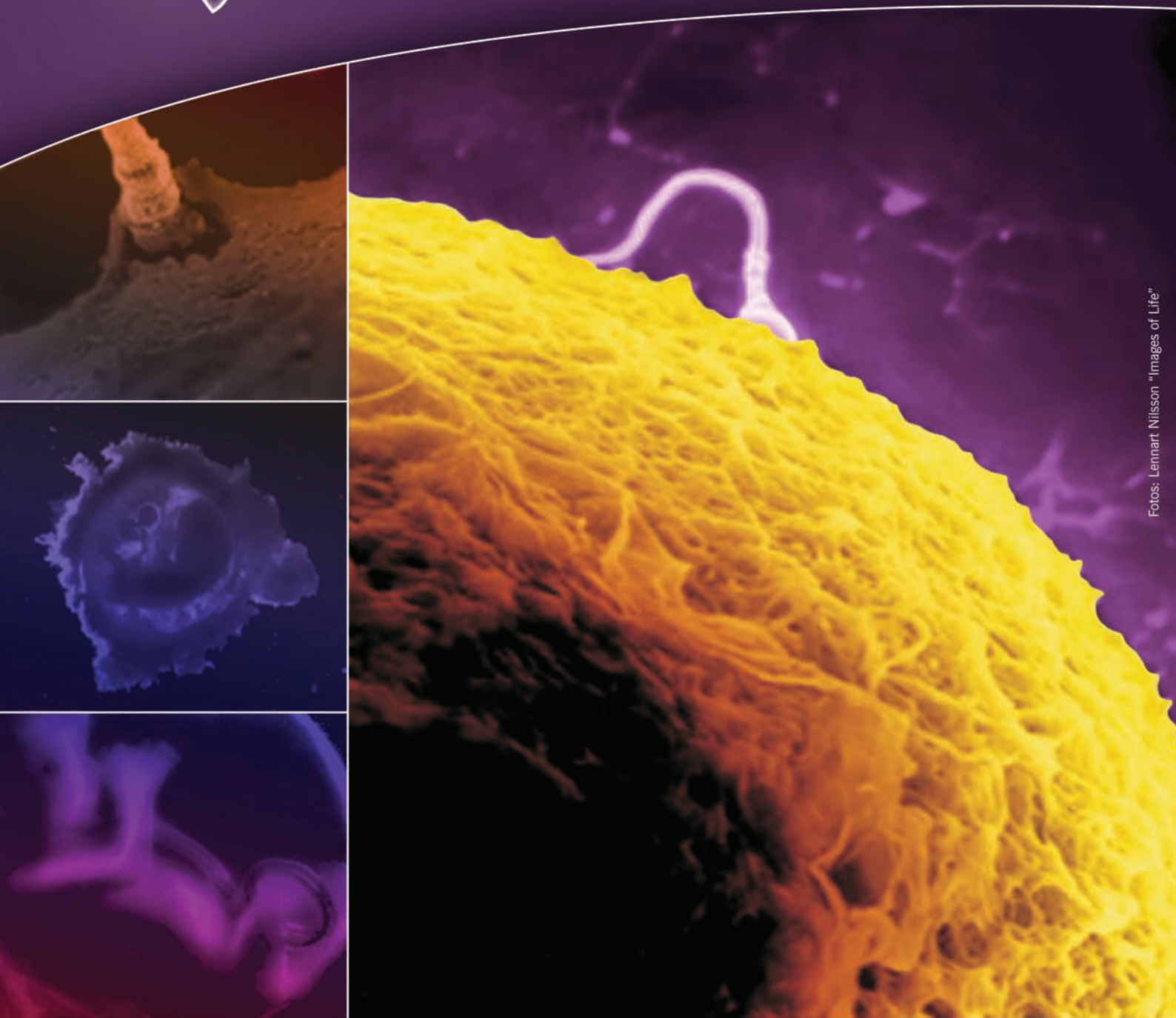


JBRA

Volume 12 | Número 4 | Out-Nov-Dez 2008 | ISSN 1517-5693

JORNAL BRASILEIRO DE
REPRODUÇÃO
ASSISTIDA



Fotos: Lennart Nilsson "Images of Life"



Nosso papel é abraçar grandes causas.

wpubliidade.com.br

Compromisso com a qualidade

Merck Serono é a Divisão da **Merck S.A.** especializada em produtos inovadores de prescrição médica. A Divisão foi estabelecida efetivamente em 5 de janeiro de 2007, com a aquisição da **Serono** pela **Merck** e a integração das áreas de negócios das duas empresas.

A **Merck Serono** tem uma forte presença em diversos países, com marcas líderes que atendem os pacientes nas áreas terapêuticas de Oncologia, Neurologia, Saúde

Reprodutiva, Dermatologia, Ortopedia, Saúde Feminina, Cardiologia, Metabolismo e Pediatria.

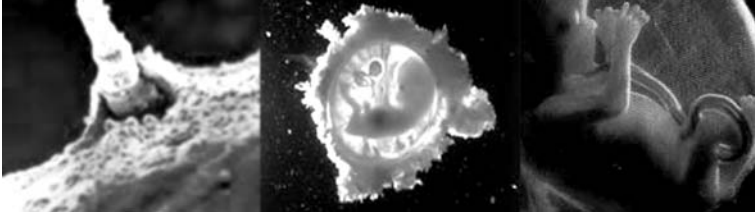
A Divisão **Merck Serono** tem o compromisso de buscar sempre o melhor através da excelência de seus colaboradores e da qualidade de seus produtos.

▶ **Somos a única empresa que possui o portfólio completo para o tratamento da infertilidade.**

Serviço de Atendimento Merck Serono
0800 113320

f@rtilidade
online.com.br
www.fertilidadeonline.com.br

MERCK
SERONO



JBRA JORNAL BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA

CORPO EDITORIAL NACIONAL

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

Editor Adjunto

| | | |
|----------------------|-----|----|
| Paulo Franco Taitson | IRH | MG |
|----------------------|-----|----|

Consultor Editorial

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

Assistente Editorial

| | | |
|------------------|--|--|
| Bruno B de Souza | | |
|------------------|--|--|

Editores Associados

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

Conselho editorial

| | | |
|-------------------------------|----------------------|----|
| Adelino Amaral Silva | GENESIS | DF |
| Alessandro Schuffner | CONCEBER | PR |
| Alvaro Petracco | FERTILITAT | RS |
| Ana Cristina Allemand Mancebo | G&O BARRA | RJ |
| Aroldo Camargos | UFMG | MG |
| Bela Zausner | GENESE | BA |
| Bruno Scheffer | IBRA | MG |
| Carlos André Henriques | G&O BARRA | RJ |
| Claudia G. Petersen | CRH - Ribeirão Preto | SP |
| Condesmar Marcondes Filho | NÚCLEO REPRODUÇÃO | SP |
| Dirceu Mendes Pereira | PROFERT | SP |
| Eduardo Pandolfi Passos | SEGIR - UFRGS | RS |
| Elvio Tognotti | FMUSP | SP |
| Fabio Firmbach Pasqualotto | UCS - Conception | RS |
| Humberto Ikuo Shibasaki | UFMT | MT |
| João Pedro Junqueira Caetano | PRÓ-CRIAR/MATER DEI | MG |
| Joaquim Roberto Lopes | CENAFERT | BA |
| Jonathas Borges Soares | PROJETO ALPHA | SP |

| | | |
|---------------------------------|----------------------------------|----|
| Jorge Hallak | REPROFERTY | SP |
| Leila Montenegro Silveira Farah | FERTILITY | SP |
| Lídio Jair Ribas Centa | ANDROLAB | PR |
| Luiz Fernando Dale | Centro de Medicina da Reprodução | RJ |

| | | |
|----------------------|------------------------------|----|
| Marcos Sampaio | ORIGEN | MG |
| Mariangela Badalotti | FERTILITAT | RS |
| Marilza Vieira Rudge | UNESP Botucatu | SP |
| Mario Cavagna | Hospital Pérola Byington | SP |
| Newton Eduardo Busso | UNIFERT | SP |
| Paulo Franco Taitson | IRH | MG |
| Paulo Serafini | HUNTINGTON | SP |
| Paulo Spinola | CEPARH | BA |
| Renzo Antonini Filho | Instituto de Saúde da Mulher | mg |

| | | |
|----------------------|---------------------------------------|----|
| Ricardo Melo Marinho | MATER DEI | MG |
| Roberta Wonchockier | Projeto Alfa | SP |
| Roger Abdelmassih | Clinica e Centro de Reprodução Humana | SP |

| | | |
|-----------------------|---|----|
| Rosana Maria dos Reis | Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto | SP |
|-----------------------|---|----|

| | | |
|--------------|------------------------------------|----|
| Sidney Glina | Hospital Israelita Albert Einstein | SP |
|--------------|------------------------------------|----|

| | | |
|----------------|--------|----|
| Silvana Chedid | CEPERH | SP |
|----------------|--------|----|

CORPO EDITORIAL INTERNACIONAL

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

Diretoria da SBRA - 2007/2008

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

Departamento de Publicações

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

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

Departamento de Publicações:

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

Comissão de Atividades Internacionais:

Marcos Sampaio
Ricardo Baruffi

Departamento Científico:

Mario Cavagna
Fabio Pasqualotto
Eduardo Motta

Comissão de Ética e Defesa de Prerrogativa:

Bela Zausner
Arthur Dzik
Lídio Jair Ribas Centa
Luiz Fernando Dale

Comissão de Educação Continuada:

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

Conselho Fiscal:

Joaquim Roberto C. Lopes
Condesmar Marcondes Filho
César
Jonathas Borges

Conselho Consultivo:

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

Comissão de Comunicação:

Paulo Franco Taitson
Lia Ferragut
César Cornel

Relações Governamentais:

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

INFORMAÇÕES GERAIS

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

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

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

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

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

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

7. Para textos que forem aceitos para publicação, uma declaração, assinada por todos os autores deverá ser enviada à revista, contendo as seguintes informações: a) o manuscrito é original; b) o manuscrito não foi publicado nem submetido a outra revista, nem o será se vier a ser publicado no J Bras Rep Assist; c) todos os autores participaram ativamente na elaboração do estudo e aprovaram a versão final do texto; d) situações de potencial conflito de interesse (financeiro ou de outra natureza) estão sendo informadas; e) foi obtida aprovação do estudo pelo comitê de ética da instituição 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 J Bras Rep Assist serão bem recebidas e publicadas desde que aceitas pelo Conselho Editorial. Devem ser compostas de: título, nome do autor, identificação da publicação que está sendo comentada e lista de referências (se houver). Recomenda-se um máximo de 500 palavras, incluindo referências. Sempre que possível, uma resposta dos autores será publicada juntamente com a carta.

PREPARAÇÃO DOS ORIGINAIS

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

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 intelectualmentemente, mas cuja contribuição não justifica co-autoria, ou de pessoas ou instituições que tenham dado apoio material.

REFERÊNCIAS

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

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

1. Artigo de periódico

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

2. Livro

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

3. Capítulo de livro

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

4. Artigo de revista eletrônica

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

5. Artigo publicado na Internet:

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

6. Site

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

7. Software

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

TABELAS E FIGURAS

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

Nas tabelas, deverão ser utilizadas apenas linhas horizontais, e cada dado deverá constar em uma célula independente. Explicações sobre itens das tabelas devem ser apresentadas em notas de rodapé identificadas pelos seguintes símbolos, nesta 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 (jornalsbra@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>



Portfólio completo
para o tratamento
da infertilidade.



GONAL-f
alfafolitropina

Preenchido por massa Injetor

O preenchimento por massa assegura
uma dosagem homogênea e garante
um nível uniforme de atividade de FSH¹⁻³



Luveris

alfalutropina

Benefício da adição
de r-hLH em pacientes
com idade reprodutiva
mais avançada⁴



Cetrotide
acetato de cetrorrelax

Reduz o tempo de
tratamento comparado
ao protocolo longo com
agonista GnRH⁵⁻⁷

IVIDREL Seringa
Pré-enchida
alfacoriogonadotropina



O hCG confiável⁸⁻¹³



Crinone
progesterona gel 8%

Otimiza o suporte
de progesterona
na fase lútea

Serviço de Atendimento Merck Serono
0800 113320

fertilidade
online.com.br
www.fertilidadeonline.com.br

MERCK
SERONO



XIII Congresso Brasileiro de Reprodução Assistida

27 a 29 de agosto de 2009

www.repassist2009.com.br

Reserve essa data em sua agenda



Inscrições no site do evento.

LOCAL DO EVENTO:

Estação Embratel Convention Center
Curitiba - PR
Avenida Sete de Setembro, 2775

INFORMAÇÕES

EKIPE DE EVENTOS
Tel. 41 3022-1247
Fax. 41 3022-3005
e-mail: ekipe@ekipedeeventos.com.br

TEMAS LIVRES:

Dia 11 de Junho de 2009
Data limite para envio de
trabalhos científicos

PASSAGEM E HOSPEDAGEM

M. LEAL Agência de Viagens
Tel. 41 3343-4300
e-mail: mleal@mleal.com.br

Editorial
Prezados amigos e amigas da SBRA.

Adelino Amaral Silva

10

Artigo Original
Polimorfismo do receptor do fsh em mulheres com endometriose e infertilidade.

Gustavo Peretti Rodini, Fernanda dos Santos Pereira, Úrsula da Silveira Matte, Elisângela Arbo, Carlos Augusto Bastos de Souza, João Sabino L. Cunha-Filho

11

Vitri-ingá: um novo protocolo de vitrificação.

Fernanda Carolina Fachini, Carlos Gilberto Almodin MD.Ph.D., Vania Cibele Minguetti-Câmara M.Sc., Antonio Fernandes Moron MD.Ph.D., Raul Nakano, Litsuko Shimabukuru

16

O perfil reprodutivo masculino em relação ao uso de drogas ilícitas, ao tabagismo, à obesidade e à idade avançada.

Ayres, L. S.; Telöken, C. ; Moraes, J. F. D. Badalotti M, Petracco A, Azambuja R

20

Comparação dos resultados entre embriões descongelados provenientes de injeção intracitoplasmática de espermatozóides com espermatozóides ejaculados frescos ou criopreservados

Priscila Queiroz,, Daniela Paes Almeida Ferreira Braga, Tatiana Carvalho de Souza Bonetti, Assumpto Iaconelli Jr, Tsutomu Aoki, Edson Borges Jr

25

Presença de espermatozóides no ejaculado em pacientes com azoospermia não-obstrutiva

Kamila Peixoto Ribeiro, Fernanda Karoline Lemos da Silva, Ubiratan Barros de Melo, Paulo Franco Taitson

30

A origem do espermatozóide e a qualidade seminal não influenciam a incidência de clivagem precoce em ciclos de ICSI

Edson Borges Jr.,, Fabio Firmbach Pasqualotto,,Tatiana Carvalho de Souza Bonetti, ,Daniela Paes Almeida Ferreira Braga, Assumpto Iaconelli Jr.

34

Eventos

40

Prezados amigos e amigas da SBRA

No congresso anual da SBRA realizado em agosto passado foi eleita por unanimidade a nova diretoria para o biênio 2009/2010. A diretoria é composta por colegas que estão dispostos a engrandecer cada vez mais a nossa entidade com o compromisso de muito trabalho e pouca política. Definimos na assembléia geral os locais onde serão realizados os próximos eventos da SBRA. O XIII congresso será realizado em Curitiba sob a responsabilidade do Dr. Lídio Centa. O XIV(2010) será em Fortaleza sob a coordenação do Dr. Marcelo Rocha

As principais metas da diretoria eleita são: Fortalecimento da sociedade com aumento de sua representatividade junto aos órgãos governamentais; estruturação financeira com previsão orçamentária anual, cadastramento de todas as clínicas com inserção no site da SBRA do endereço e website, Valorização do associado através de subsídios em inscrição nos eventos SBRA,

A nossa revista continuará sob a responsabilidade da Dra. Maria da Carmo Borges de Souza e necessita que os colegas prestigiem enviando trabalhos para publicação. A última assembléia deliberou que só será convidado para ser palestrante dos eventos da SBRA as pessoas que publicaram ou estão com trabalhos aceitos para publicação nos últimos dois anos. Esta medida é um resgate do pensamento dos fundadores da SBRA e terá amplo apoio da diretoria.

Que as festas sejam um momento de reflexões e confraternização e que 2009 seja de muita paz, harmonia e grandes realizações.

Agendem para agosto o evento da SBRA em Curitiba que seu presidente já está em campo para fazer um memorável congresso;

Adelino Amaral Silva

Presidente eleito

Polimorfismo do receptor de FSH em mulheres inférteis com endometriose

FSH receptor polymorphism in infertile women with endometriosis

Gustavo Peretti Rodini¹, Fernanda dos Santos Pereira², Úrsula da Silveira Matte², Elisângela Arbo³, Carlos Augusto Bastos de Souza⁴, João Sabino L. Cunha-Filho⁵

1: Médico Ginecologista e Obstetra. Mestrando do Programa de Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2: Unidade de Pesquisa de Terapia Gênica. Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3: Doutoranda do Programa de Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Estágio doutoral na Universidade de Paris XI.

4: Médico Ginecologista e Obstetra do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

5: Professor de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Insemine Centro de Reprodução Humana, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

Instituição: Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – Rio Grande do Sul, Brasil.

Agência Financiadora: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Apresentação em congresso: XII Congresso Brasileiro de Reprodução Assistida –

Congresso Regional da Rede Latino Americana de Reprodução Assistida

RESUMO

Objetivo: A endometriose atinge 10-15% das mulheres. Portadoras dessa patologia têm 20 vezes mais chances de serem inférteis e 30-60% das pacientes com endometriose apresentam infertilidade associada. Nesse estudo, estudaremos a prevalência do polimorfismo do gene do receptor do hormônio foliculo estimulante (FSH) em pacientes com endometriose e infertilidade. Esse polimorfismo, que altera a transdução do sinal do receptor, seria o responsável por uma resposta ovariana inadequada ao FSH em pacientes inférteis.

Métodos: Resultados preliminares de um estudo caso-controle. Os casos são pacientes com infertilidade e endometriose. Os controles, pacientes sem endometriose e férteis. Determinaremos a prevalência alélica da substituição da aspargina (N) pela serina (S) no códon 680 do éxon 10 em ambos os alelos do gene que sintetiza o receptor do FSH.

Resultados: Foram analisadas 49 pacientes, sendo 31 casos e 18 controles. Os dois grupos não diferiram em sua avaliação demográfica. No grupo de pacientes com endometriose e infertilidade foram encontradas 5 pacientes homozigotas (S/S), 14 pacientes heterozigotas (N/S) e 12 pacientes genotipicamente normais (N/N). No grupo controle, houve uma com homozigose (S/S), 9 heterozigotas (N/S) e 8 pacientes com genótipo normal (N/N). Não obtivemos diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$).

Conclusão: O polimorfismo do receptor do FSH está relacionado com alteração da resposta ovariana, mas essa alteração não havia sido estudada em mulheres com endometriose. Nosso estudo, pela primeira vez na literatura

mundial, testa essa hipótese e refuta a associação da endometriose com essa alteração genética do receptor do FSH.

Palavras-Chave: endometriose, infertilidade, receptor do FSH.

ABSTRACT

Objective: Endometriosis affects between 10 and 15% of women of reproductive age. These patients have a 20 greater chance of being infertile and 30-60% of these patients are actually infertile. In this study, the prevalence of the follicle stimulating hormone (FSH) gene receptor polymorphism will be studied in infertile patients with endometriosis. This polymorphism, which modify the signal receptor transduction, could probably be responsible for the poor ovarian response towards FSH stimulation.

Material And Methods: Preliminary results of a case-control study. The study group is infertile women with endometriosis. The control group is fertile patients without endometriosis. We will study the genotypic prevalence of the substitution of an asparagine (N) for a serine (S) in the 680 codon of exon 10 in both alleles of the FSH receptor gene synthesizer.

Results: It was analyzed 49 patients, 31 in the study group and 18 in the control group. Both groups had non-statistical differences regarding demographic characteristics. Among infertile patients with endometriosis, we found 5 homozygotic (S/S), 14 heterozygotic (N/S) and 12 genotypically normal (N/N). In the control group, we found 1 homozygotic (S/S), 9 heterozygotic (N/S) and 8 patients with normal genotype (N/N). There was no

statistical difference between the groups ($P>0,05$).

CONCLUSION: The FSH receptor polymorphism is related to abnormal ovarian response, and it has not been studied in women with endometriosis. This article is a worldwide pioneer study on this subject and rejects the hypothetical association between endometriosis and this genetic abnormality of the FSH receptor.

Key Words: endometriosis, infertility, FSH receptor.

INTRODUÇÃO

A endometriose, tecido glandular e estroma endometriais fora da cavidade uterina, pode associar-se à infertilidade devido a alterações imunológicas, anatômicas, uterinas, endometriais, entre outras. (Olive and Schwartz 1993; Koninckx 1994; Nisolle and Donnez 1997)

Estima-se que 10% a 15% da população feminina apresentam endometriose. (Muse and Wilson 1982; Bancroft, Vaughan Williams et al. 1989; Olive and Schwartz 1993; Leyendecker, Kunz et al. 1998) A associação entre endometriose e infertilidade é bem estabelecida, sendo que mulheres com endometriose têm 20 vezes mais chances de serem inférteis. (Muse and Wilson 1982; Koninckx 1994; Baracat 1995) Trinta a sessenta por cento das pacientes com endometriose apresentam infertilidade associada. (Kistner 1975; Bancroft, Vaughan Williams et al. 1989; Olive and Schwartz 1993; Koninckx 1994) Em 1995, Cahill & Hull apontaram a endometriose como fator de infertilidade em 80% dos casos. (Cahill and Hull 2000) O prognóstico reprodutivo das pacientes inférteis com endometriose não é relacionado ao grau de endometriose, e sim a características da patologia. (Cahill and Hull 2000) Al-Azemi et al. concluíram que o grupo com endometriose exigiu mais ampolas de FSH por ciclo, com uma diferença ainda maior quando realizados ciclos subseqüentes. (Al-Azemi, Bernal et al. 2000) Uma meta-análise demonstrou que pacientes com endometriose têm uma diminuição de 50% na chance de ficarem grávidas após fertilização in vitro se comparadas ao grupo de mulheres sem esta doença. Os autores concluem que diminuição da fertilidade é decorrente de alterações oocitárias e de desenvolvimento embrionário. Se entendêssemos melhor estas alterações do ponto de vista fisiológico, poderíamos propor esquemas de indução da ovulação mais racionais e buscar otimizar os resultados nestas pacientes inférteis com endometriose. (Barnhart, Dunsmoor-Su et al. 2002) O gene do receptor do FSH está localizado no cromossomo 2p21-16, sendo pertencente à família dos receptores acoplados a uma proteína G. (Fan and Hendrickson 2005) Os polimorfismos no gene do receptor do FSH podem alterar a sua função através da alteração de propriedades bioquímicas do produto do gene ou alterando a atividade do *promoter*, a nível transcripcional. O polimorfismo promove alteração em um domínio intracelular do receptor não interferindo, desse modo, no acoplamento hormonal. (Gromoll and Simoni 2005)

Nosso grupo de pesquisa já demonstrou que pacientes com endometriose e infertilidade têm secreção e controle da prolactina alterada (Cunha-Filho 2001; Cunha-Filho, Gross et al. 2002), assim como anormalidades da fase

lútea (Cunha-Filho, Gross et al. 2003) evidenciada pela disfunção na secreção de esteróides ovarianos (estrogênio e progesterona) e concentração folicular de fatores de crescimento modulada de forma anômala. (Cunha-Filho, Lemos et al. 2003) Recentemente, foi demonstrado que mulheres com endometriose mínima e leve apresentam uma alteração da coorte folicular com uma diminuição da reserva ovariana medida pelos níveis séricos do hormônio anti-Mülleriano no 3º dia do ciclo menstrual. (Lemos, Arbo et al. 2008)

No banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI), estão descritos mais de 700 polimorfismos no gene do receptor do FSH, sendo que apenas 5 deles são nas regiões codificadoras do gene (éxon). Um polimorfismo bastante comum na população caucasiana ocorre no éxon 10 do gene do receptor do FSH, nos códons 307 e 680 do domínio intracelular do receptor, e correspondem à substituição do nucleotídeo treonina pela alanina e do nucleotídeo aspargina pela serina, respectivamente. Os polimorfismos destes dois códons são completamente ligados, sendo a mutação apenas do códon 680 avaliada. (Simoni, Gromoll et al. 1999; Sudo, Kudo et al. 2002; Daelemans, Smits et al. 2004) A literatura não possui dados sobre os polimorfismos do receptor do FSH em mulheres com endometriose. O estabelecimento da prevalência gênica do polimorfismo no códon 680 do gene que sintetiza o receptor do FSH é o objetivo deste estudo. Assim, com o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na infertilidade das mulheres com endometriose, poderão ser propostos tratamentos mais racionais e baratos, aperfeiçoando os resultados reprodutivos dessas pacientes.

MÉTODOS

Delineamento

Será realizado um estudo caso-controle para o estabelecimento da prevalência alélica e genotípica do polimorfismo N680S (substituição do nucleotídeo aspargina pela serina) no éxon 10 do gene do receptor do FSH na população de mulheres inférteis com endometriose em comparação com um grupo controle de mulheres férteis sem endometriose.

Pacientes

As pacientes do grupo em estudo compreendem mulheres com endometriose e infertilidade em que os exames da investigação do casal não evidenciem nenhum fator masculino (espermograma normal segundo critérios da Organização Mundial da Saúde de 1992) ou seqüela de doença inflamatória pélvica a videolaparoscopia. Nesse estudo utilizamos a definição de infertilidade da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva como sendo a ausência de concepção por período de pelo menos um ano com manutenção de relações sexuais regulares. Para o diagnóstico de endometriose, utilizamos a videolaparoscopia com visualização direta de lesões características. Os demais critérios de inclusão são: idade até 38 anos completos, ciclos menstruais regulares com duração de 25-35 dias, presença de ambos os ovários, ausência de distúrbio endocrinológico e/ou ovariano clínico, indi-

ce de massa corporal entre 18-30 kg/m² e disponibilidade em participar do estudo com assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido.

