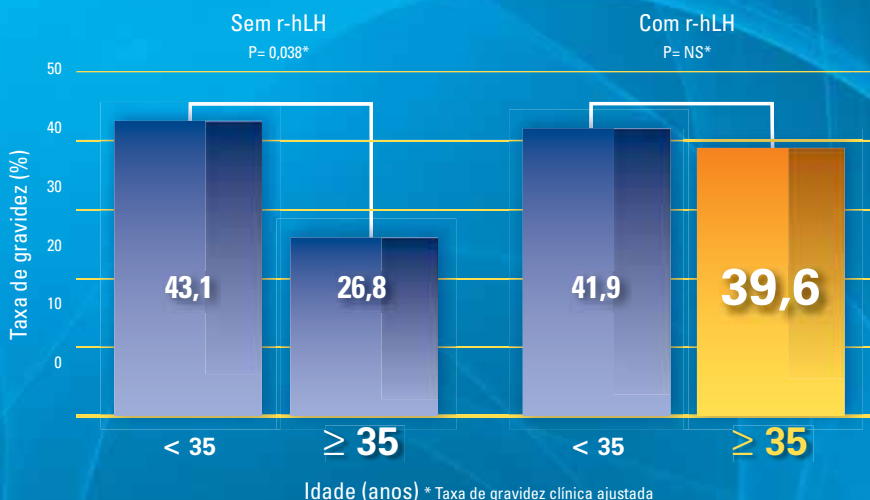


# Luveris®

## alfalutropina



**Pacientes com idade reprodutiva mais avançada podem se beneficiar com a adição de r-hLH quando submetidas a ART<sup>1</sup>**