As pacientes do grupo controle são pacientes com fertilidade comprovada que internaram para realização de ligadura tubária. Após serem orientadas sobre o objetivo e os procedimentos do estudo, as pacientes, caso concordem em participar, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. Os demais critérios de inclusão são: idade até 38 anos completos, ciclos menstruais regulares com duração de 25-35 dias, presença de ambos os ovários, ausência de distúrbio endocrinológico e/ou ovariano clínico, índice de massa corporal entre 18-30 kg/m² e que engravidaram espontaneamente.

MÉTODOS

Para a detecção do polimorfismo N680S, será feita extração de DNA a partir de 10mL de sangue periférico coletado em EDTA utilizando a técnica de precipitação por sais. (Miller and Costa 1988) A seguir, serão amplificadas as regiões correspondentes ao polimorfismo N680S utilizando os primers e condições descritos por Sudo et al, 2002. (Sudo, Kudo et al. 2002) O produto de PCR será visualizado em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. A detecção dos polimorfismos será feita por digestão com as enzimas de restrição BseNI BsrI ER0881 1000u e Eco81I Saul ER0371 500u, respectivamente, segundo instruções do fabricante. Os fragmentos serão visualizados em gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídio.

ESTATÍSTICA

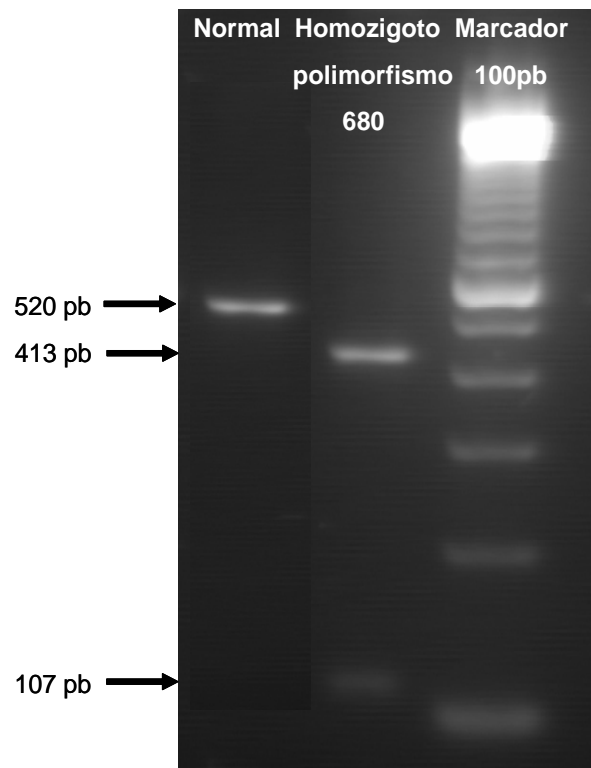
As variáveis categóricas serão comparadas utilizando-se os testes de Qui-quadrado ou exato de Fisher. Variáveis contínuas serão analisadas utilizando-se os testes teste t de Student se tiverem distribuição normal, para comparação de médias entre dois grupos independentes ou o teste U de Wilcoxon-Mann-Withney se não paramétricas. As diferenças entre os grupos serão consideradas significativas quando $P < 0,05$ em um teste unilateral. Foi calculado também o *odds ratio* (OR) com seu respectivo intervalo de confiança de 95%. Será utilizado o programa estatístico SPSS versão 12.0 para tabulação e análise dos dados.

RESULTADOS

Foram arroladas inicialmente 49 pacientes, sendo 31 pacientes no grupo de casos e 18 no grupo controle. Os dois grupos não diferiram em sua avaliação demográfica. Seguindo os critérios de inclusão, a diferença de idade nos dois grupos não foi estatisticamente significativa, assim como o índice de massa corporal, ciclos regulares e espermograma do marido. Todas as pacientes apresentavam ambos os ovários, não apresentavam distúrbios endocrinológicos clínicos e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido.

A substituição do nucleotídeo aspargina (N) pela serina (S) no éxon 10 no cromossomo 2p21-16 foi pesquisada nos dois grupos (Figura I). No grupo de pacientes com endometriose e infertilidade foram encontrados 5 pacientes com homozigose para a mutação (S/S), 14 pacien-

Figura I: Detecção do polimorfismo do gene do receptor do FSH em pacientes genotipicamente normais (N/N) e homozigotas para a mutação (S/S).



tes heterozigotas (N/S) e 12 pacientes genotipicamente normais (N/N). Nas pacientes férteis que realizaram ligadura tubária, houve 1 com homozigose para a mutação (S/S), 9 heterozigotas (N/S) e 8 pacientes com genótipo normal (N/N). (Fig1). Foram agrupados as pacientes com N/S e N/N nos casos e controles e comparadas com as homozigóticas para a mutação (S/S). Foram agrupadas as pacientes com N/S e N/N nos casos e nos controles e comparadas com as homozigóticas para a mutação (S/S) nesses mesmos grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os casos e os controles, sendo $P = 0,27$. (Tabela I) As pacientes inférteis com endometriose tiveram chance 3,27 (*odds ratio* com intervalo de confiança 95% de 0,35-30,47) vezes maior do que as pacientes férteis de apresentarem homozigose para mutação no gene que codifica o receptor do FSH, estatisticamente não significativo com $P = 0,52$.

Tabela 1

| | Casos Endometriose e Infertilidade n (%) | Controles Ligadura Tubária n (%) |
|--|---|--|
| Homozigoto Normal (N/N) ^(a) | 12 (38,7) | 8 (44,4) |
| Heterozigoto (N/S) ^(a) | 14 (45,16) | 9 (50) |
| Homozigoto Afetado (S/S) ^(b) | 5 (16,13) | 1 (5,6) |

a vs b: $p = 0,27$

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Diferentes estudos buscam estimar as frequências dos polimorfismos do gene do FSH, especialmente na população infértil. No entanto, as frequências gênicas são bastante variadas conforme o local e o estudo realizado. Conway et al. não encontraram diferenças na frequência gênica do polimorfismo na posição 680 do éxon 10 em mulheres com diferenças patológicas ovarianas, como síndrome dos ovários policísticos (PCOS), resistência ovariana ou falência ovariana precoce, sendo que a frequência do genótipo S/S ficou em torno de 40%. (Conway, Conway et al. 1999)

Greb et al. verificaram que mulheres com o polimorfismo S/S na posição 680 do éxon 10 apresentaram níveis mais elevados de FSH na transição lúteo-folicular e na fase folicular inicial que as com o genótipo N/N, embora o nível máximo de FSH fosse observado no mesmo dia em relação ao dia do pico do LH. A dinâmica hormonal durante a luteólise foi semelhante nos dois grupos, o que sugere que a duração maior do ciclo nas pacientes do grupo S/S é devido a uma fase folicular mais arrastada. Os níveis máximos de estradiol foram semelhantes entre os dois grupos, sugerindo que níveis mais elevados de FSH são necessários para adquirir os mesmos níveis de estradiol e atingir a ovulação nas pacientes com genótipo S/S. Estes autores não encontram explicação para os níveis mais elevados de FSH neste grupo, supondo que exista uma resistência aumentada dos folículos ovarianos destas pacientes ao FSH. Talvez essa explicação esteja relacionada com o polimorfismo genético encontrado. As pacientes do grupo S/S apresentaram um número de folículos antrais no início da fase folicular aproximadamente 20% maior. Estes autores encontraram níveis semelhantes de fator anti-mülleriano nos dois grupos, conotando uma reserva folicular semelhante entre eles. (Greb, Grieshaber et al. 2005)

A associação dos níveis basais de FSH com o genótipo não está bem estabelecida. Quando medido no terceiro dia do ciclo, alguns autores não encontraram diferenças entre os níveis de FSH entre as pacientes com genótipo S/S e N/N (Behre, Greb et al. 2005; Falconer, Andersson et al. 2005; Greb, Grieshaber et al. 2005) enquanto outros as encontraram. (Perez Mayorga, Gromoll et al. 2000; Sudo, Kudo et al. 2002)

Estudos retrospectivos em mulheres que se submetem a procedimentos de reprodução assistida demonstraram uma sensibilidade diferenciada à gonadotrofina exógena dependendo do genótipo apresentado. Mayorga et al. encontraram que as pacientes homozigóticas para o aminoácido serina (S/S) na posição 680 do gene do receptor necessitaram de dose maiores de FSH que as homozigóticas para aspargina (N/N) ou que as heterozigóticas (S/N). Embora todos os grupos apresentassem níveis basais de FSH dentro da faixa considerada normal, as pacientes do grupo S/S apresentaram níveis basais mais altos que os outros grupos, indicando uma sensibilidade diminuída deste grupo ao FSH. (Perez Mayorga, Gromoll et al. 2000) De Castro et al. mostraram uma frequência aumentada do alelo S/S entre as pacientes com má resposta à indução da ovulação, que também

apresentaram uma maior tendência de cancelamento do ciclo por ausência de resposta. (de Castro, Ruiz et al. 2003) Sudo et al. encontraram que as pacientes com genótipo S/S necessitaram de doses maiores de HMG (gonadotrofina de mulher menopausada) e o nível máximo de estradiol foi menor que nos outros grupos. (Sudo, Kudo et al. 2002) Daelemans et al. em pacientes submetidas a estimulação ovariana para fertilização *in vitro*, mostraram dados conflitantes em relação à associação de hiperestímulo ovariano iatrogênico. Estes autores encontraram uma frequência alélica maior do aminoácido serina na posição 680 nas pacientes que desenvolveram hiperestímulo em relação aos controles, porém ocorreu um aumento da frequência alélica S/S nas pacientes com sintomas mais severos. (Daelemans, Smits et al. 2004) Em estudo prospectivo, Behre et al. demonstraram que as pacientes com genótipo S/S quando estimuladas com as mesmas doses de FSH que as pacientes com genótipo N/N apresentavam pico de estradiol menor, mas que este desfecho se tornava igual se a dose de FSH era aumentada, embora o estudo não tivesse poder para detectar diferenças nos desfechos reprodutivos (número de óocitos, gestação, etc). (Behre, Greb et al. 2005) Fica evidente a associação da endometriose com infertilidade e uma relação desta doença com anormalidades ovulatórias. Esse estudo é pioneiro na avaliação genotípica dessa população. Sabendo que 14% da população feminina brasileira é infértil e necessitaríamos de aproximadamente 140 mil ciclos de fertilização *in vitro* para tratar esta população (dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) o custo para o sistema de saúde com o tratamento de mulheres com endometriose, que acomete 30% dos 140 mil ciclos é muito elevado. Contudo, se soubermos manejá-las de forma mais racional e menos onerosa com os mesmos resultados, o sistema de saúde teria um benefício direto muito significativo.

Endereço para Correspondência:

Gustavo Peretti Rodini: Rua Professor Fitzgerald, 177/901, CEP: 90470-160. Porto Alegre – RS. Telefone: 51-98359328. grodini@terra.com.br

Referências bibliográficas

- Al-Azemi, M., A. L. Bernal, et al. (2000). "Ovarian response to repeated controlled stimulation in in-vitro fertilization cycles in patients with ovarian endometriosis." *Hum Reprod* **15**(1): 72-5.
- Bancroft, K., C. A. Vaughan Williams, et al. (1989). "Minimal/mild endometriosis and infertility. A review." *Br J Obstet Gynaecol* **96**(4): 454-60.
- Barakat, E. C. L., G.R. (1995). *Ginecologia Endócrina*, Atheneu.
- Barnhart, K., R. Dunsmoor-Su, et al. (2002). "Effect of endometriosis on in vitro fertilization." *Fertil Steril* **77**(6): 1148-55.
- Behre, H. M., R. R. Greb, et al. (2005). "Significance of a common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene for the ovarian response to FSH: a pharmacogenetic approach to controlled ovarian hyperstimulation." *Pharmacogenet Genomics* **15**(7): 451-6.
- Cahill, D. J. and M. G. Hull (2000). "Pituitary-ovarian dysfunction and endometriosis." *Hum Reprod Update* **6**(1): 56-66.
- Conway, G. S., E. Conway, et al. (1999). "Mutation screening and isoform prevalence of the follicle stimulating hormone receptor gene in women with premature ovarian failure, resistant ovary syndrome and polycystic ovary syndrome." *Clin Endocrinol (Oxf)* **51**(1): 97-9.

- Cunha-Filho, J. S., J. L. Gross, et al. (2003). "Physiopathological aspects of corpus luteum defect in infertile patients with mild/minimal endometriosis." *J Assist Reprod Genet* **20**(3): 117-21.
- Cunha-Filho, J. S., J. L. Gross, et al. (2002). "Prolactin and growth hormone secretion after thyrotrophin-releasing hormone infusion and dopaminergic (DA2) blockade in infertile patients with minimal/mild endometriosis." *Hum Reprod* **17**(4): 960-5.
- Cunha-Filho, J. S., N. A. Lemos, et al. (2003). "Insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF binding protein-1 and -3 in the follicular fluid of infertile patients with endometriosis." *Hum Reprod* **18**(2): 423-8.
- Cunha-Filho, J. S. L. G., J.L.; Lemos, N.A.; Brandelli, A.; Castillos, M.; Passos, E.P. (2001). "Hyperprolactinemia And Luteal Insufficiency In Infertile Patients With Mild And Minimal Endometriosis." *Horm. Metab. Res.* **33**: 216-220.
- Daelemans, C., G. Smits, et al. (2004). "Prediction of severity of symptoms in iatrogenic ovarian hyperstimulation syndrome by follicle-stimulating hormone receptor Ser680Asn polymorphism." *J Clin Endocrinol Metab* **89**(12): 6310-5.
- de Castro, F., R. Ruiz, et al. (2003). "Role of follicle-stimulating hormone receptor Ser680Asn polymorphism in the efficacy of follicle-stimulating hormone." *Fertil Steril* **80**(3): 571-6.
- Falconer, H., E. Andersson, et al. (2005). "Follicle-stimulating hormone receptor polymorphisms in a population of infertile women." *Acta Obstet Gynecol Scand* **84**(8): 806-11.
- Fan, Q. R. and W. A. Hendrickson (2005). "Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor." *Nature* **433**(7023): 269-77.
- Greb, R. R., K. Grieshaber, et al. (2005). "A common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the human follicle stimulating hormone receptor is a major determinant of length and hormonal dynamics of the menstrual cycle." *J Clin Endocrinol Metab* **90**(8): 4866-72.
- Gromoll, J. and M. Simoni (2005). "Genetic complexity of FSH receptor function." *Trends Endocrinol Metab* **16**(8): 368-73.
- Kistner, R. W. (1975). "Management of endometriosis in the infertile patient." *Fertil Steril* **26**(12): 1151-66.
- Koninckx, P. R. (1994). "Is mild endometriosis a condition occurring intermittently in all women?" *Hum Reprod* **9**(12): 2202-5.
- Lemos, N. A., E. Arbo, et al. (2008). "Decreased anti-Mullerian hormone and altered ovarian follicular cohort in infertile patients with mild/minimal endometriosis." *Fertil Steril* **89**(5): 1064-8.
- Leyendecker, G., G. Kunz, et al. (1998). "Endometriosis: a dysfunction and disease of the archimetra." *Hum Reprod Update* **4**(5): 752-62.
- Miller, C. A., 3rd and M. Costa (1988). "Characterization of DNA-protein complexes induced in intact cells by the carcinogen chromate." *Mol Carcinog* **1**(2): 125-33.
- Muse, K. N. and E. A. Wilson (1982). "How does mild endometriosis cause infertility?" *Fertil Steril* **38**(2): 145-52.
- Nisolle, M. and J. Donnez (1997). "Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities." *Fertil Steril* **68**(4): 585-96.
- Olive, D. L. and L. B. Schwartz (1993). "Endometriosis." *N Engl J Med* **328**(24): 1759-69.
- Perez Mayorga, M., J. Gromoll, et al. (2000). "Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype." *J Clin Endocrinol Metab* **85**(9): 3365-9.
- Simoni, M., J. Gromoll, et al. (1999). "Mutational analysis of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in normal and infertile men: identification and characterization of two discrete FSH receptor isoforms." *J Clin Endocrinol Metab* **84**(2): 751-5.
- Sudo, S., M. Kudo, et al. (2002). "Genetic and functional analyses of polymorphisms in the human FSH receptor gene." *Mol Hum Reprod* **8**(10): 893-9.

2009 Congresso Brasileiro De Reprodução Assistida

Agosto de 2009 Curitiba, PR

Vitri-Ingá: Um Novo Protocolo De Vitrificação

Vitri-Inga: A New Vitrification Protocol

Fernanda Carolina Fachini^a
Carlos Gilberto Almodin MD.Ph.D.^{a, b}
Vania Cibele Minguetti-Câmara M.Sc.^a
Antonio Fernandes Moron MD.Ph.D.^b
Raul Nakano^c
Litsuko Shimabukuru^c

Afiliação dos autores: ^a Materbaby – Reprodução Humana e Genética, Maringá, Paraná.

^b Departamento de Obstetrícia, Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, São Paulo.

^c Fertilclin – São Paulo, São Paulo.

Local do Trabalho: Fertilclin e Materbaby – Reprodução Humana e Genética

Trabalho apresentado de forma oral no XII Congresso Brasileiro de Reprodução Assistida- Congresso Regional da Rede Latino Americana de Reprodução Assistida.

RESUMO

Objetivo: Propor a avaliação de um novo método de vitrificação através das taxas de sobrevivência, fertilização e gravidez após vitrificação-aquecimento de oócitos.

Material e métodos: Das 54 pacientes incluídas neste estudo, 258 oócitos foram vitrificados-aquecidos pelo método de vitrificação Vitri- Ingá. No protocolo de vitrificação foram utilizadas duas soluções de vitrificação em concentrações diferentes e no protocolo de aquecimento foram utilizadas três soluções. Três horas após o aquecimento, foi realizado a injeção intra-citoplasmática de espermatozoides (ICSI). Após 72 horas a qualidade embrionária foi avaliada, e os embriões selecionados foram transferidos.

Resultados: Após aquecimento, 215 oócitos sobreviveram (83,3%). O ICSI foi realizado em 214 destes oócitos. Após 72 horas, o número de embriões clivados foi de 164 (76,6%), sendo que 99 embriões eram graus I e II (63,5%). A taxa de gravidez on-going foi de 24,5% , resultando em 13 pacientes grávidas.

Conclusões: O método de vitrificação proposto e estudado parece ser uma boa opção devido às altas taxas de sobrevivência e fertilização após ICSI. Além disso, este método é uma alternativa eficiente, rápida e econômica.

Key words: oócitos, vitrificação, sobrevivência.

ABSTRACT

Objective: The objective of this study was to propose the assessment of a new vitrification protocol through survival, fertilization and pregnancy rates after vitrification / thawing of oocytes.

Material and methods: Among 54 patients included in this study, 258 oocytes were vitrified, using Vitri-Ingá protocol. The vitrification protocol was performed using two different vitrification solution concentrations and the thawing protocol was performed in three steps. Three hours after thawing the oocytes was submitted to ICSI and 72 hours later the embryos was transferred.

Results: After thawing, 215 oocytes (83.3%) survived. ICSI was performed in 214 oocytes. After 72 hours, we have 164 (76.6%) embryos, 99 (63.5%) were top embryos. The pregnancy rate was 24.5%, resulting in 13 patients pregnant .

Conclusion: The vitrification protocol used same to be a good option due to the high survival and fertilization rates after ICSI. Despite that, this protocol is an efficient alternative, fast and economical.

Key words: oocytes, vitrification, survival.

INTRODUÇÃO

Com o surgimento da Reprodução Assistida em 1979, nasceu também a necessidade de criopreservar gametas e embriões. A criopreservação de espermatozoides teve sucesso rapidamente, devido ao pequeno tamanho da célula, entretanto, o mesmo não ocorreu com oócitos e embriões. Na década de 80, haviam pesquisadores desenvolvendo metodologias de criopreservação com a utilização de substâncias crioprotetoras. O uso de tais substâncias permitiu que protocolos de congelamento lento fossem utilizados com sucesso na última década em embriões humanos e têm sido utilizados até agora. Porém, o mesmo protocolo não tem trazido resultados

positivos quando aplicado aos oócitos.

Alguns autores começaram a analisar os danos causados nos oócitos por este processo. Chen e colaboradores (2003) relataram que as diferenças entre os embriões e oócitos estavam na permeabilidade da membrana plasmática, na presença de grânulos corticais e no fuso na metáfase II nos oócitos. Ruffing e colaboradores (1993) relataram que o baixo coeficiente de permeabilidade da membrana plasmática dificulta a entrada das substâncias crioprotetoras ao mesmo tempo em que altas taxas de lipídeos intra-citoplasmáticos incrementam os cristais de gelo tornando os oócitos mais sensíveis ao congelamento que os embriões. Após a fecundação o aumento do cálcio livre no citoplasma aumenta a permeabilidade da membrana plasmática melhorando o trânsito do crioprotetor e diminuindo a formação de cristais de gelo nos embriões (Gook et al., 1993; Fabri et al., 2000). Na metáfase II os fusos estão em forma de barril, e os microtúbulos de dímeros de tubulina alfa e beta são facilmente afetados pelos cristais de gelo diminuindo sensivelmente a viabilidade dos oócitos (Zhou et al. (2002). Alguns pesquisadores preconizaram a criopreservação dos oócitos com vesícula germinal acreditando que os resultados fossem melhores, porém foram similares (Agca & Peter, 1997).

No final da década de 90 vários autores concordaram que as necessidades dos oócitos se resumiam em um protocolo que fosse com grande velocidade de resfriamento e aquecimento em reduzido tempo de exposição e pequeno volume de crioprotetor. (Bos-Mikich et al., 1995; Fuku & Downey, 1995; Saha et al., 1994; Vajta et al, 1996).

A partir do modelo desenvolvido por Vajta com open pulled straw (OPS) relatando sucesso com embriões bovinos no processo de vitrificação, vários pesquisadores desenvolveram novos métodos que tem sido aplicado com sucesso (Vajta et al., 1998). O processo de vitrificação que compreende a exposição em altas taxas de concentrações de crioprotetores por muito pouco tempo tem sido relatado com sucesso por vários autores tanto em animais como em humanos (Fuku et al., 1995; Vajta & Nagy, 2006). A partir destas pesquisas desenvolvemos um método prático de baixo custo e com altas taxas de recuperação de oócitos e embriões.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo envolveu pacientes com idade entre 23 a 45 anos, que se submeteram ao tratamento pela fertilização *in-vitro*, e tiveram mais que seis oócitos após punção folicular. A inclusão das pacientes no estudo ocorreu após avaliação propedêutica de rotina e com consentimento informado prévio.

As pacientes foram submetidas à hiperestimulação ovariana pelo protocolo longo. Na fase lútea média foi iniciado o uso de acetato de leuprolide (Lupron Abbott – Brasil) com aplicações subcutâneas de 0.15 ml. No segundo dia da menstruação foi reduzida a dose de acetato de leuprolide para 0.05 ml/d e iniciado estímulo com FSH recombinante (Gonal – Serono – Brasil). O crescimento folicular foi monitorado somente por ultra-som endovaginal. Gona-dotrofina coriônica humana (HCG 10.000 IU, Choriomom - Meisler - Brasil) foi administrada quando 3 folículos

com 20 mm de diâmetro eram observados.

A punção folicular foi realizada 36 horas após a administração do HCG usando ultra-som transvaginal. Depois da captação os oócitos foram cultivados em meio GV (Ingamed, Maringá-Brasil) suplementado com 10% de soro sintético substituto (SSS; Irvine Scientific, Santa Ana-CA-USA) em 5% de CO₂ e 37°C. Uma a duas horas após a punção folicular, os oócitos foram colocados em hialuronidase (Irvine Scientific, Santa Ana-Califórnia) para retirada das células do *cumulus*. Seis oócitos maduros (metáfase II) eram separados para a fertilização *in-vitro* ou ICSI e o restante dos oócitos era vitrificado. Foram vitrificados somente oócitos em metáfase II.

Duas horas após a coleta era avaliada a maturidade oocitária e começava-se o procedimento de vitrificação. Inicialmente os oócitos eram transferidos para a solução de equilíbrio VI-1 (Ingamed, Maringá-Brasil) que contém 7,5% de etilenoglicol e 7,5% de dimetilsulfóxido. Os oócitos eram equilibrados nessa solução por 5-15 minutos. Após este tempo, cada oócito era colocado em três gotas de 20µl de solução de vitrificação permanecendo por 15 segundos em cada gota. O tempo que o oócito permanecia na solução VII até a imersão da haste no nitrogênio não excedia 60 segundos. A solução de vitrificação VI-2 (Ingamed, Maringá-Brasil) era constituída de 15% de etilenoglicol e 15% de dimetilsulfóxido e sacarose 0,5M. Os oócitos foram então colocados na haste de vitrificação Vitri-Ingá (Ingamed, Maringá-Brasil), aparato que consiste em uma haste de polipropileno com uma extremidade muito fina (0.7 mm de espessura) conectada a outra extremidade mais grossa (Figura 1). Os oócitos foram depositados na haste, com o mínimo volume de solução de vitrificação, e então imediatamente imersos em nitrogênio líquido. Quando uma quantidade maior que 1 µl de solução era depositada com os oócitos sobre a haste, o excesso de líquido era aspirado.

Para estocagem segura a haste foi coberta com um protetor plástico. Os protetores plásticos eram primeiramente resfriados no equipamento Vitri-Equip (Ingamed, Maringá-Brasil). Posteriormente eram colocados verticalmente nesse mesmo equipamento, totalmente mergulhados no nitrogênio líquido para receber as hastes contendo os oócitos.

Para o aquecimento dos oócitos, imediatamente após a retirada do tubo plástico protetor da haste Vitri-Ingá, a parte mais fina desta era totalmente imersa na solução de aquecimento contendo sacarose 1M (DV-I, Ingamed, Maringá-Brasil) a 37°C por 1 minuto. Os oócitos coletados foram transferidos para solução diluente de sacarose 0,5M (DV-II, Ingamed, Maringá-Brasil) por 3 minutos à temperatura ambiente, e então lavados em solução tampão (DV-III, Ingamed, Maringá-Brasil) por 2 vezes, 5 minutos cada.

Após o aquecimento dos oócitos, a avaliação da sobrevivência foi realizada através do critério morfológico. A sobrevivência dos oócitos foi definida pela re-expansão do mesmo, tendo mantido membrana celular intacta, ooplasma normal e zona pelúcida, bem como o espaço perivitelinico de tamanho normal.

Nos oócitos que sobreviveram, 3 horas após o aquecimento era realizada o ICSI. A fertilização foi avaliada

aproximadamente 17-19 horas após ICSI, e os pré-embriões mantidos em meio de cultura GV (ingamed, Maringá-Brasil) suplementado com 10% de SSS, sob mistura gasosa (5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂). O desenvolvimento embrionário foi avaliado no dia 3, quando a transferência foi realizada guiada pelo ultra-som. A gravidez foi observada pela presença de gestação viável e batimento cardíaco presentes após a 13ª semana pós-transferência.

RESULTADOS

No presente estudo, 54 pacientes tiveram oócitos vitrificados, excedentes do ciclo de fertilização *in-vitro*, ao qual foram submetidas. Todas as pacientes tiveram transferência de embriões no ciclo de fertilização *in-vitro* com oócitos frescos, mas não engravidaram. Os oócitos excedentes vitrificados somaram um total de 258 oócitos que posteriormente foram aquecidos para nova tentativa de fertilização *in-vitro* e transferência embrionária.

Dos oócitos aquecidos, 215 sobreviveram (83%) e destes 214 foram submetidos ao ICSI. Um oócito não teve qualidade suficiente para ser injetado. Dos oócitos injetados, 164 fertilizaram (76,6%) e desenvolveram embriões. Destes, 99 eram graus I e II (63,5%) segundo a classificação da Rede Latino Americana de Reprodução Assistida. Treze pacientes tornaram-se grávidas após a transferência embrionária (24,5%) e não houve nenhum caso de aborto (tabela I).

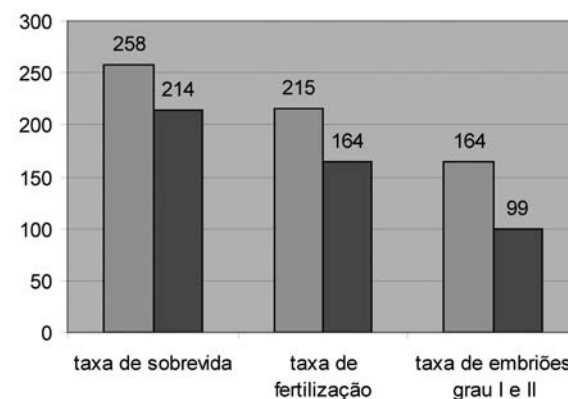
Tabela I. Resultados após vitrificação e aquecimento de oócitos em metáfase II

| | Quantidade | Taxa (%) |
|-------------------------|------------|----------|
| Ciclos | 54 | |
| Idade (média ± DP) | 37,4 ± 7,3 | |
| Oócitos vitrificados | 258 | |
| Oócitos desvitrificados | 258 | 100 |
| Oócitos sobreviveram | 215 | 83 |
| Não sobreviveram | 43 | 18,8 |
| Oócitos ICSI | 214 | 80,5 |
| Oócitos fertilizados | 164 | 76,6 |
| Não fertilizados | 50 | 27,1 |
| Embriões graus I e II | 99 | 63,5 |
| Gestação on-going | 13 | 24,5 |

DISCUSSÃO

Pesquisas com vitrificação de embriões e principalmente oócitos animais têm levado à formulação de novas idéias e a resultados bastante promissores em relação a taxas de gravidez. Muitos problemas biológicos e principalmente técnicos quanto à vitrificação têm sido eliminados e estão sendo resolvidos. Os protocolos de vitrificação são potencialmente nocivos devido à elevada concentração de crioprotetores. Melhorias nos protocolos de vitrificação têm introduzido misturas de dois ou mais crioprotetores tentando diminuir os efeitos tóxicos, além de reduzir o tempo e temperatura de exposição a esses crioprotetores.

Gráfico I. Avaliação dos resultados da técnica de vitrificação



Tem sido sugerido que a sobrevida de oócitos vitrificados não depende somente da concentração dos crioprotetores em solução, mas também da velocidade na qual eles são criopreservados e aquecidos. Este cuidado tem como objetivo evitar a formação de cristais de gelo. Para aumentar a velocidade do resfriamento tem-se tentado diminuir o volume de solução de congelamento a qual os oócitos ou embriões seriam vitrificados utilizando-se vários tipos de aparatos.

O ponto principal na obtenção de bons resultados com a vitrificação é o aparato usado, que forneça a possibilidade de vitrificar o embrião em um volume de líquido muito pequeno e permita que o procedimento seja realizado com bastante rapidez. As primeiras tentativas de vitrificação utilizando palhetas de 0,25 ml, as mesmas utilizadas em congelamento lento de embriões, não obtiveram sucesso. A primeira gravidez obtida por Kuleshova *et al.* (1999) pela vitrificação utilizou uma palheta plástica puxada até ficar bem fina (OPS), técnica utilizada anteriormente por Vajta *et al.* (1998) em embriões bovinos. Atualmente, os princípios do OPS são usados em muitas versões, super-finos OPS (Isachenko *et al.*, 2000), micropipetas de vidro (Kong *et al.*, 2000), pipetas de desnudação flexíveis (Liebermann *et al.*, 2002), micropipetas plásticas de diâmetro fino (Cremades *et al.*, 2004, Hredzak *et al.*, 2005). As versões mais recentes do OPS não conseguem reproduzir bons resultados devido à dificuldade de manipulação deste principalmente durante o aquecimento. Os primeiros aparatos utilizados com sucesso na vitrificação foram sistemas fechados a exemplo do que era feito no congelamento lento, sem contato direto com o líquido nitrogênio.

Uma abordagem mais recente quanto ao uso de volume mínimo é o "cryotop", onde se utiliza uma pequena haste de prolipropileno composta de um filme fino soldado a um cabo plástico com capa protetora (Kuwayama and Kato, 2000; Kuwayama *et al.*, 2005 a; b). Neste método os oócitos devem ser mantidos sobre o filme, a solução excedente deve ser removida por aspiração, e a amostra imersa diretamente no nitrogênio líquido. O método é fácil de ser realizado e as taxas de sobrevida são maiores que aquelas encontradas com OPS. Kuwayama *et al.* (2005) relataram 41 % de gravidez, 12 pacientes grávidas após a transferência de 29 embriões originados

de oócitos vitrificados-aquecidos, com taxas de sobrevivência em torno de 90%. Os resultados parecem demonstrar que a técnica é mais eficiente que outros métodos apresentados até o momento.

A utilização do Cryotop levanta o problema quanto à possível contaminação com o líquido nitrogênio, que é provavelmente o mais forte argumento quanto ao seu uso especialmente em humanos. O risco de o nitrogênio transmitir doenças existe, entretanto, não há casos documentados de transmissão de doenças relacionada a transferência de embriões (frescos ou congelados). Os poucos casos publicados aconteceram com amostras de sangue congeladas, que tem volumes 103 a 104 vezes maiores que amostras congeladas para embriologia. Para minimizar o risco de contaminação tem-se utilizado nitrogênio "virgem" nos procedimentos de vitrificação, entretanto, uma outra opção, na tentativa de eliminar o risco de transmissão de doenças seria o uso de nitrogênio filtrado com filtro de 0,22 µm.

Acreditando que a técnica com o "Cryotop" leve a melhores resultados, mas com dificuldade da obtenção de aparatos comerciais desse tipo, foi criado o Vitri-Ingá, o qual foi utilizado nos procedimentos de vitrificação relatados nesse estudo. Na realidade este aparato utiliza um pouco do princípio de uma outra abordagem, "o Cryoloop", que consiste em uma pequena alça de nylon preso a um suporte e equipado com um protetor. O filme de solução que se forma em torno do orifício da alça é forte o suficiente para manter o oócito ou embrião e com esse volume mínimo de solução as taxas de resfriamento podem ser extremamente maiores (Isachenko *et al.*, 2003). No Vitri-Ingá há um pequeno orifício onde o oócito ou embrião fica suspenso com um volume muito pequeno de líquido. O aparato usado é importante principalmente durante o aquecimento.

O método de vitrificação proposto e estudado parece ser uma boa opção devido às altas taxas de sobrevivência e fertilização após ICSI (Gráfico I). Os resultados obtidos neste estudo demonstram o potencial da vitrificação no sucesso da criopreservação de oócitos. O sucesso dessa técnica além de resolver os problemas legais e éticos associados às técnicas de congelamento de embriões, oferece uma oportunidade para estender a capacidade reprodutiva.

Correspondência:

Carlos Gilberto Almodin
Av. XV de Novembro, 1232 - Maringá - PR
CEP: 87.013-230
Fone: (44) 3224-3992 Fax: 55 (44) 225-1162
E-mail: almodin@materbaby.com.br

Referências Bibliográficas

Agca Y, Liu J, Peter AT. Cryoprotectant and water permeability of immature and in vitro matured bovine oocytes. *Theriogenology*. 1997;40:340.

Bos-Mikich A, Wood MJ, Candy CJ, Whittingham DG. Cytogenetical analysis and developmental potential of vitrified mouse oocytes. *Biol Reprod*. 1995;53(4):780-5.

Chen SU, Lien YR, Chao KH, Ho HN, Yang YS, Lee TY. Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing—a review article. *Mol Cell Endocrinol*. 2003;202(1-2):101-7.

Cremades N, Sousa M, Silva J, Viana P, Sousa S, Oliveira C, Teixeira da Silva J, Barros A. Experimental vitrification of human compacted morulae and early blastocysts using fine diameter plastic micropipettes. *Hum Reprod*. 2004;19(2):300-5.

Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Primavera MR, Rocchetta G, Ciotti PM, Magrini O, Seracchioli R, Venturoli S, Flamigni C. Technical aspects of oocyte cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol*. 2000;169(1-2):39-42.

Fuku EJ, Liu J, Downey BR. In vitro viability and ultrastructural changes in bovine oocytes treated with a vitrification solution. *Mol Reprod Dev*. 1995;40(2):177-85.

Gook DA, Osborn SM, Johnston WIH. Cryopreservation of mouse and human oocytes using, 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle. *Hum Reprod*. 1993; 8:1101-1109.

Hredzák R, Ostró A, Zdilová V, Toporcerová S, Kacmárik J. Clinical experience with a modified method of human embryo vitrification. *Ceska Gynekol*. 2005;70(2):99-103.

Isachenko E, Isachenko V, Katkov I.I., Montag M, Dessole S, Nawroth F, Van Der Ven H. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past difficulties to present success. *Reprod BioMed Online*. 2003;6:191-200.

Isachenko VV, Alabart JL, Isachenko EF, Bezugly ND, Michelmann HW. Ultra-rapid freezing and storage of rat embryos in an electric refrigerator at -130 degree C without liquid cryo-agents, with ultra-short exposure in the freezing medium and direct rehydration after thawing. *Cryo Letters*. 2000;21(1):13-18.

Kong IK, Lee SI, Cho SG, Cho SK, Park CS. Comparison of open pulled straw (OPS) vs glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. *Theriogenology*. 2000; 53(9):1817-26.

Kuleshova, LL, Gianaroli L, Magli C, Trouson A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes. *Hum. Reprod*. 1999;14:3077-3079.

Kuwayama M, Kato O. All-round vitrification method for human oocytes and embryos. *J. Assist. Reprod. Genet*. 2000; 17:477.

Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2005;11(3):300-8.

Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. Vitrification of human embryos using the CryoTip™ method. *Reprod. BioMedic. Online*. 2005;11:608-614.

Liebermann J, Tucker MJ, Graham JR, Han T, Davis A, Levy MJ. Blastocyst development after vitrification of multipronuclear zygotes using the Flexipet denuding pipette. *Reprod Biomed Online*. 2002;4(2):146-50.

Ruffing NA, Steponkus PL, Pitt RE, Parks JE. Osmometric behavior, hydraulic conductivity, and incidence of intracellular ice formation in bovine oocytes at different developmental stages. *Cryobiology*. 1993;30(6):562-80.

Saha S, Takagi M, Boediono A, Suzuki T. Direct rehydration of in vitro fertilised bovine embryos after vitrification. *Vet Rec*. 1994;134(11):276-7.

Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. Overall efficiency of in vitro embryo production and vitrification in cattle. *Theriogenology*. 1996;45(3):683-9.

Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev*. 1998;51(1):53-8.

Vajta G, Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online*. 2006;12(6):779-96.

Zhou Z, Yang ZM, Xie HQ. Preliminary study of cryopreservation of tissue engineered tendon. *Zhongguo Xue.Fu Chong.Jian Wai Ke.Zhi*. 2002;16 (5): 295-9.

O Perfil Reprodutivo Masculino em Relação ao Uso de Drogas Ilícitas, ao Tabagismo, à Obesidade e à Idade Avançada

The Male Reproductive Profile in Relation to Illicit Drugs Use, Smoking Habit, Obesity and Declining Age

Ayres, L. S.¹; Telöken, C.²; Moraes, J. F. D.³; Badalotti M⁴, Petracco A⁵, Azambuja R⁶

1. Acadêmica do curso de biomedicina da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre-RS, Brasil.
2. Médico, Livre-docente pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre-RS, PhD pela Cleveland Clinic Ed. Foundation, CCEF, Estados Unidos.
3. Matemático e Estatístico, Doutor em gerontologia biomédica pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUC/RS, Brasil.
4. Médica Ginecologista, Mestre em Medicina e Ciências da Saúde pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Doutora em Patologia pela Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre.
5. Médico Ginecologista, Doutor em Patologia pela Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre.
6. Embriologista, Mestre em Fisiologia da Reprodução pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, PhD em Fisiologia da Reprodução pela Texas A&M University, Tx, EUA.

RESUMO

Este trabalho apresenta como objetivo estudar o tabagismo, o uso de drogas ilícitas, a obesidade e a idade avançada na população de homens com queixa de infertilidade em Porto Alegre e a influência desses fatores de risco nos parâmetros do espermograma. Esta é uma coorte retrospectiva onde os dados foram obtidos entre os anos de 2004 e 2007. Os parâmetros analisados foram: volume ejaculatório, vitalidade, concentração de espermatozoides, percentual de motilidade A e B e morfologia espermática. Os homens que já haviam tido filhos tiveram um menor percentual de motilidade in-loco do que os que não tinham filhos ($p=0,01$). Também foi observada uma diminuição no volume ejaculatório e na motilidade direcional com a idade ($p<0,05$). Houve uma menor média de volume e maior média de motilidade "in-loco" nos fumantes e nos usuários de cocaína, menor percentual de motilidade direcional nos fumantes e maior percentual de espermatozoides mortos em usuários de cocaína. Além disso, foi encontrada uma maior porcentagem de espermatozoides com anormalidades de peça intermediária nos usuários de maconha. Porém, os dados com relação ao fumo e ao uso de drogas não foram estatisticamente significativos. Observou-se que os homens que já tiveram filhos e os mais jovens (até 40 anos) podem ter mais chances de obter a prole devido a melhores parâmetros do espermograma. No entanto, ainda é necessário estudar as interferências do tabagismo e do uso de drogas nos parâmetros seminais.

Palavras-chaves: Infertilidade masculina. Tabagismo. Maconha. Cocaína. Obesidade. Idade Avançada.

ABSTRACT

This article has the objective of studying the smoking habit, the use of illicit drugs, obesity and declining age in the male population of Porto Alegre with infertility claim

and the influence of these risk factors in the spermogram parameters. The study design is retrospective cohort, where data was obtained between the years of 2004 and 2007. The parameters analyzed were: ejaculatory volume, vitality, sperm concentration, percentile of motility A and B and sperm morphology. Men who had already had children had a lower percentile of 'in-loco' motility than those who didn't have children ($p=0.01$). It was also observed a decreased ejaculatory volume and forward motility in older men ($p<0.05$). There was a lower volume and higher 'in-loco' motility in smokers and cocaine users, shorter percentile of forward motility in smokers and greater percentile of dead sperm in cocaine users. Furthermore, there was a greater percentage of intermediate piece abnormalities in marijuana users. However, the data concerning smoking and drug habit were not statistically significant. It was observed that men who had already had children and the younger ones (under 40 years old) may have greater chances of having children, due to better semen parameters. On the other hand, there is a necessity of studying more the interference of smoking and drug use in semen parameters.

Key-words: Male infertility. Cigarette smoking. Marijuana. Cocaine. Obesity. Paternal age.

INTRODUÇÃO

A infertilidade é vista muitas vezes como uma doença predominantemente feminina, porém a infertilidade de causa masculina é igualmente prevalente, sendo que metade dos casais inférteis têm o homem como fator responsável pela infertilidade do casal (Raymond, 1993). Neste estudo, foram avaliadas variáveis que contribuem com a infertilidade masculina em nosso meio. As variáveis estudadas foram: tabagismo, uso de drogas ilícitas, obesidade e idade avançada.

Vários investigadores estudaram os efeitos nocivos do cigarro na concentração espermática, motilidade e percentagem de espermatozóides morfológicamente normais (Sofikitis et al., 1995; Vogt et al., 1986; Zavos et al., 1998). Já o efeito do fumo na espermatogênese é controverso, apesar de seus efeitos adversos terem sido comprovados em animais (Zavos et al., 1998). Em um estudo prospectivo, os fumantes tiveram um número significativamente menor de espermatozóides com motilidade grau B do que os homens inférteis não fumantes (Taszarek et al., 2005). Em outra pesquisa, o cigarro foi negativamente relacionado com a contagem de espermatozóides com motilidade progressiva, mas não com a concentração espermática, número total de espermatozóides móveis e morfologia (Hassa et al., 2006).

Quanto ao uso de drogas ilícitas, no presente estudo foi avaliado o consumo de maconha e de cocaína. Os canabinóides são os principais constituintes da planta da maconha (*Cannabis sativa*) (Rossato et al., 2005). Recentemente, um estudo demonstrou, por meio de RT-PCR e Western blot, que os espermatozóides humanos expressam o receptor canabinóide CB₁, localizado na cabeça e peça intermediária do espermatozoide. A ativação desse receptor reduz a motilidade espermática e inibe a reação acrossômica. Os efeitos da maconha na motilidade espermática foram dependentes da redução da atividade mitocondrial, determinada por fluorescência (Rossato et al., 2005). Além disso, testes em animais demonstraram que a maconha causou uma diminuição na produção de testosterona e redução na produção de espermatozóides, motilidade e viabilidade dos mesmos (Frazzetto, 2003).

A interação da cocaína com os espermatozóides ainda não está bem estabelecida. Em uma pesquisa que avaliou essa interação, foram encontrados aproximadamente $3,6 \times 10^3$ sítios de ligação à cocaína por célula (Yazigi et al., 1991). Segundo Hurd et al. (1992) o abuso da cocaína foi associado à diminuição da motilidade espermática. Um estudo da Universidade de Yale demonstrou que a duração do uso de cocaína por cinco anos ou mais estava diretamente relacionada à baixa motilidade dos espermatozóides e a baixas concentrações com grande proporção de formas anormais (Bracken et al., 1990). Uma pesquisa, que também avaliou os efeitos *in vitro* da exposição dos espermatozóides à cocaína, demonstrou que após uma curta exposição (15 minutos) ao hidrocloreto de cocaína, a motilidade e os parâmetros de velocidade linear e linearidade foram decrescidos nos grupos com concentrações mais altas. (Yelian et al., 1994).

No que tange à obesidade, Kort et al. (2006) demonstraram que há correlação entre o IMC e o decréscimo no número de espermatozóides móveis e com forma normal. Além disso, há uma diminuição na concentração espermática relacionada à obesidade e seu consequente aumento no estrógeno, influenciando o eixo hipotálamo-hipófise (Fejes et al., 2006).

Outro fator importante a ser levado em conta é que, segundo Kuhnert & Eberhard (2004), já foi demons-

trada uma diminuição no volume seminal e na motilidade espermática relacionada com a idade. O fluido seminal é derivado das vesículas seminais e uma das suas secreções, a frutose, também declina com a idade (Kühnert & Eberhard, 2004). A frutose é essencial para o metabolismo dos espermatozóides e para a motilidade, servindo como fonte energética (Lewis-Jones et al., 1996).

Devido à raridade de estudos na nossa população, esta pesquisa tem a finalidade de estudar o tabagismo, o uso de drogas ilícitas, a obesidade e a idade avançada na população de indivíduos que buscam tratamento para infertilidade em Porto Alegre. O objetivo é verificar se há influência desses fatores na infertilidade masculina e traçar estratégias para a redução dos fatores de risco. Esperamos que seja possível, dessa forma, beneficiar os casais que buscam o tratamento da infertilidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi uma coorte retrospectiva. Os dados foram obtidos por anamnese.

A população estudada constitui pacientes do sexo masculino com dificuldades na obtenção de gravidez. No período de 2004 a 2007, foram selecionados 249 pacientes pelos critérios de inclusão, que eram: ter espermograma no Centro de Medicina Reprodutiva Fertilitat e ter parceiras com idade inferior a 38 anos.

As seguintes variáveis foram estudadas: tabagismo (fumantes ou não-fumantes) e quantidade de cigarros por dia (<10, >10 ou 0); o uso de maconha e cocaína (usuários ou não-usuários); o IMC (Índice de Massa Corpórea = peso/ (altura)²) considerando peso normal: 18,5 a 24,9; sobrepeso: 25 a 29,9 e obeso: a partir de 30; a idade e a paternidade prévia.

Avaliação dos parâmetros reprodutivos: O perfil dos homens foi analisado no que tange a volume ejaculatório, vitalidade, concentração de espermatozóides, percentual de motilidade direcional e não direcional e morfologia segundo os padrões de Kruger (Kruger et al., 1986). Para a avaliação dos parâmetros seminais, foi coletada uma amostra de sêmen por masturbação após três a cinco dias de abstinência sexual.

O volume foi determinado transferindo-se a amostra, após completa liquefação, para um tubo plástico graduado, de 15 mL. A leitura foi feita com aproximação de 0,1 mL e foram considerados normais os volumes entre 2 e 6 mL, após 3-5 dias de abstinência.

A vitalidade foi avaliada pela coloração com eosina (Björndahl et al., 2003). Para isso, pipeta-se uma gota de 10 µL de sêmen e mistura-se com 10 µL de eosina em uma lâmina limpa, cobre-se a lâmina com uma lamínula e observa-se ao microscópio comum, com aumento de 1000x em óleo de imersão. Consideram-se vivos os espermatozóides não-corados pela eosina. Conta-se 100 espermatozóides, corados ou não, e obtém-se o percentual de espermatozóides vivos.

A concentração espermática foi medida em câmara de Makler diretamente nas amostras de sêmen não-diluído. Nos casos de baixa concentração, foram contadas várias gotas da amostra.

A concentração espermática foi calculada da seguinte maneira:

$$\frac{\text{Número de espermatozoides} \times 10 \times 1.000}{\text{Número de blocos contados}} = \text{Contagem espermática em milhões/mL}$$

Onde:

10 = fator de compensação para 0,1 mm de profundidade da câmara.

1.000 = fator de conversão de mm³ para cm³.

Foram considerados normais os valores maiores ou iguais a 20 x 10⁶ espermatozoides/mL.

A motilidade foi determinada pela observação e contagem na câmara de Makler e foi expressa como percentual de espermatozoides móveis.

A classificação foi de acordo com os critérios da OMS (WHO, 1999), com graus de a até d:

Grau a – motilidade rápida, linear e progressiva;

Grau b – motilidade linear lenta ou movimentos não lineares;

Grau c – motilidade não-progressiva (IN LOCO);

Grau d – todos imóveis.

Foram consideradas normais as amostras com valor ≥ 50% com progressão [categorias (a) e (b)] ou ≥ 25% com progressão rápida linear [categoria (a)].

A avaliação morfológica foi feita da seguinte maneira: as lâminas foram limpas com detergentes e água, enxaguadas em álcool e secas. As lamínulas também foram lavadas com álcool. Foi utilizada uma gota pequena de sêmen (5-7 µL), para fazer um esfregaço muito fino. As lâminas foram secas em temperatura ambiente por 24 horas. Em seguida, foram coradas pelo método de Romanowski (Jonecko, 1996).

Considera-se normais os espermatozoides que têm forma oval com contorno liso, acrossomo compreendendo 40 a 70% da parte distal da cabeça, ausência de anormalidade de pescoço, peça intermediária ou cauda e nenhuma gotícula citoplasmática maior do que metade da cabeça. Os espermatozoides foram colocados em um de quatro grupos: normal, com defeito de cabeça, de peça intermediária, ou de cauda. Foram consideradas normais as amostras que tiveram um percentual ≥ 30% de espermatozoides com morfologia normal.

Análise estatística: A análise estatística foi feita utilizando o teste Anova de uma via e, quando necessário, foi feito o teste T de Student. Os dados foram analisados no programa SPSS.

RESULTADOS

Entre os 249 pacientes, a idade mínima foi 21 e a máxima, 61 anos. A média foi 37 anos, com desvio-padrão de 6,3. Quanto ao tabagismo, houve uma frequência de 47 fumantes e 200 não-fumantes. Dois pacientes não informaram se fumavam. O percentual de tabagistas foi 18,9%. Dentre esses, os percentuais de pacientes que fumavam menos e mais do que 10 cigarros ao dia foram 4,4% e 12,9%, respectivamente. Seis deles não informaram o número de cigarros por dia, correspondendo a 2,4%.

No que diz respeito ao uso de drogas, apenas 6% dos homens incluídos na pesquisa afirmaram ser ou terem sido usuários de cocaína. Já a maconha teve uma frequência de 9,2%.

O IMC foi calculado para 230 pacientes que informaram o peso e a altura. Destes, 75 estavam com o peso normal, 112 tinham sobrepeso e 43 eram obesos. Ou seja, um percentual de obesidade de 17,3%.

Quando foram questionados a respeito da paternidade prévia, 16,9% dos pacientes afirmaram já ter filhos, tanto do presente matrimônio, quanto de matrimônios anteriores.

Entre os fumantes, a média de volume ejaculatório foi de 2,5 mL. Os não-fumantes tiveram média de volume de 2,9 mL. A média de motilidade direcional dos fumantes foi de 7%, contra 8,6% dos não-fumantes, embora não tenha sido uma diferença significativa. Os fumantes também tiveram uma maior motilidade não direcional (“in-loco”) do que os não fumantes (15,2% e 12,8%, respectivamente) que, do mesmo modo, não foi significativa (tabela 1).