**Possibilita a individualização do tratamento<sup>2</sup>**

**LUVERIS® 75 UI (alfalutropina) - USO ADULTO - Para uso subcutâneo. Indicação:** Luveris® em associação com uma preparação de hormônio folículo estimulante (FSH), é recomendado para a estimulação do desenvolvimento folicular em mulheres com insuficiência grave de LH e FSH. Luveris® deve ser administrado segundo um esquema de injeções diárias, simultaneamente ao FSH. Dado que estas pacientes são amenorréicas e têm uma reduzida secreção de estrogênios endógenos, o tratamento pode ser iniciado a qualquer momento. **Contraindicações:** hipersensibilidade às gonadotrofinas ou a qualquer dos excipientes; carcinoma do útero, ovário ou mama; tumores ativos, não tratados, do hipotálamo e da hipófise; hipertrofia ou cistos ovarianos de etiologia desconhecida; hemorragias ginecológicas de etiologia desconhecida. **Precações e advertências:** Não deve ser utilizado quando não é possível a obtenção de uma resposta efetiva, tais como, falência ovariana, má formação dos órgãos sexuais ou tumores fibróides do útero incompatíveis com a gravidez. As pacientes devem ser examinadas em relação a hipotireoidismo, insuficiência da supra-renal, hiperprolactinemia e tumores do hipotálamo ou hipófise. Risco aumentado de hiperestimulação, podendo conduzir a um grave quadro clínico, caracterizado por cistos ovarianos de grandes dimensões, que podem romper. Uma excessiva resposta ovariana raramente origina uma hiperestimulação significativa, exceto se houver administração de hCG para induzir a ovulação. Portanto, é prudente não administrar hCG nestes casos e recomendar à paciente a abstenção de relações sexuais, ou métodos anticoncepcionais de barreira, durante pelo menos 4 dias. Recomenda-se a monitorização com ecografia, bem como medições do estradiol. Em pacientes submetidas à indução de ovulação, a incidência de gravidez e nascimentos múltiplos é maior, em comparação à concepção natural. Luveris® não deve ser administrado durante a gravidez e a amamentação, em idosos, crianças e outros grupos de risco. Não se conhecem os efeitos da superdosagem com alfalutropina, no entanto, pode-se admitir a ocorrência da síndrome da hiperestimulação ovariana. **Reações adversas:** A alfalutropina é utilizada em associação com alfafolitropina, sendo difícil atribuir efeitos indesejáveis a qualquer das substâncias utilizadas. Foram relatadas reações ligeiras e moderadas no local da injeção (equimose, dor, rubor, prurido ou edema). Não foram relatadas reações graves no local da injeção nem reações alérgicas sistêmicas após a administração de Luveris®. A síndrome de hiperestimulação ovariana foi observada em menos de 6% das pacientes tratadas com Luveris®. Não foi relatada síndrome de hiperestimulação ovariana grave. Podem ocorrer tromboembolia, torsão dos anexos (uma complicação do aumento do volume ovariano) e hemoperitônio. Pode também ocorrer gravidez ectópica, especialmente em mulheres com história de doença tubária anterior. Reações mais comuns: reações no local da injeção, cefaléia, sonolência, náuseas, dor abdominal, dor pélvica, síndrome de hiperestimulação ovariana, cistos ovarianos, dor nas mamas. **Posologia:** O tratamento deve ser adaptado à resposta individual da paciente, avaliada pela medição das dimensões do folículo por meio de ecografia e do nível de estrogênios. Inicia-se com a administração diária de 75 UI de alfalutropina, por até 3 semanas, em associação com 75-150 UI de FSH. Se um aumento da dose de FSH for considerado apropriado, o ajuste da dose deve ser efetuado, de preferência, após intervalos de 7-14 dias e, de preferência, com incrementos de 37,5-75 UI. Pode ser aceitável prolongar a duração da estimulação em qualquer um dos ciclos até 5 semanas. Quando se obtém uma resposta ótima, deve ser administrada uma única injeção de hCG, 24-48 horas após as últimas injeções de Luveris® e de FSH. Recomenda-se que a paciente tenha relações sexuais no dia da administração de hCG, bem como no dia seguinte. Como alternativa, pode ser efetuada uma inseminação intra-uterina. Pode ser necessário um suporte da fase lútea, uma vez que a ausência de substâncias com atividade luteotrópica (LH / hCG) após a ovulação pode conduzir a uma falência prematura do corpo lúteo. Se for obtida uma resposta excessiva, o tratamento deve ser interrompido e o hCG não deve ser administrado. O tratamento deve ser reiniciado no ciclo seguinte, com uma dose de FSH inferior à do ciclo anterior. **Modo de Usar:** Para administração subcutânea única e imediata após abertura e reconstituição. Luveris® pode ser misturado com Gonal-f® monodose em 1 ml de solvente, e co-administrado numa injeção única. Neste caso Luveris® deve ser reconstituído em primeiro lugar e depois utilizado para reconstituir o pó de alfafolitropina. Os produtos não utilizados ou os resíduos devem ser descartados. **Conservação:** Conservar em temperatura abaixo de 25°C. Proteger da luz. Nessas condições o medicamento é estável por 36 meses. VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA. SAC Merck Serono: 0800-113320. Reg MS 1.0089.0354

**Referência:** 1. Marrs R, Meldrum D, Muasher S, Schoolcraft W, Werlin L, Kelly E. Randomized trial to compare effect of recombinant human FSH (folitropin alfa) with or without recombinant human LH in women undergoing assisted reproduction treatment. RBM On-Line 2004; v. 8, n. 2, February. 2. Shoham Z, Balen A, Patel A et al. Results of ovulation induction using human menopausal gonadotropin or purified follicle-stimulating hormone in hypogonadotrophic hypogonadism patients. Fertil Steril 1991; 56: 1048-1053.

**Contraindicação:** pacientes com carcinoma do útero, ovário ou mama. **Interação medicamentosa:** Luveris® não deve ser coadministrado a outros medicamentos na mesma seringa, exceto Gonal-f® na apresentação monodose. A PERSISTIREM OS SINTOMAS O MÉDICO DEVERÁ SER CONSULTADO.