Quando comparamos os pacientes que fumavam mais do que 10 cigarros por dia com os que fumavam menos de 10 cigarros/dia e com os que não fumavam, também não houve diferença estatística para nenhum dos parâmetros. Os usuários de cocaína, assim como os fumantes, tiveram uma menor média de volume ejaculatório (2,3 mL contra 2,9 mL dos não-usuários). Também observou-se um maior percentual de espermatozoides mortos, que foi de 29%, enquanto os não-usuários tiveram 27,4% para o mesmo parâmetro. Assim como maior motilidade “in-lo-

Tabela 1. Médias e desvios-padrão do volume ejaculatório e do percentual de espermatozoides com motilidade “in-loco” em relação ao tabagismo e ao uso de cocaína.

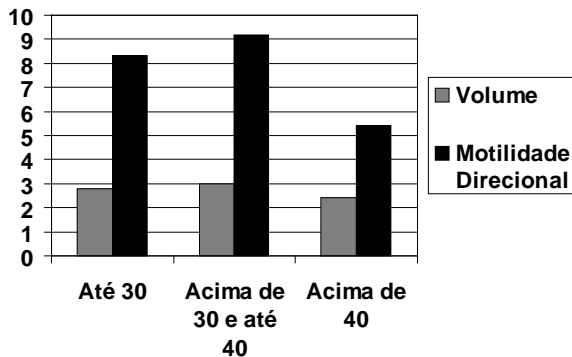
| | Número de pacientes | Média de Volume (mL) | Desvio-Padrão | Espermatozoides com Motilidade “In-Loco” (%) | Desvio Padrão |
|-------------------------|---------------------|----------------------|---------------|--|---------------|
| Fumantes | 47 | 2,49 | 1,25 | 15,1 | 10,13 |
| Não-Fumantes | 200 | 2,95 | 1,44 | 12,8 | 8,31 |
| Usuários de Cocaína | 15 | 2,32 | 1,54 | 16,5 | 12,14 |
| Não-usuários de Cocaína | 232 | 2,89 | 1,40 | 13,0 | 8,39 |

* p>0,05. Não houve diferença estatística para nenhum dos parâmetros acima.

Tabela 2. Percentual médio de motilidade “in-loco” de acordo com a paternidade prévia.

| Paternidade Prévia | N | Média de Motilidade “In-Loco”(%) | Desvio-Padrão |
|--------------------|-----|----------------------------------|---------------|
| Sim | 42 | 9,3* | 7,6 |
| Não | 207 | 14,0* | 8,68 |

* p=0,01

Gráfico 1. Médias de volume e motilidade direcional de acordo com a faixa etária.

* p<0,05 para ambos os parâmetros em homens acima de 40 anos.

co” (16,5% e 13%, respectivamente). Porém, nenhum dos parâmetros foi diferente estatisticamente (tabela 1). Nos usuários de maconha foi observada uma maior percentagem de espermatozoides com morfologia anormal do que nos não-usuários (77% e 74,3%, respectivamente). Entre os espermatozoides com formas anormais, os com defeito de peça intermediária foram os responsáveis por esse aumento (15,4% nos usuários e 12,8% nos não-usuários). Contudo, não houve diferença significativa para nenhum desses parâmetros.

Na comparação entre parâmetros do espermograma de pacientes obesos, normais e com sobrepeso também não houve diferença significativa para nenhuma das variáveis. Entretanto, nos homens que tinham paternidade prévia foi detectado um menor percentual de motilidade “in-loco” do que nos que nunca haviam sido pais (média de 9,27% contra 14,05%). Essa diferença foi estatisticamente significativa (p=0,01) (tabela 2).

Além disso, houve uma diminuição no volume ejacatório e na motilidade direcional de acordo com a idade (p<0,05). Quando foi realizada uma separação em grupos de faixa etária de até 30 anos, acima de 30 e até 40 e acima de 40 anos, essas diminuições seguiram sendo evidentes. As médias de volume para os grupos foram: 2,8 mL para até 30 anos, 3 mL para acima de 30 e até 40 e 2,3 mL para acima de 40 anos (p=0,017). Quanto à motilidade direcional, as médias foram: 8,3%, 9,2% e 5,4%, respectivamente (p=0,02) (gráfico 1).

DISCUSSÃO

Segundo Tazarek et al. (2005) e Hassa et al. (2006) há uma diminuição na motilidade progressiva relacionada ao tabagismo. Nesse trabalho, também observamos um

menor volume e percentual de motilidade direcional e um aumento na motilidade “in-loco” dos fumantes. Porém, não houve diferença estatística entre os grupos para esses parâmetros. Esse resultado pode ser devido ao pequeno número de fumantes na amostra (somente 47), enquanto o número de não-fumantes foi bem maior (200). No estudo de Hassa et al. (2006), o tabagismo foi negativamente correlacionado com a contagem de espermatozoides com motilidade direcional. Porém, a diferença entre o número de fumantes e de não-fumantes era bem menor. Na amostra havia 126 fumantes e 97 não fumantes (Hassa et al., 2006). Isso nos leva a crer que, com um maior número de fumantes na amostra, essa diferença poderia ser significativa.

No que tange ao uso de cocaína, foi observado, assim como nos fumantes, um menor volume de ejaculado e maior motilidade “in-loco”. Além disso, também observou-se um número maior de espermatozoides mortos. Contudo, a diferença nesses parâmetros não foi significativa. Hurd et al. (1992), Bracken et al. (1990) e Yelian et al. (1994) obtiveram uma diminuição nos parâmetros da motilidade nos usuários de cocaína. Porém, Yelian et al. (1994) e Hurd et al. (1992) realizaram testes *in vitro* e não *in vivo*. É, portanto, necessário realizar mais pesquisas acerca da interação *in vivo* da cocaína com os espermatozoides, já que eles possuem um grande número de receptores para a cocaína e, uma vez dentro da célula, ela é passível de causar danos aos mesmos (Yazigi et al., 1991).

Quanto ao uso de maconha, uma pesquisa observou uma diminuição na atividade mitocondrial dos espermatozoides induzida pela anandamida, canabinóide de produção endógena, comprovando a presença de receptores ativos para essa substância nos espermatozoides (Rossato et al., 2005). No presente estudo foi observada, embora não seja significativa, uma maior percentagem de espermatozoides com morfologia anormal. O defeito responsável por esse aumento foi o de peça intermediária, que é justamente onde se localizam as mitocôndrias no espermatozoide. Porém, é necessária a realização de estudos mais específicos para avaliar se há realmente uma interferência da maconha na atividade das mitocôndrias dos espermatozoides.

A diferença estatisticamente significativa encontrada na menor motilidade “in-loco” dos homens que já haviam sido pais (p=0,01) indica que, aqueles que têm menos espermatozoides com motilidade não-direcional, podem ter mais chances de obter gravidez.

Quanto à idade avançada, foi demonstrada uma diminuição no volume espermático e na motilidade dos espermatozoides com a idade (Kühnert et al., 2004). Essa diminuição também foi observada nesse estudo e foi estatisticamente significativa para homens acima de 40 anos, tendo menor volume e motilidade direcional (p<0,05). Isso confirma a possibilidade de menor funcionamento das vesículas seminais apontada por Kühnert et al. (2004) e uma menor motilidade direcional com a idade. É possível que a diminuição da frutose no fluido seminal tenha alguma interferência na fertilidade masculina, já que ela interfere na motilidade, proporcionando suprimento energético ao espermatozoide e é produzida pelas vesículas seminais (Lewis-Jones et al., 1996). No entanto, devem ser realizados estudos para avaliar essa relação.

CONCLUSÃO

Através do estudo do tabagismo, do uso de drogas ilícitas, da obesidade e da idade avançada em homens que buscam tratamento para infertilidade em Porto Alegre, vimos que os homens que já tiveram filhos apresentaram um menor percentual de espermatozoides com motilidade "in loco", podendo ser essa a causa da maior facilidade em obter gravidez. Também foi demonstrada uma relação entre idade avançada e menor volume ejaculatório, bem como menor motilidade direcional.

Concluimos que é necessário realizar novas pesquisas a respeito da interação do tabagismo com os parâmetros seminais. Também seria interessante avaliar a relação entre o uso de cocaína e uma menor motilidade espermática *in vivo* e se há uma interferência da maconha na atividade das mitocôndrias dos espermatozoides.

Endereço para correspondência:

Laura Silveira Ayres
Av. Cristiano Fischer, 99/402
Porto Alegre – RS
CEP 91410-001
laura.ayres@gmail.com

Referências Bibliográficas

- Björndahl L, Söderlund I, Vist UK. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Hum Reprod*. 2003;18(4):813-816.
- Bracken MB, Eskenazi B, Sachse K, Mcsharry JE, Hellenbrand K, Leo-Summers L. Association of cocaine use with sperm concentration, motility and morphology. *Fertil Steril*. 1990;53(2):315-322.
- Fejes I, Koloszar S, Zavaczki Z, Daru J, Szollosi J, Pal A. Effect of body weight on testosterone/estradiol ratio in oligozoospermic patients. *Arch Androl*. 2006;52(2):97-102.
- Frazzetto G. Does marijuana have a future in pharmacopeia? *EMBO Rep*. 2003;4(7):651-653.
- Hassa H, Yildirim A, Can C, Turgut M, Tanir HM, Senses T, Sahin-Mutlu F. Effect of smoking on semen parameters of men attending an infertility clinic. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2006;33(1):19-22.
- Hurd WW, Kelly MS, Ohl DA, Gauvin JM, Smith AJ, Cummins CAI. The effect of cocaine on sperm motility characteristics and bovine cervical mucus penetration. *Fertil Steril*. 1992;57(1):178-182.
- Jonecko A. Gustaw Giemsa (1867-1948) – his universal method of microscopic dying and his contribution for tropical medicine and chemotherapy. *Arch Hist Filoz Med*. 1996;59(1):31-40.
- Kort HI, Massey JB, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Shapiro DB, Witt MA, Roubush WE. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *J Androl*. 2006;27(3):450-452.
- Kruger TF, Menkveld R, Stander FS. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in-vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1986 Dec;46(6):1118-23.
- Kühnert B, Eberhard N. Reproductive functions of the ageing male. *Hum Reprod Update*. 2004;10(4):327-339.
- Lewis-Jones DI, Aird IA, Biljan MM, Kingsland CR. Effects of sperm activity on zinc and fructose concentrations in seminal plasma. *Hum Reprod*. 1996;11(11):2465-2467.
- Raymond JG. *Women as Wombs: Reproductive Technologies and the Battle over Women's Freedom*. San Francisco: Harper Collins Publishers; 1993.
- Rossato M, Ion Popa F, Ferigo M, Clari G, Foresta C. Human Sperm Express Cannabinoid Receptor Cb₁, the Activation of Which Inhibits Motility, Acrosome Reaction, and Mitochondrial Function. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(2):984-991.
- Sofikitis N, Miyagawa I, Dimitriadis D, Zavos P, Sikka S, Hellstrom W. Effects of smoking on testicular function, semen quality and sperm fertilizing capacity. *J Urol*. 1995;154(3):1030-1034.
- Taszarek HG, Depa-Martynów M, Derwich K, Pawelczyk L, Jedrzejczak P. The influence of cigarette smoking on sperm quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Przegl Lek*. 2005;62(10):978-981.
- Vogt HJ, Heller WD, Borelli S. Sperm quality of healthy smokers, ex-smokers, and never smokers. *Fertil Steril*. 1986;45(1):106-110.
- WHO Corporate Author - Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.
- Yazigi RA, Odem RR, Polakoski KL. Demonstration of specific binding of cocaine to human spermatozoa. *JAMA*. 1991;266(14):8-8.
- Yelian FD, Sacco AG, Ginsburg KA, Doerr PA, Armant DR. The effects of in vitro cocaine exposure on human sperm motility, intracellular calcium, and oocyte penetration. *Fertil Steril*. 1994;61(5):915-921.
- Zavos PM, Correa JR, Antypas S, Zarmakoupis-Zavos PN, Zarmakoupis CN. Effects of seminal plasma from cigarette smokers on sperm viability and longevity. *Fertil Steril*. 1998;69(3):425-429.

2009 Congresso Brasileiro De Reprodução Assistida

Agosto de 2009 Curitiba, PR

Comparação dos resultados entre embriões descongelados provenientes de injeção intracitoplasmática de espermatozóides com espermatozóides ejaculados frescos ou criopreservados

A comparison of post-thaw results between embryos Arising from intracytoplasmic sperm injection with fresh or cryopreserved ejaculated spermatozoa

Priscila Queiroz, B.Sc.¹, Daniela Paes Almeida Ferreira Braga, M.Sc.^{1,2}, Tatiana Carvalho de Souza Bonetti, M.Sc.², Assumpto Iaconelli Jr., M.D.^{1,2}, Tsutomu Aoki, M.D., PhD¹, Edson Borges Jr., M.D., PhD^{1,2}

1. Fertility – Centro de Fertilização Assistida

Av. Brigadeiro Luis Antônio, 4545 - São Paulo – SP, Brasil. Cep: 01402-001

2. Instituto Sapientiae– Centro de Educação e Pesquisa em Reprodução Assistida

Rua. Vieira Maciel, 62 - São Paulo – SP, Brasil. Cep: 04503-040

RESUMO

Objetivo: Avaliar a sobrevivência após descongelamento, taxas de implantação e gestação de embriões derivados de Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide (ICSI) utilizando espermatozóides ejaculados frescos ou criopreservados.

Métodos: Taxas de sobrevivência, implantação e gestação após descongelamento foram avaliadas em 190 ciclos de transferência de embriões descongelados. Os ciclos foram divididos em dois grupos: ciclos com injeção de espermatozóides frescos (n=150) e ciclos com injeção de espermatozóides criopreservados (n=40).

Resultados: Entre os embriões descongelados 355 eram derivados de ciclos de ICSI utilizando espermatozóides frescos e 81 espermatozóides criopreservados. As médias de idade materna ($33,34 \pm 3,85$ anos e $34,03 \pm 6,09$ anos, $P = 0,502$), taxa de fertilização normal (77,1% e 76,7%, $P = 0,911$), número de embriões transferidos pré congelamento ($1,58 \pm 0,77$ e $1,64 \pm 0,78$; $P = 0,716$) ou número de embriões criopreservados ($3,47 \pm 2,89$ and $2,73 \pm 2,91$, $P = 0,173$) foi igual para os ciclos que utilizaram espermatozóides frescos ou criopreservados, respectivamente. Não foi observada nenhuma influência no uso de espermatozóides descongelados para ICSI no que diz respeito a qualidade embrionária pré congelamento (CR=6,090. $P=0,779$), sobrevivência embrionária (CR=2,584, $P=0,635$), taxas de implantação (CR=2,314, $P=0,779$), gestação (OR = 1,32; IC 95% = 0,55 – 2,67; $P = 0,538$) ou aborto (OR = 0,85; IC 95% = 0,17 – 4,13; $P = 0,837$).

Conclusão: Nossos achados indicam que o processo de criopreservação seminal não apresenta impacto nas taxas de sobrevivência embrionária, e, além disso, os resulta-

dos clínicos em ciclos de descongelamento embrionário não diferem quando são utilizados espermatozóides frescos ou criopreservados.

Palavras Chave: Sêmen, embrião, criopreservação, ICSI, espermatozóide

ABSTRACT

Objective: To assess post-thaw survival, implantation, and pregnancy rates of embryos derived from Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) using fresh or cryopreserved ejaculated sperm.

Methods: Post-thaw survival, implantation, and pregnancy rates were evaluated in 190 frozen–thawed embryo transfer cycles. The cycles were split into two groups: cycles in which fresh sperm were injected (n=150) and cycles in which cryopreserved sperm were used (n=40).

Result(s): Among the frozen thawed embryos 355 were derived from ICSI cycles using fresh sperm and 81 embryos derived from ICSI cycles using cryopreserved sperm. The mean maternal age (33.34 ± 3.85 y-old and 34.03 ± 6.09 y-old, $P = 0.502$), normal fertilization rate (77.1% and 76.7%, $P = 0.911$), mean number of embryos transferred pre-freezing (1.58 ± 0.77 and 1.64 ± 0.78 ; $P = 0.716$) or mean number of cryopreserved embryos (3.47 ± 2.89 and 2.73 ± 2.91 , $P = 0.173$) were equal for cycles that used fresh or cryopreserved sperm respectively. It was not observed any influence of the use of frozen/thawed sperm for ICSI on the embryo quality prior freezing (RC=6.090. $P=0.779$), embryo survival (RC=2,584, $P=0,635$), implantation (RC=2.314, $P=0.779$), pregnancy (OR = 1.32; IC 95% = 0.55 – 2.67; $P = 0.538$) or miscarriage rates (OR

= 0.85; IC 95% = 0.17 – 4.13; $P = 0.837$).

Conclusion: Our findings indicate that the semen cryopreservation process does not impact in embryo survival rate and moreover, the clinical outcomes in embryo thaw cycles do not differ when fresh or thawed sperm are used.

Key Words: Semen, embryo, cryopreservation, ICSI, spermatozoa

INTRODUÇÃO

Atualmente a criopreservação de espermatozoides e tecido testicular vem se tornando cada vez mais importante devido às técnicas de reprodução humana assistida (TRA), proporcionando a preservação da fertilidade masculina, independente da causa de infertilidade (Sanger, Olson et al. 1992; Rofeim and Gilbert 2005). Através da criopreservação espermática, pacientes portadores de neoplasias submetidos à quimio/radioterapia, pacientes que serão submetidos à vasectomia ou que tenham profissões de alto risco e aqueles que possam vir a sofrer danos a espermatogênese, encontram a possibilidade de concepção, através ou devido ao armazenando amostras seminais previamente ao tratamento (Sanger, Olson et al. 1992).

Diversos estudos foram realizados a fim de avaliar a influência da criopreservação na qualidade seminal (Rofeim and Gilbert 2005; Desrosiers, Legare et al. 2006). Alguns autores relatam que a inseminação intra-uterina com amostras de sêmen ejaculado criopreservado resulta em baixas taxas de gestação quando comparadas ao uso de espermatozoides frescos (Kuczynski, Dhont et al. 2001), embora outros autores tenham demonstrado que a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) utilizando espermatozoides criopreservados apresenta taxas de fertilização e gestação similares àquelas utilizando espermatozoides frescos (Perraguin-Jayot, Audebert et al. 1997; Kuczynski, Dhont et al. 2001; Marcus-Braun, Braun et al. 2004). Entretanto, mesmo não havendo dúvidas de que a utilização de espermatozoides criopreservados possa resultar em altas taxas de fertilização de oócitos submetidos à ICSI, mais estudos comparativos da eficácia desta técnica com espermatozoides frescos e criopreservados provenientes de pacientes inférteis devem ser realizados (Gil-Salom, Romero et al. 1998; Madgar, Hourvitz et al. 1998; Palermo, Schlegel et al. 1999).

As TRA normalmente produzem grande número de embriões, dessa forma, a criopreservação embrionária tornou-se um complemento importante, visto que possibilita a redução do número de embriões transferidos por ciclo. Além disso, a criopreservação fornece muitos outros benefícios clínicos como o aumento da taxa de gestação cumulativa, a redução do risco de gestações múltiplas e da síndrome de hiperestimulação ovariana. Entretanto, sabe-se que vários fatores estão relacionados ao sucesso do congelamento e descongelamento embrionário, tais como o estágio de clivagem no momento da criopreservação, a aparência morfológica embrionária pré congelamento, a suplementação hormonal durante o ciclo de transferência pós descongelamento, o estímulo ovariano utilizado previamente a punção oocitária e o resultado

do ciclo de transferência dos embriões a fresco [18-20]. Estudos a respeito da sobrevivência embrionária após criopreservação e seu potencial de produzir gestação após transferência permanecem em discordância, visto que alguns autores relataram não haver nenhuma influência [19], enquanto outros relatam efeitos deletérios da criopreservação no embrião diminuindo o seu potencial de implantação [29].

Dessa forma, este estudo tem como objetivo comparar as taxas de sobrevivência, implantação e gestação de embriões descongelados provenientes de ciclos de ICSI onde foram utilizados espermatozoides ejaculados frescos ou criopreservados.

MÉTODOS

Desenho do Experimento

Este estudo foi realizado em pacientes submetidas à transferência de embriões descongelados provenientes de ICSI com espermatozoides ejaculados frescos ($n = 150$) ou criopreservados ($n = 40$). Foram excluídos deste estudo pacientes com amostra seminal de concentração inferior a $5,0 \times 10^6/\text{mL}$. Com o objetivo de avaliar exclusivamente a contribuição da condição espermática nas taxas de fertilização, implantação e gestação e descartar o fator oocitário de infertilidade, foram excluídas pacientes com idade maior que 37 anos ou que obtiveram menos de quatro oócitos em metáfase II (MII) após a punção. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa local e para a realização do mesmo, foi obtido consentimento informado, onde os pacientes concordaram em compartilhar os resultados do tratamento para fins de pesquisa.

Estímulo ovariano controlado

A estimulação ovariana controlada foi realizada através de bloqueio com agonista GnRH (GnRHa, Lupron Kit™, Abbott S.A Société Française des Laboratoires, Paris, France) seguida de estimulação ovariana com FSH recombinante (Gonal-F®, Serono, Geneve, Switzerland). A dinâmica folicular foi acompanhada por ultra-sonografia iniciada no quarto dia de administração da gonadotrofina. Quando foram observados crescimento folicular e níveis de estradiol adequados, foi administrado Gonadotrofina Corionica Humana - hCG (r-hCG, Ovidrel™, Serono, Geneve, Switzerland) para ativar a da maturação folicular final. A punção folicular foi realizada 35-36 h após a administração do hCG sob anestesia geral guiada por ultra-sonografia transvaginal.

Preparação dos oócitos

Após a recuperação, os oócitos foram incubados em meio de cultura (G-MOPS™-V1, Vitrolife, Kungsbacka, Sweden) e cobertos com óleo mineral (Ovoil™, Vitrolife, Kungsbacka, Sweden) a 37°C e 6% CO₂ por 5 horas. Foram removidas as células do complexo cumulus-corona após exposição dos oócitos a 30 segundos em meio de cultura Hepes-buffered contendo 80 IU/mL de hyaluronidase (Irvine Scientific, Santa Ana, USA), seguida de retirada manual destas células através do uso de pipetas Pasteur

Tabela 1. Características dos ciclos onde foi realizado ICSI com espermatozoides ejaculados frescos ou criopreservados

| | Espermatozoides Ejaculados Frescos (n = 150) | Espermatozoides Ejaculados Criopreservados (n = 40) | P |
|---------------------------------|--|---|-------|
| Idade Materna | 33,34 ± 3,85 | 34,03 ± 6,09 | 0,502 |
| Taxa de fertilização normal (%) | 77,1 % | 76,7 % | 0,911 |
| Nº embriões transferidos | 1,58 ± 0,77 | 1,64 ± 0,78 | 0,716 |
| Nº embriões criopreservados | 3,47 ± 2,89 | 2,73 ± 2,91 | 0,173 |

de vidro afiladas (Humagen Fertility Diagnostics, Charlottesville, Virginia, USA).

Os oócitos denudados foram classificados de acordo com seu grau de maturação nuclear e aqueles que extrusaram o primeiro corpúsculo polar foram considerados para utilização na ICSI.

Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides

Para o procedimento de ICSI, os oócitos foram incubados em gotas individuais de 4µL de meio tamponado (G-Mops™, Vitrolife, Kungsbacka, Sweden). A amostra seminal processada foi colocada em uma gota central de 4µL de solução de polyvinylpyrrolidone (PVP, Irvine Scientific, Santa Ana, USA) em uma placa de cultura de 60X15mm (Corning®, New York, USA) coberta de óleo mineral aquecido (Ovoil™, Vitrolife, Kungsbacka, Sweden). A injeção espermática foi realizada em placa aquecida à temperatura de 37°C em microscópio invertido (Eclipse TE 300; Nikon®, Tokyo, Japan) 40 horas após a aplicação do hCG.

Avaliação da fertilização, qualidade embrionária e transferência embrionária

A fertilização oocitária foi avaliada 16-20 horas após a ICSI e foi considerada fertilização normal a presença de dois pronúcleos claramente distintos. A qualidade embrionária foi avaliada sob microscópio invertido (Eclipse TE 300; Nikon®, Tokyo, Japan). Os seguintes parâmetros foram avaliados: (i) número de blastômeros, (ii) porcentagem de fragmentação, (iii) simetria dos blastômeros, (iv) presença de multinucleação e (v) defeitos na zona pelúcida e citoplasma.

A transferência embrionária foi realizada no segundo ou terceiro dia de desenvolvimento. Foram considerados bons embriões aqueles que apresentaram as seguintes características: de 3 a 5 células no segundo dia e 6 a 10 células no terceiro dia de desenvolvimento, porcentagem de fragmentação inferior a 15%, blastômeros simétricos, ausência de multinucleação, citoplasma claro com granulação moderada e sem inclusões, ausência de granulações no espaço perivitelínico e ausência de dismorfismo da zona pelúcida. Para cada casal, foi transferido de um a quatro embriões, de acordo com a idade da mulher. Os

embriões excedentes e de boa qualidade foram selecionados para congelamento no terceiro dia após a injeção.

Congelamento embrionário e procedimento de descongelamento

A criopreservação foi realizada através de protocolo lento de congelamento com uso de propanediol (PROH) como crioprotetor. O congelamento e descongelamento foram realizados utilizando-se os kits comerciais como recomendado pelo fabricante (Irvine Scientific, Santa Ana, USA). Após o procedimento de descongelamento os embriões foram transferidos para meio de cultura, e o estágio de desenvolvimento embrionário foi cuidadosamente avaliado sob o microscópio invertido. A sobrevivência e integridade dos embriões descongelados foram consideradas quando os blastômeros apresentavam ≥ 50% de membranas morfológicamente normais e citoplasma claro. Os embriões foram cultivados em incubadora com 5% CO₂, a 37°C, por 2–4 horas antes da transferência. A técnica de *assisted hatching* foi realizada através do uso do laser OCTAX (OCTAX PolarAIDE™, Herborn, Germany).

Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão (DP) para variáveis numéricas e proporções (%) para variáveis categóricas. A média dos valores foi comparada pelo *test t de Student's*.

Para avaliar a influência do uso de espermatozoides descongelados para ICSI na (i) qualidade embrionária pré congelamento, (ii) sobrevivência embrionária pós descongelamento, (iii) taxas de implantação, (iv) gestação e (v) aborto pós descongelamento, foi realizada análise de regressão multivariada. Para análise de regressão linear, os resultados foram expressos como coeficiente de regressão (CR) e valor de *P*, e para análise de regressão logística binária os resultados foram expressos em odds ratios (OR), e valor de *P*.

Todas as análises de regressão realizadas foram ajustadas para idade materna, número de embriões transferidos e taxa de fertilização, sendo essas consideradas possíveis variáveis conflitantes para as análises. Foram considerados resultados significativos quando *P* < 0,05. Para a análise dos dados foi utilizado o programa estatístico Minitab (versão 14).

RESULTADOS

Entres os embriões descongelados, 355 eram provenientes de ciclos de ICSI utilizando espermatozoides frescos e 81 eram embriões de ciclos de ICSI utilizando espermatozoides criopreservados. Os grupos eram semelhantes em relação à idade materna, taxa de fertilização normal, média de embriões transferidos pré congelamento e média de embriões criopreservados.

Não foi observado nenhuma influência do uso de espermatozoides criopreservados para ICSI no que diz respeito à qualidade embrionária pré congelamento (CR=6,090, *P*=0,779), sobrevivência embrionária (CR=2,584, *P*=0,635), implantação (CR=2,314, *P*=0,860), gestação (OR = 1,32; IC 95% = 0,55 – 2,67; *P* = 0,538) ou aborto (OR = 0,85; IC 95% = 0,17 – 4,13; *P* = 0,837).

Entre os embriões que sobreviveram ao procedimento de congelamento/descongelamento, 21.5% apresentaram todos os blastômeros intactos, 20.6% derivados de ICSI com espermatozoides ejaculados criopreservados e 21.8 % derivados de ICSI com espermatozoides ejaculados frescos.

DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi investigar a existência de alguma diferença na sobrevivência embrionária pós descongelamento, taxas de implantação e gestação em pacientes submetidas a ciclos de descongelamento embrionário após ICSI utilizando espermatozoides frescos ou criopreservados. Sabe-se que a qualidade espermática exerce um importante papel durante a fertilização (Swann, Saunders et al. 2006; Saunders, Swann et al. 2007). Além disso, a viabilidade de cada embrião transferido depende da qualidade biológica do espermatozoide e do oócito. Os efeitos paternos na pré-implantação embrionária tem sido apontados como responsáveis pelas falhas repetidas nas tentativas de reprodução assistida, e o desenvolvimento embrionário pré-implantacional pode ser comprometido por deficiências no genoma nuclear espermático ou por fatores citoplasmáticos derivados dos espermatozoides (Benchaib, Braun et al. 2003; Tesarik 2005).

A criopreservação de amostras seminais é parte integral dos programas de concepção assistida e apresenta aplicação em diversas circunstâncias, tais como em situações onde existe algum dano a fertilidade masculina, assegurando a fertilidade de homens que serão submetidos à vasectomia, quimio/radioterapia e banco de sêmen de doador. Entretanto, durante a criopreservação os espermatozoides são submetidos a mudanças dramáticas em seu ambiente extra e intracelular devida exposição à crioprotetores, refrigeração, congelamento e descongelamento. Os efeitos físicos e químicos desses processos e o uso desses reagentes são conhecidos por prejudicarem a estrutura espermática e suas capacidades funcionais (Critser, Arneson et al. 1987; Check, Check et al. 1991; Cross and Hanks 1991).

Diversos estudos descreveram que o congelamento e descongelamento dos espermatozoides resultam na redução do metabolismo espermático o qual limita o número de espermatozoides funcionais viáveis para as técnicas de concepção assistida (Hammerstedt, Graham et al. 1990; Plachot, Antoine et al. 1996; Hammadeh, Askari et al. 1999). O efeito predominante da criopreservação no sêmen é a perda da viabilidade, redução da motilidade, transformações morfológicas e alterações na estrutura da cromatina (Critser, Arneson et al. 1987; Check, Check et al. 1991; Cross and Hanks 1991). As mudanças na estrutura do DNA após a criopreservação seminal têm sido estudadas por muitos grupos, apresentando resultados contraditórios. Alguns autores relataram a destruição do DNA, enquanto outros grupos relataram apenas a ocorrência de algumas mudanças em homens com fertilidade diminuída (Hammadeh, Askari et al. 1999; de Paula, Bertolla et al. 2006).

Entretanto, nossos resultados demonstraram que o uso de espermatozoides ejaculados criopreservados não afeta o desenvolvimento embrionário tanto a fresco,

quanto após o descongelamento do embrião. Além disso, foi observado que a sobrevivência embrionária, taxas de implantação e gestação não foram afetadas pela criopreservação espermática.

A criopreservação embrionária também exerce um papel significativo na reprodução humana assistida, proporcionando aos pacientes a possibilidade de mais de uma tentativa de gestação após o ciclo de estimulação ovariana, diminuindo a exposição dessas pacientes a gonadotrofinas exógenas e melhorando as taxas de gestação cumulativa (Veeck 2003; Anderson, Wilkinson et al. 2005). O principal problema durante a criopreservação embrionária é a formação de cristais de gelo no ambiente intracelular, o que pode levar a danos celulares e retardo no desenvolvimento do embrião (Shaw and Jones 2003). Uma variedade de fatores são citados na literatura como sendo interferentes no impacto da sobrevivência embrionária pós descongelamento, incluindo as características do estímulo utilizado durante o ciclo, tipo de crioprotetor utilizado, e adição de sucrose ao agente crioprotetor (Lassalle, Testart et al. 1985; Testart, Lassalle et al. 1987; Frydman, Parneix et al. 1988; Tesarik, Kopecny et al. 1988; Oehninger, Toner et al. 1992; Van der Elst, Van den Abbeel et al. 1996).

Além disso, a implantação e desenvolvimento pós-implantacional podem ser negativamente influenciadas pela técnica de transferência embrionária e por um complexo de fatores de ativação local responsáveis pela receptividade uterina. Um estudo recente demonstrou que a ICSI realizada com espermatozoides ejaculados frescos ou criopreservados apresenta resultados comparáveis em termos de fertilização e qualidade embrionária (Kuczynski, Dhont et al. 2001). De fato, uma vez que a ativação do genoma embrionário tem início a partir do segundo ciclo celular, a manifestação de genes derivados dos espermatozoides antes desse estágio é pouco provável (Tesarik, Kopecny et al. 1986; Tesarik, Kopecny et al. 1988).

Concluindo, nós sugerimos que a criopreservação espermática associada ao congelamento embrionário pode ser uma importante ferramenta para preservar a fertilidade masculina e aumentar os níveis de gestação cumulativa sem impacto no sucesso da técnica de ICSI.

Autor para envio de correspondência:

Edson Borges Jr., M.D., PhD

E-mail: edson@fertility.com.br

Endereço: Av. Brigadeiro Luis Antonio, 4545. Cep: 01402-001 - São Paulo - SP, Brasil

Fone: 3885-9858

Referências

- Anderson, A. R., S. S. Wilkinson, et al. (2005). "Reduction of high order multiples in frozen embryo transfers." *Reprod Biomed Online* **10**(3): 402-5.
- Benchaib, M., V. Braun, et al. (2003). "Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique." *Hum Reprod* **18**(5): 1023-8.
- Check, M. L., J. H. Check, et al. (1991). "Detrimental effects of cryopreservation on the structural and functional integrity of the sperm membrane." *Arch Androl* **27**(3): 155-60.
- Critser, J. K., B. W. Arneson, et al. (1987). "Cryopreservation of human spermatozoa. II. Postthaw chronology of motility and of

zona-free hamster ova penetration." *Fertil Steril* **47**(6): 980-4.

Cross, N. L. and S. E. Hanks (1991). "Effects of cryopreservation on human sperm acrosomes." *Hum Reprod* **6**(9): 1279-83.

de Paula, T. S., R. P. Bertolla, et al. (2006). "Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia." *Fertil Steril* **86**(3): 597-600.

Desrosiers, P., C. Legare, et al. (2006). "Membranous and structural damage that occur during cryopreservation of human sperm may be time-related events." *Fertil Steril* **85**(6): 1744-52.

Frydman, R., I. Parneix, et al. (1988). "LHRH agonists in IVF: different methods of utilization and comparison with previous ovulation stimulation treatments." *Hum Reprod* **3**(4): 559-61.

Gil-Salom, M., J. Romero, et al. (1998). "Testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection: a chance of fertility in nonobstructive azoospermia." *J Urol* **160**(6 Pt 1): 2063-7.

Hamadeh, M. E., A. S. Askari, et al. (1999). "Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men." *Int J Androl* **22**(3): 155-62.

Hammerstedt, R. H., J. K. Graham, et al. (1990). "Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive." *J Androl* **11**(1): 73-88.

Kuczynski, W., M. Dhont, et al. (2001). "The outcome of intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved ejaculated spermatozoa--a prospective randomized study." *Hum Reprod* **16**(10): 2109-13.

Lassalle, B., J. Testart, et al. (1985). "Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2 propanediol." *Fertil Steril* **44**(5): 645-51.

Madgar, I., A. Hourvitz, et al. (1998). "Outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic injection of epididymal and testicular sperm extracted from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia." *Fertil Steril* **69**(6): 1080-4.

Marcus-Braun, N., G. Braun, et al. (2004). "Effect of cryopreservation on quality and fertilization capacity of human sperm." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **116**(1): 63-6.

Oehninger, S., J. P. Toner, et al. (1992). "Performance of cryopreserved pre-embryos obtained in in vitro fertilization cycles with or without a gonadotropin-releasing hormone agonist." *Fertil Steril* **57**(3): 620-5.

Palermo, G. D., P. N. Schlegel, et al. (1999). "Fertilization and pregnancy outcome with intracytoplasmic sperm injection for

azoospermic men." *Hum Reprod* **14**(3): 741-8.

Perraguin-Jayot, S., A. Audebert, et al. (1997). "Ongoing pregnancies after intracytoplasmic injection using cryopreserved testicular spermatozoa." *Hum Reprod* **12**(12): 2706-9.

Plachot, M., J. M. Antoine, et al. (1996). "[Oocyte fertilizability and embryo development in poor responders]." *Contracept Fertil Sex* **24**(5): 384-5.

Rofeim, O. and B. R. Gilbert (2005). "Long-term effects of cryopreservation on human spermatozoa." *Fertil Steril* **84**(2): 536-7.

Sanger, W. G., J. H. Olson, et al. (1992). "Semen cryobanking for men with cancer--criteria change." *Fertil Steril* **58**(5): 1024-7.

Saunders, C. M., K. Swann, et al. (2007). "PLCzeta, a sperm-specific PLC and its potential role in fertilization." *Biochemical Society Symposium* (74): 23-36.

Shaw, J. M. and G. M. Jones (2003). "Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos." *Hum Reprod Update* **9**(6): 583-605.

Swann, K., C. M. Saunders, et al. (2006). "PLCzeta(zeta): a sperm protein that triggers Ca²⁺ oscillations and egg activation in mammals." *Semin Cell Dev Biol* **17**(2): 264-73.

Tesarik, J. (2005). "Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo." *Reprod Biomed Online* **10**(3): 370-5.

Tesarik, J., V. Kopecny, et al. (1986). "Activation of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and changes in the ribosomal content of human embryos developing in vitro." *J Reprod Fertil* **78**(2): 463-70.

Tesarik, J., V. Kopecny, et al. (1988). "Early morphological signs of embryonic genome expression in human preimplantation development as revealed by quantitative electron microscopy." *Dev Biol* **128**(1): 15-20.

Testart, J., B. Lassalle, et al. (1987). "Factors influencing the success rate of human embryo freezing in an in vitro fertilization and embryo transfer program." *Fertil Steril* **48**(1): 107-12.

Van der Elst, J., E. Van den Abbeel, et al. (1996). "Long-term evaluation of implantation of fresh and cryopreserved human embryos following ovarian stimulation with buserelin acetate-human menopausal gonadotrophin (HMG) or clomiphene citrate-HMG." *Hum Reprod* **11**(10): 2097-106.

Veeck, L. L. (2003). "Does the developmental stage at freeze impact on clinical results post-thaw?" *Reprod Biomed Online* **6**(3): 367-74.

2009 Congresso Brasileiro De Reprodução Assistida

Agosto de 2009 Curitiba, PR

Presença de espermatozóides no ejaculado em pacientes com azoospermia não-obstrutiva

Presence of spermatozoa in the ejaculate of non-obstructive azoospermic patients

Kamila Peixoto Ribeiro^{1,2}, Fernanda Karoline Lemos da Silva^{1,2}, Ubiratan Barros de Melo², Paulo Franco Taitson²

1-Alunas de Iniciação Científica

2-Grupo de Pesquisa Anatomia Funcional do Aparelho Urogenital PUC Minas/CNPq.

RESUMO

Objetivo: Pesquisar e para identificar espermatozóides, presentes no ejaculado de pacientes com azoospermia não-obstrutiva. Analisar o nível sérico do hormônio folículo-estimulante (FSH) e a histologia testicular como fatores preditivos para a recuperação espermática. **Materiais e Métodos:** 60 pacientes, com idades compreendidas entre os 20 e os 50 anos, com diagnóstico inicial compatível com azoospermia não-obstrutiva, coletaram duas 2 amostras seminais, para análise macroscópica e microscópica dos parâmetros diferenciados para cada amostra. Na ausência de espermatozóides, toda a amostra foi transferida para um tubo cônico e após centrifugação o sedimento foi analisado prontamente. As biópsias testiculares foram classificadas como hipoespermato gênese, parada de maturação e *Sertoli cell-only syndrome*.

Resultados: Os resultados mostraram que em 13 indivíduos com diagnóstico de azoospermia não-obstrutiva foram encontrados espermatozóides no ejaculado. O achado histológico mais frequente foi na parada de maturação (46,16%), seguido por hipoespermato gênese (23,08%). **Conclusão:** Em situações clínicas em que o diagnóstico inicial é azoospermia não-obstrutiva, uma análise seminal simples de rotina, não é suficiente para confirmar este diagnóstico e análise dos sedimentos centrifugados pode ter consequências clínicas relevantes. A histologia testicular não pode ser usada como o mais viável preditor de recuperação bem sucedida de espermatozóides no ejaculado. O nível de FSH sérico não teve relação significativa para o sucesso de recuperação de espermatozóides.

Palavras-chave: sêmen, azoospermia, infertilidade masculina.

ABSTRACT

Objective: To search and to identify spermatozoa, present in the ejaculate of non-obstructive azoospermic patients. Serum follicle stimulating hormone (FSH) level and testicular histology were examined as positive predictive factors for sperm recovery.

Materials and Methods: 60 patients, aged between 20 and 50 years, with initial diagnosis compatible with non-obstructive azoospermia, underwent up to 2 seminal samples, with assessment of macroscopic and microscop-

pic parameters differentiated for each sample.

In the absence of spermatozoa, the entire sample was transferred to a conic tube and following centrifugation the sediment was freshly analyzed. Testis biopsy were categorized as hypospermatogenesis, maturation arrest and Sertoli cell-only syndrome.

Results: The results showed that in 13 individuals diagnosed with non-obstructive azoospermia were found sperm in ejaculate. The most frequent testicular histological finding was maturation arrest (46,16%), followed by hypospermatogenesis (23,08%).

Conclusion: In clinical situations where the initial diagnosis is non-obstructive azoospermia, one single routine seminal analysis is not enough to confirm this diagnosis and the analysis of the centrifuged sediment can have relevant clinical consequences. Testicular histology can not be used as the most reliable predictor of successful sperm recovery. Serum FSH level has no significant relationship to successful sperm retrieval.

Key-words: semen, azoospermia, male infertility.

INTRODUÇÃO

O fator masculino é responsável por um terço dos casos de infertilidade, enquanto 20% das causas são imputadas conjuntamente à mulher e ao homem. Antes de 1992 a infertilidade masculina era considerada quase que intratável em muitos casos. Com o aparecimento da injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI) foi possível solucionar de forma eficaz grande parte destes casos, através da utilização de um número reduzido de espermatozóides obtidos do ejaculado (Jaffe & Jewelewicz, 1991; Palermo et al., 1992).

A azoospermia não-obstrutiva é a ausência de espermatozóides no ejaculado seminal devido à deficiência de produção de espermatozóides, sendo identificada em 12% dos homens inférteis. Nestes pacientes as principais alterações histológicas detectadas na biópsia testicular são a esclerose tubular e a *Sertoli cell-only syndrome* (11- 20%), parada de maturação da espermatogênese (4 a 40%) e hipoespermato gênese (50%), sendo que nos casos de aplasia de células germinativas ou parada de maturação, espermatogênese focal pode estar presente (Ubaldi et al., 1999; Arent et al., 2006).

Inicialmente espermatozoides do ejaculado eram utilizados e após espermatozoides do epididimo e, finalmente, em 1993 foi demonstrado que com espermatozoides extraídos do parênquima testicular era possível a fertilização de ovulos e obtenção de gestação em pacientes com azoospermia obstrutiva e posteriormente este achado foi confirmado também em pacientes com azoospermia não-obstrutiva (Schoysman et al., 1993).

Antigamente, a biópsia testicular era usada particularmente, como meio de diagnóstico diferencial entre as azoospermias não-obstrutiva e a obstrutiva, mas passou a ter papel importante na recuperação de espermatozoides baseada no conhecimento, descrito por Levin em 1979, da presença de áreas de espermatogênese em pacientes com aplasia de células germinativas, parada de maturação e hipoespermatogênese, ou seja, existência de espermatozoides nos testículos dos pacientes azoospermicos (Tournaye et al., 1997).

Entretanto, sabemos ainda muito pouco em quais homens com azoospermia não-obstrutiva iremos encontrar espermatozoides pelas técnicas de recuperação existentes. A literatura mundial procura buscar qual seria o melhor e mais fidedigno fator preditivo para o encontro de espermatozoides nestes pacientes. Em muitos indivíduos ocorre um quadro de espermatogênese focal e não disseminada por todo o testículo. Existem casos de espermatozoides serem encontrados em um testículo, mas não no contralateral (Turek et al., 1997).

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado no período de janeiro de 2007 a junho de 2008. Para tal, 60 pacientes com idade de 20 a 50 anos, com diagnóstico inicial de azoospermia foram avaliados. A histologia foi classificada em quatro categorias: hipoespermatogênese, *Sertoli Cell- Only Syndrome*, parada de maturação espermática e esclerose tubular. Os patologistas não possuíam qualquer informação quanto às características do caso ou quanto ao resultado do achado de espermatozoides no laboratório de biologia da reprodução. O critério para enquadramento funcional foi realizado via biópsia testicular. A dosagem de FSH (hormônio folículo-estimulante) foi realizada em todos os indivíduos. Todos os indivíduos participantes deste estudo realizaram duas análises seminais com intervalo médio de 15 dias. A abstinência sexual variou de 2 a 3 dias. O sêmen foi coletado em frasco de propileno de 10,0 mL (J. LAB®). Os critérios de análise seminal obedeceram ao manual de laboratório para análise de sêmen da Organização Mundial de Saúde (OMS, 1999). Os seguintes parâmetros foram analisados: coagulação, cor, tempo de liquefação, volume, viscosidade e pH.

As amostras foram submetidas à liquefação a 37°C por 30 minutos, sendo avaliados os seguintes parâmetros seminais: volume seminal, percentual de motilidade espermática e concentração total de espermatozoides móveis. O volume do ejaculado foi medido por aspiração de toda a amostra com o auxílio de uma pipeta graduada acoplada a um pipetador eletrônico. Após misturar cuidadosamente a amostra seminal por completo, com o auxílio de um aparelho misturador de amostras, as mesmas foram avaliadas manualmente pelo pesquisador. Para cada mensuração, uma alíquota liquefeita de 5 µL foi inserida em uma câmara de contagem Microcell®, descar-

tável, com 20 µm de profundidade até seu preenchimento integral, com o auxílio de uma pipeta de pressão positiva para determinação da concentração e motilidade espermáticas. Estas foram analisadas manualmente, com o uso de um microscópio óptico equipado com uma objetiva de contraste de fase.

Dois esfregaços de cada amostra foram preparados em lâminas de microscopia para serem utilizados em técnica de coloração. Para a realização do presente estudo, utilizou-se apenas um método de coloração, o Diff-Quick® (Baxter Healthcare Corporation, Inc.). Após a lâmina ter secado ao ar ambiente, a mesma foi identificada e catalogada. Esta lâmina, então, foi imersa (1,8 mg/L de corante triarylmétano, 100% PDC [corante puro] em álcool metílico) cinco vezes, por um segundo a cada vez, com um intervalo de um segundo entre cada imersão. Após aproximadamente 15 minutos, a lâmina já estava seca, para dar início à próxima etapa da coloração, e ser imersa na solução I (1 g/L de corante xanthene 100% PDC, tampão e ácido de sódio (0,01%)) por três vezes, por um segundo a cada vez, com intervalo de um segundo. O excesso do corante foi retirado e, imediatamente, a lâmina imersa na solução II (1,25 g/L corante de tiazina, 100% PDC (0,625g/L azure A e 0,625 g/L azul de metileno)) por cinco vezes, por um segundo a cada vez, com intervalo de um segundo. A lâmina foi lavada em água deionizada para remover qualquer excesso de corante; deixou-se a lâmina corada em local apropriado para secar (suporte de lâminas).

RESULTADOS

Os resultados mostraram que em 13 (21,6%) indivíduos com diagnóstico de azoospermia não-obstrutiva foram encontrados espermatozoides no ejaculado (Tabela 1). O quadro de parada de maturação correspondeu a 46,16% dos achados, seguido da hipoespermatogênese com 23,08% e esclerose tubular e *Sertoli cell- only syndrome* com 15,38% cada. Não ocorreu correlação entre o achado anátomo-patológico e o número de espermatozoides encontrados no ejaculado, bem como em relação aos níveis de FSH.

Tabela 1. Achados de espermatozoides em indivíduos com diagnóstico de azoospermia não-obstrutiva (pm (parada de maturação), sc-os (Sertoli cell- only syndrome), he (hipoespermatogênese), et (esclerose tubular)).

| indivíduo | idade | FSH | no. espermatozoides encontrados | histologia |
|-----------|-------|------|---------------------------------|------------|
| 1 | 48 | 44,2 | 05 | pm |
| 2 | 49 | 42,7 | 06 | he |
| 3 | 50 | 44,8 | 12 | he |
| 4 | 50 | 62,0 | 24 | et |
| 5 | 50 | 44,6 | 17 | pm |
| 6 | 48 | 40 | 05 | pm |
| 7 | 36 | 12,0 | 04 | he |
| 8 | 50 | 10,8 | 10 | pm |
| 9 | 41 | 16,0 | 16 | et |

continua >

| continuação > | | | | |
|---------------|----|------|----|-------|
| 10 | 50 | 54,0 | 15 | pm |
| 11 | 48 | 11,7 | 29 | sc-os |
| 12 | 47 | 52,0 | 20 | sc-os |
| 13 | 45 | 52,0 | 34 | pm |

DISCUSSÃO

Estes resultados trazem a questão de por que espermatozoides podem ser encontrados em pacientes com azoospermia não-obstrutiva em que previamente uma biópsia testicular havia declarado ausência de espermatozoides (aplasia germinativa, parada de maturação). Na realidade, espermatogênese focal pode ocorrer nestes indivíduos. Além disso, durante os procedimentos de fertilização *in vitro* se procura minuciosamente por espermatozoides, usando, algumas vezes, microscópio com campos de aumento superiores aos utilizados na avaliação histopatológica. Também se deve considerar que na biópsia testicular diagnóstica muitas vezes apenas um fragmento de testículo é retirado enquanto nos procedimentos de fertilização se retiram amostras de tecido até que espermatozoides sejam encontrados ou até que toda superfície testicular tenha sido avaliada (Silber et al., 1995; Houwen et al., 2008).

Tournaye et al., 1996 sugerem que esta diferença na fertilização ocorra porque nos pacientes com parada de maturação e com aplasia germinativa menos espermatozoides móveis são obtidos para a inseminação. No estudo de Nagy et al., 1998 a taxa de fertilização foi significativamente inferior quando foram utilizados espermatozoides imóveis para inseminação ($p = 0,006$).

Os procedimentos de obtenção de espermatozoides podem não apresentar sucesso, principalmente nos pacientes portadores de azoospermia não-obstrutiva ocorrendo falha em obter espermatozoides em até 50% dos casos (Mulhall et al., 1997; Ezeh et al., 1998).

Testes de rastreamento devem possuir alta sensibilidade para incluir todos os casos da doença e baixos níveis de falso-negativos, evitando a perda de casos. Autores recomendavam que o FSH fosse utilizado como marcador da presença de espermatogênese, sendo utilizado como fator de triagem. Outros autores não conseguiram identificar o FSH como um fator preditivo adequado do achado de espermatozoides. Recentes relatos procuram associar a inibina – B como um útil marcador da espermatogênese e demonstram que a produção de inibina-B somente estaria presente quando houvesse atividade espermatogênica. Outros autores revelaram que apesar da melhor sensibilidade, a inibina B não possuiria capacidade de prever o achado de espermatozoides em casos de azoospermia não-obstrutiva (Von Eckardstein et al., 1999; Ballescá et al., 2000).

Apesar da avaliação histológica possuir uma boa correlação com o achado de espermatozoides como demonstrado em alguns trabalhos, não possui nenhuma das outras características aventadas. Além disso, não possui valor para os pacientes em início de avaliação, que não foram submetidos a nenhum procedimento cirúrgico testicular e, portanto, não possui o resultado da avaliação histológica previamente a realização de um procedimento de obtenção de espermatozoides. Os parâmetros histológicos muitas vezes falham em prever o resultado da biópsia, pois mesmo a ausência de espermatozoides em uma biópsia prévia não garante que

múltiplas biópsias sejam capazes de obter espermatozoides. Muitas vezes, focos de espermatogênese podem estar presentes, independente e parâmetros histológicos e clínicos (Mulhall et al., 1997).

Parâmetros convencionalmente associados à espermatogênese, como o hormônio folículo estimulante (FSH) e o volume testicular, individualmente têm falhado em discriminar os pacientes que terão sucesso ou falha na recuperação espermática (Tournaye et al. 1996, 1997, Mulhall et al. 1997). Quando avaliados em conjunto por Ezeh et al. em dois trabalhos (1998, 1999) e por Seo & Ko (2001) também não se observa diferença estatística entre os dois grupos de pacientes. Hauser et al. (2002) avaliaram a correlação entre volume e consistência testicular, dosagens de FSH, LH, prolactina e testosterona com a presença de espermatozoides e não encontraram diferença estatística entre os grupos, concluindo que nenhum destes parâmetros servem como fatores preditivos.

Uma abordagem interessante da histologia testicular foi preconizada por Johnsen em 1970, o chamado *escore Johnsen*. Este escore pontua de 1-10 a presença ou ausência de células germinativas em cada túbulo avaliado na anatomia patológica, organizando-os por ordem de maturidade. Escore 10, 9 ou 8 – presença de espermatozoides, 7 ou 6 – presença de espermátides, 5, 4 ou 3 – presença de espermátócitos ou espermatogônia e 2 ou 1 – presença de apenas células de Sertoli. Tornou-se o método clínico mais popular de quantificação da espermatogênese. Alguns estudos demonstraram a excelente correlação entre o número de espermátides maduras por túbulo seminífero e a concentração espermática do ejaculado (Silber e Rodriguez-Rigau 1981 ou a recuperação de espermatozoides testiculares (Silber et al. 1996a; Silber et al., 1996b; Ezeh et al. 1998). Silber et al. (1997) demonstraram que a presença de espermátide no fragmento da biópsia prévia ao emprego da ICSI correlaciona-se com achado de espermatozoides, em 85% dos casos, e que, por outro lado, a ausência é associada a 95% de ausência de espermatozoides, quando da TESE/ICSI. Ezeh et al. (1999) demonstraram que a visualização de espermátides prediz corretamente a extração de espermatozoides em 77% e o escore de Johnsen em 71%, considerando-os como as variáveis mais objetivas na análise preditiva. Contudo, a falha em visualizar as espermátides na análise histológica não exclui a espermatogênese em outro foco testicular não retirado ou incluído no espécime histopatológico.

O padrão da histologia é o fator preditivo mais aceito e comprovado na literatura quanto à recuperação de espermatozoides testiculares nos pacientes com azoospermia não-obstrutiva. Quando o padrão histológico é comparado aos demais fatores já citados, demonstra ser superior na predição (Ezeh et al. 1998, 1999). Entre os padrões histológicos, o de melhor prognóstico é a hipoespermatoogênese com 89,2% de encontro dos espermatozoides, seguido da parada de maturação com 62,5% e síndrome de células de Sertoli com 16,3% (Seo & Ko 2001). Com valores diferentes, mas demonstrando mesma tendência, Jow et al. (1993) mostraram 54% de encontro de espermatozoides na hipoespermatoogênese, 33% na parada de maturação e nenhum espermatozoide encontrado nos nove pacientes com síndrome de células de Sertoli.

Em nosso estudo não se observou correlação entre o número de espermatozoides no ejaculado e o achado da histologia testicular. Isso mostra a dificuldade de se estabelecer

um padrão para encontrar espermatozoides no ejaculado e mesmo na biópsia testicular em indivíduos azoospermicos não-obstrutivos.

Marcadores teciduais são proteínas celulares que ganharam grande importância em várias áreas da ciência médica. Em infertilidade não podia ser diferente, começou-se a estudar marcadores como forma de prever o encontro de espermatozoides nos testículos de homens com azoospermia não-obstrutiva. Dentre estes, a inibina B, foi um dos mais estudados até o momento. A inibina B é um produto direto das células de Sertoli e serve como marcador da espermatogênese, por isto acreditava-se ser um excelente fator preditivo para o encontro de espermatozoides. Entretanto, Vernaev et al. (2002) demonstraram que este marcador falha em prever a presença de espermatozoides nos testículos de pacientes com este tipo de azoospermia. Neste estudo, os autores demonstraram que em 50% dos pacientes onde não foram encontrados espermatozoides, o nível de inibina B, era maior do que naqueles onde foram encontrados espermatozoides.

Neste campo, foi publicado, recentemente, o resumo de um trabalho que parece uma nova perspectiva em relação à predição do encontro de espermatozoides. Fujita et al. (2005) estudaram dois marcadores chamados de stem cell factor (SCF) e glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). Relataram que nos pacientes que possuíam intensa expressão imunohistoquímica de SCF, com expressão negativa de GDNF, foram encontrados espermatozoides em 100% deles.

Este dado, no momento, parece ser um excelente fator preditivo para se encontrar espermatozoides nos pacientes com azoospermia não obstrutiva. Porém, há a necessidade de mais investigações para que haja confirmação. Este artigo mostra que encontrar espermatozoides em pacientes com azoospermia não obstrutiva ainda é um tema que necessita de alguns esclarecimentos, pois existem muitas controvérsias e, até o momento, não há um fator preditivo que possa ser considerado como padrão ouro.

Correspondência:

Prof. Dr. Paulo Franco Taitson
Grupo de Pesquisa Anatomia Funcional do Aparelho Urogenital PUC Minas/CNPq.
Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Av. Dom José Gaspar, 500 prédio 25
Belo Horizonte – Minas Gerais
TEL: (31) 3337-1960

Referências

Arent A, Teloken C, Hartmann A, Badalotti M, Petracco R, Petracco A. Resultados de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides en azoospermia no obstructiva: utilidad de la biopsia testicular previa. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 2006; 57:245-55.

Ballescá JL, Balasch J, Calafell JM, Alvares R, Fábregues F, Osaba MJM, et al. Serum inhibin B determination is predictive of successful testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2000; 15:1734-8.

Ezeh UIO, Moore HDM, Cooke ID. Correlation of testicular sperm extraction with morphological, biophysical and endocrine profiles in men with azoospermia due to primary gonadal failure. *Human Reprod*. 1998; 13:3066-74.

Ezeh UIO, Taub NA, Moore HDM, Cooke ID. Establishment of predictive variables associated with testicular sperm retrieval in men with non-obstructive azoospermia. *Human Reprod*. 1999; 14:1005-12.

Fujita K, Tsujimura A, Takao T, Miygawa Y, Matsumiya K, Koga M, Takeyama M, Fujioka H, Aozasa K, Okuyama A. Expression of inhibin {alpha}, glial cell line-derived neurotrophic factor and stem cell factor

in Sertoli cell-only Syndrome: relation to successful sperm retrieval by microdissection testicular sperm extraction. *Hum Reprod*. 2005; 21: 24-38.

Hauser R, Botchan A, Yogev L, Gamzu R, Ben Yosef D, Lessing JB, Amit A, Yavetz H. Probability of sperm detection in nonobstructive azoospermic men undergoing testicular sperm extraction procedures unrelated to clinical parameters. *Arch Androl*. 2002; 48:301-5.

Houwen J, Lundin K, Soderlund B, Bergh C, Kremer JA, Ekerhovd E. Efficacy of percutaneous needle aspiration and open biopsy for sperm retrieval in men with non-obstructive azoospermia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2008; 87: 1033-8.

Jaffe SB, Jewelewicz R. The basic infertility investigation. *Fertil Steril* 1991; 56:599-613.

Johnsen SG. Testicular biopsy score count a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*. 1970; 1:2-25.

Jow WW, Steckel J, Schlegel PN, Magid MS, Goldstein M. Motile sperm in human testis biopsy specimens. *J Androl*. 1993; 14:194-8.

Levin HS. Testicular biopsy in the study of male infertility. Its current usefulness, histologic techniques, and prospects for the future. *Human Pathol*. 1979; 10:569-84.

Mulhall JP, Burgess CM, Cunningham D, Carson R, Harris D, Oates R. Presence of mature sperm in testicular parenchyma of men with nonobstructive azoospermia: prevalence and predictive factors. *Urol* 1997; 49: 91-7.

Nagy ZP, Joris H, Verheyen G, Tournaye H, Devroey P, Van Steirteghem A. Correlation between motility of testicular spermatozoa, testicular histology and the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13:890-5.

Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem A. Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into a oocyte. *Lancet* 1992; 340:17-8.

Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M, Segal-Bertin G, van de Casseye M. Successful fertilization by testicular spermatozoa in an in-vitro fertilization programme. *Hum Reprod* 1993; 8: 1339-40.

Seo JT, Ko WJ. Predictive factors of successful testicular sperm recovery in non-obstructive azoospermia patients. *Int J Androl*. 2001; 24 (5): 306-10.

Silber SJ, Rodriguez-Rigau LY. Quantitative analysis of testicular biopsy: determination of partial obstruction and prediction of sperm count after surgery for obstruction. *Fertil Steril*. 1981; 36:480-5.

Silber SJ, Nagy Z, Liu J, Tournaye H, Lissens V, Ferenc C, et al. The use of epididymal and testicular spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection: the genetic implication for male infertility. *Hum Reprod* 1995; 10:2031-43.

Silber SJ, van Steirteghem A, Nagy Z, Liu J, Tournaye H, Devroey P. Normal pregnancies resulting from testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection for azoospermia due to maturation arrest. *Fertile Steril*. 1996a; 66: 110-7.

Silber SJ, Nagy Z, Devroey P, Tournaye H, van Steirteghem A. Distribution of spermatogenesis in the testicles of azoospermic men: the presence or absence of spermatids in the testes of men with germinal failure. *Human Reprod*. 1996b; 12:2422-8.

Tournaye HJ, Liu J, Nagy Z, Camus M, Goossens A, Silber S, van Steirteghem AC, Devroey P. Correlation between testicular histology and outcome after intracytoplasmic sperm injection using testicular spermatozoa. *Human Reprod*. 1996; 11:127-32.

Tournaye H, Verheyen G, Nagy Z, Ubaldi F, Goossens A, Silber S, van Steirteghem AC, Devroey P. Are there any predictive factors for successful testicular sperm recovery in a azoospermic patients? *Human Reprod*. 1997; 12:80-6.

Turek PJ, Cha I, Ljung BM. Systematic fine-needle aspiration of the testis: correlation to biopsy and results of organ "mapping" for mature sperm in azoospermic man. *Urology* 1997; 49:743-8.

Ubaldi F, Nagy ZP, Riengi L, Tesarik J, Annibaldo R, Franco G, et al. Reproductive capacity of spermatozoa from men with testicular failure. *Hum Reprod* 1999; 14:2796-800.

Vernaev V, Tournaye H, Schiettecatte J, Verheyen G, Van Steirteghem A, Devroey P. serum inhibin B cannot predict testicular sperm retrieval in patients with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod*. 2002; 17 (4):971-6.

Von Eckardstein S, Simoni M, Bergmann M, Weinbauer GF, Gassner P, Schepers AG, et al. Serum inhibin B in combination with serum follicle-stimulating hormone (FSH) is a more sensitive marker than serum FSH alone for impaired spermatogenesis in men. But cannot predict the presence of sperm in testicular tissue samples. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:2496-501.

World Health Organization. WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4 edition. Cambridge: Cambridge University Press; 1999.

A origem do espermatozóide e a qualidade seminal não influenciam a incidência de clivagem precoce em ciclos de ICSI

The source of the sperm and semen quality does not influence the incidence of early cleavage in ICSI cycles

Edson Borges Jr., M.D., PhD^{1,2}, Fabio Firmbach Pasqualotto, M.D., PhD³, Tatiana Carvalho de Souza Bonetti, M.Sc², Daniela Paes Almeida Ferreira Braga, M.Sc^{1,2}, Assumpto Iaconelli Jr., M.D.^{1,2}

1. Fertility – Centro de Fertilização Assistida

Av. Brigadeiro Luis Antônio, 4545 - São Paulo – SP, Brasil. Cep: 01402-001

2. Instituto Sapientiae– Centro de Educação e Pesquisa em Reprodução Assistida

Rua. Vieira Maciel, 62 - São Paulo – SP, Brasil. Cep: 04503-040

3. Instituto de Biotecnologia - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul – RS

Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130 - Caxias do Sul – RS, Brasil. CEP 95070-560

RESUMO

Objetivo: O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da qualidade seminal e origem dos espermatozóides no desenvolvimento embrionário após a injeção intracitoplasmática de espermatozóides, levando-se em consideração a avaliação da clivagem precoce. **Métodos:** Foram avaliados 175 pacientes submetidos a 193 ciclos de ICSI. Os ciclos foram divididos de acordo com a origem do espermatozóide: (i) sêmen fresco recuperado de paciente normozoospermico, (ii) sêmen fresco recuperado de paciente oligozoospermico, (iii) sêmen fresco recuperado de paciente astenozoospermico, (iv) espermatozóide recuperado do epididimo de paciente com azoospermia obstrutiva e (v) espermatozóide recuperado do testículo de paciente com azoospermia não-obstrutiva. Os parâmetros avaliados foram: taxa de fertilização, incidência de clivagem precoce, taxa de gestação e taxa de abortamento. **Resultados:** A taxa de gestação foi significativamente mais alta, quando no mínimo um embrião com clivagem precoce foi transferido (36% *versus* 23%; com ou sem transferência de embriões com clivagem precoce, respectivamente, $P = 0.05$). Não foram observadas diferenças no número de embriões com clivagem precoce dentre os grupos avaliados. Além disso, a taxa de fertilização normal foi mais alta quando utilizado espermatozóide recuperado de amostra ejaculada quando comparado ao uso espermatozóide epididimário ou testicular. A taxa de abortamento foi mais alta quando espermatozóide testicular foi injetado quando comparado ao uso de espermatozóide recuperado de paciente astenozoospermico. **Conclusões:** A incidência de clivagem precoce não foi influenciada pela origem do espermatozóide. A qualidade e origem do sêmen influenciam a fertilização, porém uma vez formados, embriões originados a partir da injeção de espermatozóides de diversas origens, têm a mesma capacidade de desenvolvimento, resultando em satisfatórias taxas de gestação.

Palavras-chave: infertilidade, fertilização in vitro, espermatozóide, desenvolvimento embrionário, injeção intracitoplasmática de espermatozóide,

ABSTRACT

Purpose: The goal in the present study was to investigate the effect of quality and origin of sperm on embryo development after intracytoplasmic sperm injection (ICSI), taking into account the early cleavage evaluation. **Methods:** It was evaluated 175 patients undergoing 193 ICSI cycles. Cycles/patients were divided according to the origin of sperm in: (i) fresh normal semen, (ii) fresh semen with oligospermia, (iii) fresh semen with asthenospermia, (iv) epididymal sperm from obstructive azoospermia and (v) testicular sperm from non-obstructive azoospermia. We evaluated oocyte fertilization, early-cleaved embryo, pregnancy and miscarriage rates. **Results:** The pregnancy rate was significantly higher when at least one early cleaved embryo was transfer, (36% *versus* 23%; with or without early-cleaved embryos transferred, respectively, $P = 0.05$). No difference was detected in the number of early-cleaved embryos among the groups evaluated. Normal fertilization rate was higher using sperm from the ejaculate compared to epididymal or testicular sperm. Miscarriage rate was higher in the testicular sperm group compared to asthenospermic group. **Conclusions:** The incidence of early-cleaved embryos has not been influenced by origin of spermatozoa. The quality and origin of sperm seems to influence the fertilization rates, since non ejaculated spermatozoa provided lower normal fertilization rates as well as higher fertilization failure; however, once formed, embryos with satisfactory morphology result in satisfactory pregnancy rates.

Keywords: infertility, in vitro fertilization, spermatozoa, embryo development, injection intracytoplasmic sperm injection,

INTRODUÇÃO

A injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI) se tornou o método de escolha para o tratamento de infertilidade por causa masculina (Palermo, Joris et al. 1992). Um pré-requisito para o sucesso da ICSI é o uso de um espermatozóide viável, que suporte a embriogênese após a injeção (Pasqualotto, Rossi-Ferragut et al. 2002; Pasqualotto, Rossi et al. 2005). Motilidade espermática é, sem dúvida, um sinal de viabilidade, porém espermatozóides imóveis não necessariamente representam células mortas (Pasqualotto, Rossi-Ferragut et al. 2002; Pasqualotto, Rossi et al. 2005; Borges, Rossi et al. 2007).

O uso de um único espermatozóide para fertilizar o oócito, exclui a necessidade de alta concentração de espermatozóides no sêmen. De fato, pesquisadores não encontraram qualquer relação entre a concentração espermática e o sucesso da técnica de ICSI (Mansour, Aboulghar et al. 1995).

Após a primeira gestação obtida por ICSI, utilizando-se sêmen de paciente com oligoastenozoospermia grave, a conduta para esse tipo de paciente tem mudado (Palermo, Joris et al. 1992; Van Steirteghem, Nagy et al. 1993). A terapia envolvendo a recuperação cirúrgica de espermatozóides, associada à ICSI, trouxe uma nova esperança para tais pacientes previamente considerados inférteis.

Anteriormente ao advento da ICSI, pacientes com azoospermia obstrutiva (AO) tinham mínimas chances de fertilizar um óvulo e gerar seus próprios filhos. Espermatozóides obtidos por aspiração microcirúrgica do epidídimo (MESA), têm sido utilizados para fertilização *in vitro* (FIV) há mais de 10 anos (Temple-Smith, Southwick et al. 1985). As taxas de fertilização e gestação, quando utilizados espermatozóides obtido por MESA e realizada FIV clássica, são baixas, por volta de 20% e 11%, respectivamente (Silber, Balmaceda et al. 1988; Silber, Nagy et al. 1994). Resultados como esse, enfatizam a importância da maturação espermática e passagem do espermatozóide pelo trato reprodutivo masculino para sua penetração natural no oócito.

Porém, a introdução da micromanipulação para reprodução humana assistida aumentou significativamente as taxas de fertilização quando utilizados espermatozóides epididimários ou testiculares (Schoysman, Vanderzwalmen et al. 1993; Van Steirteghem, Nagy et al. 1998; Pasqualotto, Rossi-Ferragut et al. 2002; Pasqualotto, Rossi et al. 2005). Além disso, a ICSI passou a ser considerada um tratamento efetivo para pacientes com azoospermia de origem não-obstrutiva (ANO). Neste caso os testículos são a única fonte de espermatozóides, de onde podem ser obtidos, quer seja por extração de espermatozóide testicular (TESE) ou aspiração de espermatozóide testicular (TESA) (Tournaye, Camus et al. 1997; Turek, Cha et al. 1997; Belker, Sherins et al. 1998).

Nos últimos anos, inúmeros estudos têm documentado taxas de gestação e fertilização após a ICSI com espermatozóide recuperado dos epidídimos e testículos de pacientes com AO e ANO (Tournaye, Clasen et al. 1998; De Croo, Van der Elst et al. 2000; Friedler, Raziel et al. 2002). Porém, em uma série retrospectiva, demonstramos que as taxas de gestação são significativamente mais baixas em pacientes com ANO quando comparadas

a pacientes com AO (Pasqualotto, Rossi-Ferragut et al. 2002). Devido às contradições em artigos publicados, o que se deve em parte a fatores ligados aos espermatozóides, o impacto da fonte do espermatozóide (testicular vs epididimário) e da etiologia da azoospermia (obstrutiva vs não obstrutiva) na capacidade reprodutiva do espermatozóide ainda não está bem estabelecido.

O critério mais importante para se alcançar o sucesso da ICSI e FIV deve ser o número de tratamentos que resultem no nascimento de bebês saudáveis. Sabe-se que a chance de gestação é diretamente proporcional ao número de embriões transferidos, porém, com o aumento deste número, as chances de gestações múltiplas também aumentam.

A redução da incidência de gestações múltiplas pela transferência de um único embrião (SET) requer a seleção cuidadosa de embriões para a transferência (Salumets, Hyden-Granskog et al. 2003). Diferentes parâmetros de qualidade têm sido descritos na literatura e muitos desses têm se provado eficientes na discriminação de embriões com maior e menor capacidade de implantação (Lundin, Bergh et al. 2001). Um desses parâmetros é o ritmo de clivagem do embrião. De fato, tem sido descrito que a clivagem precoce (CP) tem uma importante correlação com a capacidade de implantação, o que foi recentemente confirmado em estudos onde apenas SET foram realizadas (Lundin, Bergh et al. 2001; Salumets, Suikkari et al. 2002; Salumets, Hyden-Granskog et al. 2003; Giorgetti, Hans et al. 2007).

Um recente estudo demonstrou uma maior taxa de gestação quando transferidos embriões que apresentaram CP quando comparado à transferência de embriões que não apresentaram CP, sugerindo que embriões que apresentam CP apresentam maior potencial de desenvolvimento que embriões de ritmo mais lento de clivagem. Uma importante questão nesse estudo é que o único sinal do efeito paterno precoce é o desenvolvimento do zigoto, morfologia embrionária e velocidade de clivagem (Tesarik 2005).

O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito da qualidade do sêmen (normozoospermia, oligozoospermia e astenozoospermia) e a origem do espermatozóide (testicular ou epididimários) no desenvolvimento embrionário, levando-se em consideração a avaliação do CP.

MÉTODOS

Pacientes

Este estudo foi realizado no período de Janeiro de 2003 à Janeiro de 2005, no Fertility – Centro de Fertilização Assistida, em São Paulo, Brasil. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade de Caxias do Sul e todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre esclarecido, concordando com a utilização dos dados de seus tratamentos para publicação de trabalhos científicos. A fim de avaliar a contribuição da condição do espermatozóide na fertilização, implantação e gestação, foram excluídas pacientes apresentando infertilidade por fator oocitário. Para tal, pacientes com mais de 35 anos e aquelas que tiveram menos de quatro oócitos recuperados após a punção, não foram incluídas no estudo.

Foram selecionadas 175 pacientes, submetidos a 193 ciclos de ICSI, com até 35 anos de idade e pelo menos 4 oócitos recuperados na punção folicular. Os ciclos foram divididos de acordo com a origem do espermatozoide: (A) normozoospermia (96 ciclos, 680 embriões); (B) oligozoospermia (35 ciclos, 337 embriões); (C) asteno-ozoospermia (29 ciclos, 171 embriões); (D) espermatozoide epididimários - AO (11 ciclos, 58 embriões) e (E) espermatozoide testicular - ANO (22 ciclos, 122 embriões). As razões para a realização de ICSI em pacientes normozoospermicos foram infertilidade por fator feminino (obstrução tubária, síndrome do ovário policístico e endometriose) e infertilidade sem causa aparente. As taxas de fertilização, CP, gestação e abortamento foram comparadas entre os grupos.

Estimulação ovariana e recuperação oocitária

O bloqueio hipofisário foi atingido com análogo agonista do Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (Gonadotrophin Releasing Hormone – GnRH, Lupron Kit™, Abbott S.A. Société Française des Laboratoires, Paris, França) seguido por estimulação ovariana controlada, com administração de Hormônio Folículo Estimulante recombinante (recombinant Follicular Stimulationg Hormone – r-FSH, Gonal-F®, Sero- no, Genebra, Suíça) em dose inicial de 225 – 300UI e ajustes de dose de acordo com a resposta de cada paciente. A indução da ovulação foi acompanhada por dosagens séricas de estradiol e ultra-sonografias seriadas; quando o folículo dominante atingiu diâmetro de 18mm ou, pelo menos, dois folículos alcançaram de 16 a 18mm em diâmetro, foram administrados 250µg de Gonadotrofina Coriônica humana recombinante (recombinant human Corionic Gonadotrophin – r-hCG, Ovidrel™, Serono, Genebra, Suíça) para maturação folicular final. A punção folicular foi realizada 34 a 36 horas após a administração do r-hCG. Os oócitos foram incubados em micro-gotas de Fluido de Tuba Uterina Humano (Human Tubal Fluid –HTF, Irvine, EUA), suplementado com 10% de Albumina Sérica Humana (Human Seric Albumin – HSA; Irvine, EUA) não-tamponado, cobertas com 15mL de óleo mineral (Ovol; Vitrolife, Suíça) previamente equilibrado para temperatura e pH. Após 4 horas em cultivo, as células do cumulus foram extraídas. Para tal, os oócitos foram expostos a hialuronidase (gotas de 100µL de meio de cultura Hepes tamponado, contendo 80UI/mL de hialuronidase – Irvine, EUA) por 30 segundos e imediatamente lavados em meio de cultura embrionária. Em seguida, a retirada total das células do complexo cumulus-corona foi realizada mecanicamente através de repetidas pipetagens, utilizando-se pipetas Pasteur de diâmetros decrescentes.

RECUPERAÇÃO CIRÚRGICA DE ESPERMATOZÓIDES

Aspiração de espermatozoides epididimário (PESA)

O procedimento de PESA foi realizado no mesmo dia da punção folicular, sob anestesia local (2mL de lidocaína 1% sem adrenalina no plexo pampiniforme). Resumidamente, a técnica foi realizada da seguinte forma: após a localização do epidídimo, uma agulha de 27 gauge, conec-

tada à seringa de 1mL preenchida com meio de cultura (Hepes – Irvine, EUA), foi introduzida na região proximal do epidídimo e leves sucções foram efetuadas (Figura 2). A amostra recuperada foi colocada em placa de Petri para a busca de espermatozoides através de microscópio óptico em aumento de 400x.

Após a verificação da presença de espermatozoides, a amostra foi lavada, através da adição de meio de cultura (Hepes – Irvine, EUA), e feita a centrifugação a 800g por 20 minutos. O precipitado foi então ressuspenso em 0,5mL de meio de cultura (Hepes – Irvine, EUA) e enviado ao laboratório de FIV para realização da técnica de ICSI-TESA.

Aspiração de espermatozoides testiculares (TESA)

Assim como no PESA, o TESA foi realizado no mesmo dia da punção folicular, sob anestesia local. Para a recuperação de espermatozoides testiculares, o testículo foi imobilizado e a bolsa testicular mantida sob tensão, para que a profundidade da incisão pudesse ser controlada e o epidídimo protegido de lesões.

Com o auxílio de uma agulha de 21 gauge do tipo borboleta, conectada a uma seringa de 5mL, foram realizadas repetidas inserções perpendiculares no pólo superior do testículo, sob pressão negativa, até que um fluido amarelo opaco e/ou tecido fosse visualizado na cânula do sistema. Em seguida, a cânula foi clampeada, a fim de manter a pressão negativa e, com o auxílio de pinças, parte do túbulo seminífero foi retirada.

A amostra recuperada foi colocada em placa de Petri e com auxílio de agulhas, o tecido foi dissecado, seguido da pesquisa de espermatozoides através de microscópio óptico, em aumento de 400x. Após a verificação da presença de espermatozoides, os mesmos foram coletados com pipeta Pasteur e a amostra, lavada, com adição de 2,0mL meio de cultura (Hepes – Irvine, EUA), seguida de centrifugação a 800g por 20 minutos. O precipitado foi então ressuspenso em 0,5mL de meio de cultura (Hepes – Irvine, EUA) e enviado ao laboratório de FIV para realização da técnica de ICSI.

Injeção intracitoplasmática de espermatozoide

A ICSI foi realizada em oócitos em metáfase II, de acordo com a técnica-padrão descrita por Palermo e cols. (1992). Todos os procedimentos de ICSI foram realizados pelo mesmo embriologista e após a injeção, cada oócito foi colocado em uma gota de 100µL de meio de cultura embrionária, cobertas com 5mL de óleo previamente equilibrado para temperatura e pH. Após 18-20 horas a fertilização foi verificada pela presença de dois pró-núcleos distintos e ainda no primeiro dia de desenvolvimento, de 26 a 30 horas após a ICSI, os embriões foram novamente analisados para checagem da CP. A presença de duas células determinou a ocorrência da CP.

A transferência embrionária foi realizada 72 horas após a ICSI e classificações morfológicas em relação ao número de células, multinucleação, simetria dos blastômeros e porcentagem de fragmentação foram os principais parâmetros avaliados.

Análise estatística

Para a análise estatística, as médias e desvios padrões (DP) foram calculados a partir dos dados brutos. Devido aos dados não apresentarem distribuição normal, os mesmos foram submetidos à transformação logarítmica antes da aplicação dos testes estatísticos. Utilizou-se análise de variância (ANOVA), e significância estatística foi considerada quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

Não foi observada qualquer diferença entre os grupos em relação à idade paterna ou idade materna (Tabela I). A taxa de fertilização normal foi mais baixa no grupo em que espermatozóides testiculares foram usados (63,91%) quando comparado ao grupo de pacientes normozoospermicos (78,85%; $P=0,03$) e astenozoospermicos (80,67%; $P=0,048$) (Tabela II).

A taxa de fertilização anormal foi mais alta no grupo epididimário (19,48%), quando comparado a qualquer dos três grupos de espermatozóides ejaculados, normozoospermicos (9,98%; $P=0,04$), oligozoospermicos (9,54%; $P=0,04$) e astenozoospermicos (6,50%; $P = 0,003$). Entretanto, a falha de fertilização foi mais alta quando espermatozóide testicular foi utilizado (24,39%), comparada ao grupo de normozoospermicos (11,17; $P=0,01$). Em relação a CP, ainda que a porcentagem de embriões apresentando CP tenha sido mais alta no grupo de pacientes normozoospermicos, não foi detectada diferença estatística entre os grupos. Além disso, o número de embriões transferidos, foi similar entre os grupos, assim como a taxa de implantação (Tabela II).

Não foram detectadas diferenças estatísticas nas taxas de gestação dos grupos estudados, porém, as taxas de abortamento foram mais altas no grupo onde espermatozóide testicular foi utilizado quando comparado ao outros grupos, apesar da diferença estatisticamente significativa ter sido observada apenas entre grupo testicular e astenozoospermicos (83,3% vs 0%; $P=0,020$) (Tabela II).

A incidência de gestação múltipla também não diferiu entre os grupos.

Um total de 1368 embriões normalmente fertilizados foi avaliado, e CP foi observada em 29,5%. Destes, 76,7% foram selecionados para transferência. A taxa de gestação continuada no grupo total foi de 29,0%, entretanto, nos ciclos em que pelo menos um embrião com EC foi transferido, a taxa de gestação continuada foi significativamente maior (36%), do que nos ciclos onde não foram transferidos embriões com EC (23%; $P=0,05$).

DISCUSSÃO

As taxas de gestação obtidas após a ICSI são iguais, se não mais altas, que as taxas de fecundidade natural. Para a ICSI ocorrer, a única necessidade é a introdução do material genético masculino no ooplasma, que pode ser oriundo de espermatozóides móveis, pouco móveis e imóveis de amostras de sêmen ejaculadas, ou de pacientes azoospermicos, quando é obtido por aspiração epididimária ou diretamente dos túbulos seminíferos (Pasqualotto, Rossi-Ferragut et al. 2002; Pasqualotto, Rossi et al. 2005).

Em 1985 a MESA associada à ICSI, para casos de AO

por agenesia bilateral dos vasos deferentes foi introduzida (Temple-Smith, Southwick et al. 1985). Então, muitos pacientes com diversas patologias, que levam a deficiência na produção de espermatozóides, puderam ter a opção de realizar tratamento de reprodução assistida. Com as altas taxas de fertilização e gestação obtidas com a ICSI, essa tecnologia é agora utilizada rotineiramente com intuito de melhorar os resultados da FIV após a extração ou aspiração de espermatozóide epididimário (Van Peperstraten, Proctor et al. 2006).

A ICSI também permite que pacientes com determinadas patologias tenham seus próprios filhos, como no caso hipogonadismo-hipogonadotrófico, onde é possível recuperar apenas um pequeno número de espermatozóides dos testículos. Aparentemente esses pacientes apresentam pequenos focos de espermatogênese nos testículos, ainda que permaneçam azoospermicos (Silber, Nagy et al. 1997).

Uma vez que, mesmo pacientes apresentando oligoastenozoospermia tenham um número adequado de espermatozóides no ejaculado que permitam a realização da ICSI, uma questão pertinente seria o quanto a origem do espermatozóide influenciaria nos resultados da ICSI.

Um estudo retrospectivo anterior mostrou que tanto espermatozóides recuperados do ejaculado de pacientes com fator masculino de infertilidade, quanto espermatozóides epididimários ou testiculares recuperados de pacientes com AO levam a taxas de fertilização e gestação similares. Além disso, esses autores mostraram que quando utilizados espermatozóides testiculares recuperados de pacientes com ANO, as taxas de fertilização e gestação foram inferiores. Por outro lado, quando utilizados espermatozóides recuperados do ejaculado de pacientes com análise seminal dentro dos parâmetros de normalidade, tais taxas foram significativamente mais altas (Aboulghar, Mansour et al. 1997).

Independentemente da origem do espermatozóide, sabe-se que para aumentar as chances de gestação durante tratamentos de reprodução humana assistida, é importante identificar embriões com maior potencial de implantação. Embriões que se dividem mais rapidamente após a inseminação têm maior potencial de implantação (Isiklar, Mercan et al. 2002; Wharf, Dimitrakopoulos et al. 2004). A avaliação da CP é rápida e objetiva, e traz informações que podem ser usadas para discriminar dentre embriões morfológicamente equivalente, aqueles com maior potencial de implantação.

Um estudo prévio demonstrou que transferência de embriões com CP resulta em maiores taxas de implantação do que transferência de embriões sem CP. Nesse estudo, em transferências onde 100% dos embriões transferidos apresentavam CP, um menor número de embriões transferidos resultou em maior implantação do que quando embriões sem CP também foram transferidos, indicando que a CP aumenta a chance de implantação após a ICSI (Ciray, Ulug et al. 2004).

Um outro estudo sugeriu que o desenvolvimento embrionário inicial é inversamente relacionado ao acometimento da espermatogênese (anomalias meióticas e/ou concentração seminal $< \text{ou} = 1 \times 10^6/\text{mL}$) (Vendrell, Aran et al. 2003). Em um trabalho mais recente, foram analisados

Tabela I. Idade, e características laboratoriais nos diferentes grupos de estudo

| Grupos | Normo-zoospermia | Oligo-zoospermia | Asteno-zoospermia | Epididimário | Testicular | P |
|---|--------------------|-------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|-------|
| N | 96 | 35 | 29 | 11 | 22 | ---- |
| Idade – anos (média±DP) | 32,55 ± 2,52 | 30,29 ± 1,29 | 30,12 ± 2,84 | 29,34 ± 3,16 | 31,20 ± 1,25 | 0,619 |
| Nº oócitos recuperados (média±DP) | 12,86 ± 7,87 | 15,53 ± 9,66 | 12,32 ± 7,82 | 7,67 ± 2,65 | 15,89 ± 9,08 | 0,061 |
| Taxa de fertilização normal (%) | 78,8 ^a | 73,42 | 80,67 ^{b, c} | 66,05 ^c | 63,91 ^{a, b} | 0,009 |
| Taxa de fertilização anormal (%) | 9,98 ^d | 9,54 ^e | 6,50 ^f | 19,48 ^{d, e, f} | 11,70 | 0,121 |
| Taxa de falha de fertilização (%) | 11,17 ^g | 17,04 | 12,83 | 14,47 | 24,39 ^g | 0,018 |
| Tempo entre punção e avaliação da CP (média±DP) | 26,02 ± 1,23 | 25,84 ± 0,99 | 25,95 ± 0,98 | 25,64 ± 1,12 | 25,55 ± 1,07 | 0,418 |
| Porcentagem de embriões com CP | 43,0 | 29,8 | 27,5 | 24,4 | 30,1 | 0,909 |

CP: Clivagem precoce

a: P=0,03; b: P=0,03; c: P=0,048; d: P=0,04; e: P=0,04; f: P=0,03; g: P=0,01

Tabela II. Resultados clínicos de acordo com os diferentes grupos avaliados

| Grupos | Normo-zoospermia | Oligo-zoospermia | Asteno-zoospermia | Epididimário | Testicular | P |
|--|------------------|------------------|-------------------|--------------|-------------------|-------|
| N | 96 | 35 | 29 | 11 | 22 | ---- |
| Nº de embriões transferidos (média±DP) | 3,4 ± 1,2 | 3,7 ± 1,2 | 3,4 ± 1,4 | 3,6 ± 0,9 | 3,2 ± 1,3 | 0,451 |
| Taxa de implantação (%) | 14,6 | 13,8 | 12,7 | 18,4 | 17,3 | 0,918 |
| Taxa de gestação continuada (%) | 25,0 | 37,1 | 31,0 | 36,4 | 27,3 | 0,170 |
| Taxa de aborto (%) | 29,4 | 23,5 | 0,0 ^a | 20,0 | 83,3 ^a | 0,228 |
| Taxa de gestação múltipla (%) | 32,4 | 11,8 | 44,4 | 20,0 | 27,3 | 0,378 |

a: P=0,02

1020 embriões produzidos a partir de 219 ciclos de ICSI e foi observada uma relação negativa entre a qualidade seminal e o desenvolvimento embrionário, mesmo anteriormente à ativação do genoma embrionário, sugerindo que o espermatozóide possa afetar a embriogênese a partir de estágios bem precoces (Loutradi, Tarlatzis et al. 2006).

Ainda que, no presente estudo, não tenha sido observada qualquer diferença no número de embriões normalmente fertilizados, a taxa de falha de fertilização foi mais alta quando utilizados espermatozoides testiculares quando comparado ao grupo de pacientes normozoospermicos. Esse fato, pode ter acontecido devido ao grave acometimento da espermatogênese, e às vezes até falência testicular, em casos de ANO (Martin, Greene et al. 2000).

Pacientes com ANO, podem apresentar defeitos genéticos, e seria de se esperar que, apesar de serem recuperados espermatozoides viáveis de pacientes com ANO, as taxas de gestação fossem significativamente mais baixas que àquelas atingidas, quando recuperados espermatozoides de pacientes normozoospermicos.

Por outro lado, a taxa de fertilização anormal foi mais alta quando utilizados espermatozoides epididimários do que quando utilizados espermatozoides recuperados do ejaculado. Porém não foi observada diferença quando comparada

a utilização de espermatozóide epididimário vs testicular.

Ainda que a porcentagem de embriões que apresentaram CP tenha sido mais alta no grupo de pacientes normozoospermicos, não foram detectadas diferenças estatísticas no número de embriões com CP nos diferentes grupos de estudo. Além disso, não houve diferença na taxa de implantação entre os grupos.

Para demonstrar a importância da CP, os casos foram divididos em aqueles em que pelo menos um embrião com CP foi transferido e aqueles em que apenas embriões que não apresentaram CP foram transferidos, e observamos que na primeira situação a taxa de gestação continuada foi significativamente mais alta.

Ainda que não tenham sido detectadas diferenças nas taxas de gestação nos diferentes grupos de estudo, como seria de se esperar, a taxa de aborto foi mais alta no grupo do espermatozóide testicular.

Em conclusão, nossos achados sugerem que a incidência da CP não é influenciada pela origem do espermatozóide ou qualidade do sêmen, e que uma vez fertilizados os embriões se desenvolvem satisfatoriamente e resultam em gestação. Por outro lado, mesmo com um pequeno número de casos, pudemos concluir que a transferência de embriões com CP aumenta as taxas de gestação.

Correspondências:

Edson Borges Jr.
Fertility – Centro de Fertilização Assistida
Avenida Brigadeiro Luís Antônio, 4545, São Paulo, SP, Brasil
Tel: (11) 3885-9858 / email:edson@fertility.com.br

Referências Bibliográficas

- Aboulghar, M. A., R. T. Mansour, et al. (1997). "Fertilization and pregnancy rates after intracytoplasmic sperm injection using ejaculate semen and surgically retrieved sperm." *Fertil Steril* **68**(1): 108-11.
- Belker, A. M., R. J. Sherins, et al. (1998). "Percutaneous testicular sperm aspiration: a convenient and effective office procedure to retrieve sperm for in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection." *J Urol* **160**(6 Pt 1): 2058-62.
- Borges, E., Jr., L. M. Rossi, et al. (2007). «Fertilization and pregnancy outcome after intracytoplasmic injection with fresh or cryopreserved ejaculated spermatozoa.» *Fertil Steril* **87**(2): 316-20.
- Ciray, H. N., U. Ulug, et al. (2004). "Transfer of early-cleaved embryos increases implantation rate in patients undergoing ovarian stimulation and ICSI-embryo transfer." *Reprod Biomed Online* **8**(2): 219-23.
- De Croo, I., J. Van der Elst, et al. (2000). «Fertilization, pregnancy and embryo implantation rates after ICSI in cases of obstructive and non-obstructive azoospermia.» *Hum Reprod* **15**(6): 1383-8.
- Friedler, S., A. Raziel, et al. (2002). "Factors influencing the outcome of ICSI in patients with obstructive and non-obstructive azoospermia: a comparative study." *Hum Reprod* **17**(12): 3114-21.
- Giorgetti, C., E. Hans, et al. (2007). "Early cleavage: an additional predictor of high implantation rate following elective single embryo transfer." *Reprod Biomed Online* **14**(1): 85-91.
- Isiklar, A., R. Mercan, et al. (2002). "Early cleavage of human embryos to the two-cell stage. A simple, effective indicator of implantation and pregnancy in intracytoplasmic sperm injection." *J Reprod Med* **47**(7): 540-4.
- Loutradi, K. E., B. C. Tarlatzis, et al. (2006). «The effects of sperm quality on embryo development after intracytoplasmic sperm injection.» *J Assist Reprod Genet* **23**(2): 69-74.
- Lundin, K., C. Bergh, et al. (2001). "Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF." *Hum Reprod* **16**(12): 2652-7.
- Mansour, R. T., M. A. Aboulghar, et al. (1995). «The effect of sperm parameters on the outcome of intracytoplasmic sperm injection.» *Fertil Steril* **64**(5): 982-6.
- Martin, R. H., C. Greene, et al. (2000). "Chromosome analysis of spermatozoa extracted from testes of men with non-obstructive azoospermia." *Hum Reprod* **15**(5): 1121-4.
- Palermo, G., H. Joris, et al. (1992). "Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte." *Lancet* **340**(8810): 17-8.
- Pasqualotto, F. F., L. M. Rossi-Ferragut, et al. (2002). "Outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic injection of epididymal and testicular sperm obtained from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia." *J Urol* **167**(4): 1753-6.
- Pasqualotto, F. F., L. M. Rossi, et al. (2005). "Etiology-specific outcomes of intracytoplasmic sperm injection in azoospermic patients." *Fertil Steril* **83**(3): 606-11.
- Salumets, A., C. Hyden-Granskog, et al. (2003). "Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures." *Hum Reprod* **18**(4): 821-5.
- Salumets, A., A. M. Suikkari, et al. (2002). "Influence of oocytes and spermatozoa on early embryonic development." *Fertil Steril* **78**(5): 1082-7.
- Schoysman, R., P. Vanderzwalmen, et al. (1993). "Pregnancy after fertilisation with human testicular spermatozoa." *Lancet* **342**(8881): 1237.
- Silber, S. J., J. Balmaceda, et al. (1988). "Pregnancy with sperm aspiration from the proximal head of the epididymis: a new treatment for congenital absence of the vas deferens." *Fertil Steril* **50**(3): 525-8.
- Silber, S. J., Z. Nagy, et al. (1997). "Distribution of spermatogenesis in the testicles of azoospermic men: the presence or absence of spermatids in the testes of men with germinal failure." *Hum Reprod* **12**(11): 2422-8.
- Silber, S. J., Z. P. Nagy, et al. (1994). "Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration." *Hum Reprod* **9**(9): 1705-9.
- Temple-Smith, P. D., G. J. Southwick, et al. (1985). "Human pregnancy by in vitro fertilization (IVF) using sperm aspirated from the epididymis." *J In Vitro Fert Embryo Transf* **2**(3): 119-22.
- Tesarik, J. (2005). "Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo." *Reprod Biomed Online* **10**(3): 370-5.
- Tournaye, H., M. Camus, et al. (1997). "Surgical sperm retrieval for intracytoplasmic sperm injection." *Int J Androl* **20** Suppl 3: 69-73.
- Tournaye, H., K. Clasen, et al. (1998). «Fine needle aspiration versus open biopsy for testicular sperm recovery: a controlled study in azoospermic patients with normal spermatogenesis.» *Hum Reprod* **13**(4): 901-4.
- Turek, P. J., I. Cha, et al. (1997). "Systematic fine-needle aspiration of the testis: correlation to biopsy and results of organ "mapping" for mature sperm in azoospermic men." *Urology* **49**(5): 743-8.
- Van Peperstraten, A., M. L. Proctor, et al. (2006). "Techniques for surgical retrieval of sperm prior to ICSI for azoospermia." *Cochrane Database Syst Rev* **3**: CD002807.
- Van Steirteghem, A., P. Nagy, et al. (1998). "Results of intracytoplasmic sperm injection with ejaculated, fresh and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa." *Hum Reprod* **13** Suppl 1: 134-42.
- Van Steirteghem, A. C., Z. Nagy, et al. (1993). "High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection." *Hum Reprod* **8**(7): 1061-6.
- Vendrell, J. M., B. Aran, et al. (2003). "Spermatogenic patterns and early embryo development after intracytoplasmic sperm injection in severe oligoasthenozoospermia." *J Assist Reprod Genet* **20**(3): 106-12.
- Wharf, E., A. Dimitrakopoulos, et al. (2004). «Early embryo development is an indicator of implantation potential.» *Reprod Biomed Online* **8**(2): 212-8.

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



Conheça a Red-Lara www.redlara.com

MAIO

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

JUNHO

5 a 6/06 - Joint Meeting ALMER (Ex-FLASEF) - ASRM - REDLARA Advances in Reproductive Medicine

Mercure Grand Hotel International - Foz do Iguaçu - PR

Plenarium Organização de Eventos

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

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

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



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

GONAL-® – alafaltropina hormônio folículo estimulante recombinante (r-hFSH) – Para uso subcutâneo – USO ADULTO. **Composição e apresentações:** GONAL-® 300 UI/0,5 mL: 1 injetor contendo 0,5 mL de alafaltropina e 5 agulhas; GONAL-® 450 UI/0,75 mL: 1 injetor contendo 0,75 mL de alafaltropina e 7 agulhas; GONAL-® 900 UI/1,5 mL: 1 injetor contendo 1,5 mL de alafaltropina e 14 agulhas. **Indicações:** (I) Anovulação (incluindo Síndrome do Ovário Policístico) em mulheres que não responderam ao tratamento com citrato de clomifeno. (II) Para o estímulo do desenvolvimento multifollicular em pacientes submetidas à superovulação em técnicas de reprodução assistida (TRA). (III) Em associação com hormônio luteinizante (LH) para a estimulação do desenvolvimento folicular em mulheres com insuficiência grave de LH e FSH (nível sérico de LH e FSH inferior a 0,5 UI/L). (IV) Para estimular a produção de espermatozoides no homem com hipogonadismo hipogonadotrófico congênito ou adquirido, em associação com a gonadotropina coriônica humana (hCG).

Contra-indicações: Hipersensibilidade à follitropina, FSH ou a qualquer dos excipientes; tumores do hipotálamo ou da hipófise. **Em mulheres:** hipertrofia ou cistos ovarianos não originados da Síndrome do Ovário Policístico; hemorragias ginecológicas de etiologia desconhecida; carcinoma do útero, ovário ou mama; quando uma resposta efetiva não pode ser obtida por insuficiência com a gravidez. Em homens: insuficiência testicular primária. **Precauções e advertências:** Na mulher, a utilização do GONAL-® requer monitorização ecográfica regular da resposta ovariana e a avaliação dos níveis de estradiol. Pode haver um certo grau de variabilidade na resposta individual ao FSH. Tanto no homem como na mulher, deve ser utilizada a dose mais baixa eficaz, em relação ao objetivo do tratamento. A auto-administração do GONAL-® deve ser unicamente efetuada por pacientes adequadamente treinadas, com recomendação de um especialista. As pacientes devem ser avaliadas quanto a hipotidismo, insuficiência da supra-renal, hiperprolactinemia e tumores do hipotálamo ou hipófise, e fornecido tratamento específico adequado. Nas mulheres submetidas à estimulação do crescimento folicular, pode ocorrer um aumento do volume ovariano ou o desenvolvimento de hiperestimulação. Uma excessiva resposta ovariana ao tratamento com gonadotropinas raramente origina uma OHSS, exceto se for administrado hCG para induzir a ovulação. Em casos de hiperestimulação ovariana, não se deve administrar hCG e recomenda-se à paciente a abster-se de relações sexuais ou utilizar métodos anticoncepcionais de barreira durante, pelo menos, 4 dias. A OHSS pode progredir rapidamente (de 24 horas até vários dias) e se agravar, devendo-se, portanto, acompanhar as pacientes durante pelo menos duas semanas após a administração de hCG. Há maior incidência em mulheres com a síndrome do ovário policístico. A adesão à posologia recomendada e ao esquema de administração, além de uma cuidadosa monitorização da terapêutica minimizam a incidência de tais efeitos. O risco de gravidez múltipla, em mulheres submetidas à estimulação do crescimento folicular para indução da ovulação ou TRA do que na população normal. Mulheres com história de doença tubária apresentam risco de desenvolvimento de gravidez ectópica. A prevalência de má formação congênitas após TRA pode ser ligeiramente superior relativamente às concepções espontâneas, podendo ser originada pelas diferenças nas características dos progenitores (ex: idade materna, características do esperma) e pelas gravidezes múltiplas. O risco de episódios tromboembólicos pode aumentar em mulheres com tendência para estas ocorrências. A própria gravidez também aumenta o risco de trombose. Valores elevados de FSH endógeno, no homem, são indicativos de insuficiência testicular primária. Estes pacientes não respondem ao tratamento com GONAL-®/hCG. Recomenda-se a análise do esperma 4 a 6 meses após o início do tratamento. Não há indicação para a utilização de GONAL-® durante a gravidez e aleitamento. O uso concomitante de GONAL-® com outros medicamentos utilizados na estimulação da ovulação, (por ex. hCG, citrato de clomifeno), pode potencializar a resposta folicular, enquanto que a utilização simultânea de um agonista do GnRH, pode aumentar a dose de GONAL-® necessária para provocar uma resposta ovariana adequada. Não foram relatadas outras interações clinicamente significativas durante a terapêutica com GONAL-®. Não foram observados casos de superdosagem de GONAL-®, no entanto, pode admitir-se a ocorrência da Síndrome de Hiperestimulação Ovariana. **Reações adversas:** Muito comuns: cistos ovarianos; reações no local da injeção; cefaleia. Comuns: OHSS leve a moderada; dor abdominal e sintomas gastrointestinais, tais como náuseas, vômitos, diarreia, cólica e distensão abdominal. Pouco comuns: OHSS grave. Raras: torção ovariana. Muito raras: tromboembolismo, geralmente associada com OHSS grave; reações alérgicas sistêmicas moderadas (eritema, rash ou edema facial). No homem: Comuns: ginecomastia, acne e incremento ponderal. **Posologia e modo de usar:** GONAL-® injetor nas apresentações de 900 UI/1,5 mL, 450 UI/0,75 mL e 300 UI/0,5 mL devem ser aplicados por via subcutânea. **Mulheres com Anovulação (incluindo SOP):** O tratamento deve comear-se 7 dias do ciclo menstrual e deve ser ajustado pela a resposta individual da paciente. Um regime comum inicia com 75-150 UI FSH por dia e é aumentado em 37,5 UI (até 75 UI) em intervalos de 7 ou 14 dias, se necessário. A dose máxima diária não é normalmente superior a 225 UI de FSH. Se a paciente não responder após 4 semanas, o ciclo deve ser abandonado e recomegado com uma dose inicial mais alta. Quando é obtida uma resposta ótima, injeção única de hCG deve ser administrada 24-48 horas após a última injeção de Gonal-®. Se for obtida uma resposta excessiva, o tratamento deve ser interrompido e a aplicação do hCG suspensa. O tratamento deve recomençar no próximo ciclo com dosagem menor. **Estimulação ovariana em Técnicas de Reprodução Assistida:** Um regime de superovulação envolve a administração de 150-225 UI de GONAL-® por dia, começando no 2º ou 3º dia do ciclo, até que seja atingido desenvolvimento folicular adequado, com a dose ajustada de acordo com a resposta da paciente, geralmente não mais que 450 UI por dia. Em geral, obtém-se um desenvolvimento folicular adequado em média no décimo dia do tratamento (de 5 a 20 dias). Uma única injeção de hCG é administrada 24-48 horas após a última injeção de GONAL-® para induzir a maturação final do folículo. "Down-regulation" com agonista do hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) é usado a fim de suprimir o aumento de LH endógeno. Geralmente GONAL-® é administrado 2 semanas após o início do tratamento com o agonista. **Mulheres com anovulação por deficiência grave de LH e FSH:** GONAL-® deve ser administrado em injeções diárias, simultaneamente com a alafaltropina (Luviers®). O tratamento deve ser adaptado à resposta individual de cada paciente. Inicia-se com a administração diária de 75 UI de alafaltropina e com 75 a 150 UI de FSH. O ajuste da dose pode ser efetuado após intervalos de 7 a 14 dias com incrementos de 37,5 a 75 UI, até 5 semanas. Quando se obtém uma resposta ótima, deve ser administrada uma única injeção de hCG, de 24 a 48 horas após as últimas injeções de GONAL-® e de alafaltropina. 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. Caso seja 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 doses de FSH inferior à do ciclo anterior. **Homem infértil com deficiência hormonal:** GONAL-® é usualmente prescrito na dose de 150 UI, 3 vezes por semana em combinação com a gonadotropina coriônica humana (hCG) por, pelo menos, 4 meses. A experiência clínica atual indica que pode ser necessário um tratamento de pelo menos 18 meses para obter a espermato gênese. **Conservação:** GONAL-® injetor deve ser mantido sob refrigeração entre 2 e 8 °C, protegido da luz. Não congelar. Durante o período de validade, pode ser guardado abaixo de 25°C por até 28 dias e descartado após esse período. Qualquer quantidade restante de medicamento após passados 28 dias da primeira abertura deve ser desprezado. Não utilize o medicamento se existirem partículas na solução ou se a solução não estiver límpida. Mantenha o GONAL-® em sua embalagem original. Nestas condições, o prazo de validade é de 24 meses a partir da data de fabricação. **VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA.** SAS- Serviço de Atendimento Sero: 0800-113320. Reg MS 1.1124.0205.

LUVERIS® 75 UI – alafaltropina – Para uso subcutâneo. USO ADULTO. **Composição e apresentação:** Cada frasco-ampola contém 75 UI de alafaltropina na forma de pó liofilizado para injeção. Solvente: água para injeção. Caixa com 1 frasco-ampola de pó liofilizado e 1 frasco-ampola de solvente. **Indicação:** Luviers® 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. Luviers® deve ser administrado segundo um esquema de injeções diárias, simultaneamente ao FSH. Dado que estas pacientes são amenorreicas e têm uma reduzida secreção de estrogênios endógenos, o tratamento pode ser iniciado a qualquer momento. **Contra-indicações:** Hipersensibilidade às gonadotropinas ou a qualquer dos excipientes; carcinoma do útero, ovário ou mama; tumores atípicos, 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 fibróticos do útero incompatíveis com a gravidez. As pacientes devem ser examinadas em relação a hipotidismo, 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. Luviers® não deve ser administrado durante a gravidez e a amamentação, em idosas, crianças e outros grupos de risco. Não se conhecem os efeitos da superdosagem com alafaltropina, no entanto, pode-se admitir a ocorrência da síndrome da hiperestimulação ovariana. **Reações adversas:** A alafaltropina é utilizada em associação com alafaltropina, 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 Luviers®. A síndrome de hiperestimulação ovariana foi observada em menos de 6% das pacientes tratadas com Luviers®. Não foi relatada síndrome de hiperestimulação ovariana grave. Tromboembolia, torção dos anexos (uma complicação do aumento do volume ovariano) e hemoperitônio foram raramente associados com a terapêutica com gonadotropinas menopausais humanas. 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. A incidência das reações no local da injeção foi significativamente mais baixa no tratamento com Luviers® do que com outros medicamentos contendo hLH. **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 alafaltropina, 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 Luviers® 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 luteotrófica (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. Luviers® pode ser misturado com GONAL-® monodose em 1 ml de solvente, e co-administrado numa injeção única. Neste caso Luviers® deve ser reconstituído em primeiro lugar e depois utilizado para reconstituir o pó de alafaltropina. 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.** SAS- Serviço de Atendimento Sero: 0800-113320. Reg MS 1.1124.0221.

CETOTREX® – acetato de cetorelix – Para uso subcutâneo – USO ADULTO. **Composição e apresentação:** Cetotrex® pó-liofilizado para injeção 0,25 mg contém acetato de cetorelix 0,26 - 0,30 mg (equivalente a 0,25 mg de cetorelix base). Cada caixa contém: 1 frasco-ampola de pó liofilizado; 1 seringa pré-enchida com 1 ml de diluente (água para injeção); 1 agulha para diluição (calibre 20); 1 agulha para injeção subcutânea (calibre 27); 2 lenços umedecidos em álcool. **Indicação:** Cetotrex® é indicado para a prevenção de ovulação prematura em pacientes submetidas a uma estimulação ovariana controlada, seguida por coleta do óvulo e técnicas de reprodução assistida. **Contra-indicações:** Hipersensibilidade ao acetato de cetorelix, a análogos estruturais do GnRH ou a qualquer

outro componente da fórmula. Em grávidas, lactantes ou em pós-menopausa, disfunção renal e hepática moderada e grave. **Precauções e Advertências:** Atenção especial aos sinais e sintomas de condições alérgicas ativas ou histórico de predisposição alérgica. Pode ocorrer síndrome de hiperestimulação ovariana, como risco intrínseco do procedimento de estimulação com gonadotróficos. Deve ser dado suporte à fase lútea, de acordo com a prática médica reprodutiva. Cetotrex® deve ser utilizado em ciclos repetidos somente após avaliação cuidadosa da relação risco/benefício. Não deve ser administrado durante a gravidez e lactação. É improvável que Cetotrex® diminua a habilidade do paciente em dirigir ou operar máquinas. São improváveis as interações com medicamentos metabolizados pelo citocromo P450 ou glucuronizados ou conjugados da mesma forma. A possibilidade de interação com outros medicamentos não pode ser totalmente excluída, incluindo produtos que podem induzir a liberação de histamina em indivíduos suscetíveis. A superdosagem pode resultar em prolongamento da ação, sendo improvável o aparecimento de efeitos tóxicos agudos. **Reações Adversas:** Podem ocorrer reações leves e transitórias no local da injeção como eritema, prurido e edema local. Casos raros de reações de hipersensibilidade, incluindo reações pseudo-alérgicas/anafiláticas. Frequentemente pode ocorrer síndrome de hiperestimulação ovariana leve a moderada. Com pouca frequência, síndrome de hiperestimulação ovariana grave, náuseas e cefaleia. **Posologia e modo de usar:** Cetotrex® deve ser administrado por injeção subcutânea na parede abdominal inferior. A primeira administração de Cetotrex® deve ser efetuada sob supervisão médica, onde o tratamento de possíveis reações pseudo-alérgicas esteja imediatamente disponível. As injeções seguintes podem ser auto-administradas, desde que a paciente tenha sido informada sobre os sinais e sintomas que possam indicar hipersensibilidade. Deve ser administrado em dose única diária, de manhã ou à noite. **Pela manhã:** deve iniciar no dia 5 ou 6 da estimulação ovariana com gonadotrofina (aproximadamente 96 a 120 horas após início da estimulação ovariana), devendo manter-se durante o período de tratamento com gonadotropinas incluindo o dia de indução da ovulação. **À noite:** deve iniciar no dia 5 da estimulação ovariana com gonadotrofina (aproximadamente 96 a 108 horas após início da estimulação ovariana), devendo manter-se durante o período de tratamento com gonadotrofina até a noite anterior ao dia da indução da ovulação. **Conservação:** Deve ser conservado em temperatura inferior a 25°C, ao abrigo da luz e umidade e mantido em sua embalagem original. Nestas condições o prazo de validade é de 24 meses. Após esse período o medicamento não deve ser utilizado. A solução deve ser utilizada imediatamente após a preparação. **VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA.** SAS- Serviço de Atendimento Sero: 0800-113320. Reg MS 1.1124.0220.

OVIDREL® 250 µg – alacoriogonadotropina – hCG recombinante (r-hCG) – Para uso subcutâneo – USO ADULTO. **Composição e apresentação:** Ovidrel® 250 µg / 0,5 mL: 1 seringa pré-enchida pronta para uso contendo 250 microgramas de alacoriogonadotropina em 0,5 mL de solução. **Indicações:** Ovidrel® é administrado para induzir a maturação folicular final e a luteinização, após a estimulação do desenvolvimento folicular em mulheres submetidas às técnicas de reprodução assistida (TRA). Ovidrel® também é utilizado para induzir a ovulação e a luteinização em mulheres anovulatórias ou oligo-ovulatórias, após a estimulação do desenvolvimento folicular. **Contra-indicações:** Ovidrel® não é indicado nos casos de: tumores do hipotálamo e da hipófise; hipersensibilidade a substância ativa ou aos excipientes; hipertrofia ou cistos ovarianos não originados por Doença do Ovário Policístico; hemorragia ginecológica de etiologia desconhecida; carcinoma ovariano, uterino ou de mama; gestação extra-uterina nos últimos 3 meses; alterações tromboembólicas ativas; ou em situações onde uma resposta efetiva não possa ser obtida (falência ovariana primária, má formação dos órgãos sexuais incompatíveis com a gravidez, pós menopausa). **Precauções e advertências:** Antes de iniciar o tratamento, a paciente deve ser avaliada quanto a hipotidismo, insuficiência da supra-renal, hiperprolactinemia e tumores do hipotálamo ou hipófise. Precauções especiais devem ser tomadas para mulheres com doença sistêmica clinicamente significativa, em que uma gravidez possa levar a um agravamento da situação. O tratamento com Ovidrel® pode aumentar o risco de "síndrome de hiperestimulação ovariana (OHSS)", sendo o sintoma mais comum a dor abdominal. Esta pode ser evitada suspendendo a administração de hCG e a paciente não deve ter relações sexuais durante, no mínimo, 4 dias, ou utilizar um método contraceptivo de barreira. A frequência de gestações e nascimentos múltiplos é aumentada em pacientes submetidas a este tratamento e está relacionada com o número de embriões transferidos. O risco de desenvolvimento de OHSS ou de gestação múltipla é reduzido se for utilizada a dose recomendada de Ovidrel®, e houver cuidadosos monitoramento ecográfico e dos níveis de estradiol. A taxa de aborto, tanto em pacientes anovulatórias como em mulheres submetidas a TRA, é superior à que se verifica na população normal, mas comparável às taxas observadas em mulheres com outros problemas de fertilidade. Durante a terapêutica com Ovidrel®, é possível ocorrer uma ligeira estimulação da tireóide. A auto-administração de Ovidrel® deverá ser unicamente efetuada por pacientes adequadamente treinadas e com recomendações de um especialista. Após a administração, Ovidrel® pode interferir, até dez dias, na determinação imunológica do hCG sérico / urinário, levando a falsos resultados positivos de testes de gravidez. **Reações adversas:** Síndrome de hiperestimulação ovariana, vômitos e náuseas (de forma dose-dependente). Gravidez ectópica, torção do ovário e outras complicações são consideradas decorrentes das Técnicas de Reprodução Assistida. Comuns: Reação / dor no local da injeção; cefaleia, astenia; náuseas / vômitos, dor abdominal; síndrome de hiperestimulação ovariana ligeira a moderada. Pouco comuns: depressão, irritabilidade, agitação; diarreia; síndrome de hiperestimulação ovariana grave, mastalgia. **Posologia e modo de usar:** O conteúdo de uma seringa pré-enchida de Ovidrel® (250 microgramas) deve ser administrado 24 a 48 horas depois de se ter alcançado uma estimulação ótima do desenvolvimento folicular. **Estabilidade e conservação:** Ovidrel® 250 µg / 0,5 mL – Solução injetável em seringa pré-enchida – deve ser conservado sob refrigeração (2°C a 8°C). Mantenha o medicamento em sua embalagem original. A seringa com solução injetável pode ser armazenada a uma temperatura de até 25°C por, no máximo, 30 dias. Caso o medicamento não seja usado dentro de 30 dias, a solução deverá ser descartada. **VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA.** SAS – Serviço de Atendimento Sero: 0800-113320. Reg MS 1.1124.0222.

CRINONE® – Progesterona – Gel Vaginal 8% – USO ADULTO. **Composição e apresentações:** Cada aplicador contém 1,125 g de gel vaginal com 90 mg de progesterona (8%). Casos com 7 ou 15 aplicadores de 90 mg. **Indicação:** Crinone® (progesterona) é indicado para o tratamento de infertilidade devido à fase lútea inadequada. Para uso nos procedimentos de fertilização *in vitro*, onde a infertilidade é principalmente devida a problemas tubários, idiopáticos ou relativos a endometriose associada a ciclos ovulatórios normais. **Contra-indicações:** Hipersensibilidade conhecida a progesterona ou a qualquer um dos componentes da formulação; hemorragia uterina anormal não diagnosticada; câncer de mama ou de órgãos genitais; porfiria aguda; tromboflebite, distúrbios trombo-embólicos, embolia cerebral; aborto oculto ou incompleto. **Precauções e advertências:** Atenção particular às mamas e órgãos pélvicos, devendo ser solicitado Papanicolaou para acompanhamento. Devido à possibilidade de retenção hídrica, qualquer condição que possa ser influenciada por este fator necessita observação cuidadosa. Em casos de sangramento vaginal irregular, avaliar se há doença orgânica presente. Crinone® deve ser interrompido se houver recidiva de depressão grave. Sintomas da pós-menopausa podem ser mascarados. Os gestágenos podem piorar as manifestações de porfiria pré-existent. Crinone® pode ser administrado durante o primeiro trimestre de gestação de um procedimento de TRA, em caso de deficiência do corpo lúteo. Crinone® não é indicado para o uso em aborto hialino ou ameaça de aborto. A amamentação deve ser suspensa durante o tratamento com Crinone®. Crinone® não deve ser utilizado em crianças. Possibilidade de distúrbios trombóticos (incluindo tromboflebite, trombose retiniana, embolismo cerebral e pulmonar). Nestes casos o tratamento deve ser imediatamente interrompido. Não é recomendada a utilização de Crinone® conjuntamente com outras preparações intravaginal. Há relatos de sonolência associados ao uso de Crinone®, portanto não se recomenda operar maquinário perigoso e/ou dirigir veículos motorizados. Superdosagem aguda é improvável devido à sua dependência da concentração, taxa limitada de absorção da progesterona pelo epitélio vaginal e às características de liberação controlada da formulação. Em caso de superdosagem, interromper o tratamento com Crinone® e tratar a paciente sintomaticamente. **Reações adversas:** Dor abdominal, dor nas costas ou articulações das pernas e dor no perineo, flatulência, dor/tensão nas mamas, tontura, ondas de calor, lactação e retenção de líquidos, constipação, diarreia, dispepsia, eructação, dor gástrica, náuseas e vômitos, redução da libido, dismenorréia, dispárea, aumento da micção, leucorréia, coceira, irritação/prurido vaginal, sangramento vaginal e secreção vaginal, tontura, depressão, labilidade emocional, cefaleia, insônia, irritabilidade, nervosismo, sonolência e acne. A maioria dos eventos são leves e transitórios e frequentemente são resolvidos sem a interrupção do tratamento. **Posologia e modo de usar:** A administração vaginal para induzir transformação secretória do endométrio está indicada somente em casos em que o endométrio tenha sido adequadamente suprido de estrogênio, endógeno ou exógeno. Nestes casos o sangramento por variação usualmente ocorre dentro de 3 a 7 dias após a interrupção da terapia com Crinone®, a menos que tenha ocorrido gestação. Suposição de dosagem: O esquema de dosagem assume o intervalo entre as menstruações ou ciclos estrogênicos como sendo de 28 dias e o dia 1 como sendo o primeiro dia de sangramento ou da terapia estrogênica cíclica. Complementação ou reposição de progesterona como parte do esquema das Técnicas de Reprodução Assistida - Para suporte endometrial como parte da TRA, iniciando administrando Crinone® em uma ou duas aplicações diárias. A maioria das mulheres respondem com 90 mg diariamente. Entretanto, algumas mulheres podem precisar de 90 mg duas vezes ao dia. Se a gravidez for confirmada, continuar com Crinone® até 12 semanas. Crinone® deve ser administrado, diariamente, no mesmo horário. Doses menores podem ser usadas em mulheres ovulando normalmente, com suspeita de deficiência de progesterona, como deficiência da fase lútea. **Conservação:** Conservar o medicamento em temperatura abaixo de 25°C. O prazo de validade é de 36 meses contados a partir da data de fabricação indicada na embalagem externa. **VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA.** SAS- Serviço de Atendimento Sero: 0800-113320. Reg MS 1.1124.0217.

Referências Bibliográficas: **1)** Balasch J et al. Outcome from consecutive assisted reproduction cycles in patients treated with recombinant follitropin alfa fi lled-by-bioassay and those treated with recombinant follitropin alfa fi lled-by-mass. RBM Online 2004; 8 (4): 408-413. **2)** Sero S Study 22240, data on file. **3)** Hughes JN 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 Online 2003; 6 (2): 185-190. **4)** Marrs R et al. Randomized trial to compare the effect of recombinant human FSH (follitropin alfa) with or without recombinant human LH in women undergoing assisted reproduction treatment. RBM Online 2004; 8 (2): 175-182. **5)** Monografia do produto (Cetotrex®). **6)** Ludwig M, Katalinic A, Diedrich K. Use of GnRH antagonists in ovarian stimulation for assisted reproductive technologies compared to the long protocol. Meta-analysis. Arch Gynecol Obstet 2001; 265 (4): 175-182. **7)** Albano C et al. Ovarian stimulation with hMG: results of a prospective randomized phase III European study comparing the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-antagonist cetorelix and the LHRH-agonist busarelin. European Cetorelix Study Group. Hum Reprod 2000; 15 (3): 526-531. **8)** Warne DW, Hughes JN, Decosterd G et al. The International Recombinant Human Chorionic Gonadotropin Study Group. Induction of ovulation in WHO Group II anovulatory women undergoing follicular stimulation with r-FSH: a comparison of recombinant human chorionic gonadotropin (r-hCG) and urinary hCG. Fertil Steril 2001; 75 (6): 1111-1118. **9)** Hovatta et al. Data on file. **10)** Monografia do produto (Ovidrel®). **11)** Marrs et al. Use of Recombinant Human Chorionic Gonadotropin (r-hCG, Ovidrel) or Urinary Human Chorionic Gonadotropin (u-hCG) for triggering ovulation in assisted reproductive technologies (ART). 4th World Congress on Controversies in Obstetrics, Gynecology & Infertility, Berlin, Germany, 24-27 April, 2003. **12)** Doody K. Ovulation triggering with recombinant chorionogonadotropin Alfa. 58th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine, Seattle, USA, 12-17 October, 2002. **13)** Maislisch L, Wame D, Bologna S et al. The European Recombinant Human Chorionic Gonadotropin Study Group (ERHCGSG): Induction of final follicular maturation and early luteinization in women undergoing OI for ART. Recombinant hCG versus urinary hCG. Hum Reprod 2000; 15 (7): 1446-1451.

Serviço de Atendimento Merck Sero
0800 113320





SBRA

**SOCIEDADE BRASILEIRA DE
REPRODUÇÃO ASSISTIDA**

Venha para a SBRA! Para ser sócio da SBRA:

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

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

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

UTROGESTAN®

progesterona natural
micronizada

Quando a
fertilidade se
transforma em
maternidade.



Fertilidade

- Indução da Ovulação⁽¹⁾
- Insuficiência Lútea^(1,2,3)
- Inseminação Intra-uterina^(3,4)
- FIV e ICSI^(1,5,6,7)

Gestação

- Ameaça de Aborto^(1,2)
- Abortamento Habitual^(2,3,8)

Referências: (1) Tavaniotou A, Smitz J, Bourgain C, Devroey P. Comparison between different routes of progesterone administration as luteal phase support in infertility treatments. *Human Reproduction Update* 2000; Vol. 6 Nº 2 pp. 139-148. (2) Di Renzo GC. Progesterone and pregnancy. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2005;17(6):598-600. (3) Daya S, Ward S, Burrows E. Progesterone profiles in luteal phase defect cycles and outcome of progesterone treatment in patients with recurrent spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 1988;158: 225-30. (4) Fitzpatrick LA, Good A. Micronized progesterone: clinical indications and comparison with current treatments. *Fertil Steril.* 1999; 72:389-397. (5) Róman E, et al. Analysis of the bleeding pattern in assisted reproduction cycles with luteal phase supplementation using vaginal micronized progesterone. *Human Reprod.* 2000; 15:1435-1439. (6) Friedler S, et al. Luteal support with micronized progesterone following in vitro fertilization using a down-regulation protocol with gonadotrophin-releasing hormone agonist: a comparative study between vaginal and oral administration. *Human Reprod.* 1999;14:1944-1948. (7) Smitz J, et al. A prospective randomized comparison of intramuscular or intravaginal natural progesterone as a luteal phase and early pregnancy supplement. *Human Reprod* 1992; 7:168-175. (8) Daya S. Efficacy of progesterone support for pregnancy in women with recurrent miscarriage. A meta-analysis of controlled trials. *Br J Obstet Gynecol* 1989; 96: 275-80.

UTROGESTAN® - progesterona natural micronizada - USO ADULTO - **Composição:** Cada cápsula contém progesterona 100 mg ou 200 mg; excipientes qsp. **Indicações:** UTROGESTAN® é indicado para os distúrbios relacionados à deficiência de progesterona, como alterações do ciclo menstrual e amenorréia secundária; na insuficiência lútea; na pré-menopausa e na reposição hormonal da menopausa (como complemento à terapia estrogênica). UTROGESTAN® via vaginal é indicado também na implantação do embrião e manutenção da gravidez durante o primeiro trimestre e como suporte da fase lútea durante os ciclos de reprodução assistida. **Contra-indicações:** Este medicamento é contra-indicado em doenças graves do fígado. Hipersensibilidade do princípio ativo ou a qualquer outro componente da fórmula. **Precauções:** Alterações leves ou moderadas da função hepática, pacientes com disfunção renal. **Advertências:** Este medicamento não trata todas as causas de aborto espontâneo precoce e, particularmente, ele não tem ação sobre abortos provenientes de defeitos genéticos (o que corresponde a mais da metade das causas de aborto). **Pacientes idosos:** Não há dados que indiquem a necessidade do ajuste de dose para a paciente idosa. **Gravidez - Amamentação:** Nenhuma relação entre a progesterona e malformações fetais foi observada durante diversos estudos epidemiológicos em mais de mil pacientes. **Interações medicamentosas:** o uso crônico de barbitúricos, carbamazepinas, hidantoínas ou rifampicina pode diminuir a eficácia de UTROGESTAN®. Por outro lado, UTROGESTAN® pode potencializar os efeitos farmacológicos da ciclosporina, teofilina ou beta-bloqueadores. **Posologia:** Via Oral: Na insuficiência de progesterona, na insuficiência lútea o regime de tratamento usual é de 200 mg por dia: → 10 dias por ciclo, habitualmente do 17º dia ao 26º dia, inclusive. Em terapia de reposição hormonal para menopausa, a terapia estrogênica isolada não é recomendada (risco de hiperplasia endometrial). Consequentemente, a progesterona é combinada em dose de 200 mg por dia, da seguinte forma: → dose única de 200 mg à noite antes de dormir, de 12 a 14 dias por mês. Na dose de 200 mg é comum observar-se um sangramento de privação após o uso da progesterona. Via vaginal: Cada cápsula gelatinosa deve ser introduzida profundamente na vagina. Suplementação da fase lútea (segunda fase do ciclo menstrual) durante ciclos de FIV: A dosagem recomendada é de 400 a 600 mg por dia, divididos em duas a três doses, do dia da injeção HCG até a 12ª semana de gravidez. Suplementação da fase lútea durante ciclos espontâneos ou induzidos: A dosagem recomendada é de 200 a 400 mg por dia, divididos em duas doses, a partir do 17º dia do ciclo, durante 10 dias. O tratamento será rapidamente reiniciado se a menstruação não ocorrer novamente e, sendo diagnosticada uma gravidez, até a 12ª semana desta. Ameaça de aborto precoce ou prevenção de aborto comum devido à insuficiência lútea: A dosagem recomendada é de 200 a 400 mg por dia divididos em duas doses até a 12ª semana de gravidez. **Forma farmacêutica e apresentações:** UTROGESTAN® 200 mg é apresentado em caixas contendo blister com 14 cápsulas gelatinosas. UTROGESTAN® 100 mg é apresentado em caixas contendo blister com 30 cápsulas gelatinosas. **VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA.** Registro no M.S.: 1.0390.0167. Farm. Resp.: Dra. Marcia Weiss I. Campos - CRF-RJ nº 4499. Fabricado por: CAPSUGEL PLOERMEL. Zone Industrielle Camagnon, B. P. 320 - 56803 Poermeil Cedex - Embalado por: Laboratórios Besins International Bélgica. Distribuído por: FARMOQUÍMICA S/A. Rua Viúva Cláudio, 300 - Rio de Janeiro - RJ. Indústria Brasileira - CNPJ: 33.349.473/0003-10 - SAC 0800 25 01 10 - Para ver o texto de bula na íntegra, acesse o site www.fqm.com.br

A PERSISTIREM OS SINTOMAS, O MÉDICO DEVERÁ SER CONSULTADO.





Uma das coisas mais bonitas
da vida é fazê-la acontecer.

A fecundação é uma dádiva.
E embora nem sempre possa ser
de forma natural, é um momento
onde afeto e responsabilidade são
os principais fatores. A Meizler
Biopharma já contribuiu para tornar
esse sonho possível a milhares de
casais por meio de suas linhas de
reprodução humana. E isso inclui
não apenas os medicamentos, mas
todo o suporte necessário a algo
tão importante como a formação
de uma nova vida.

expanding

www.meizler.com.br

SAC: 0800 166 613

Matriz / Headquarter
Al. Juruá, 149 - Alphaville
Barueri, SP - 06455-901 - Brasil
Tel (+55 -11) 4195.6613

Filial / Branch
Av. Vera Cruz, 463 - Jardim Guanabara
Goiânia, GO - 74675-830 - Brasil
Tel (+55 -62) 3207.2800


Meizler
BIOPHARMA S/A