

Guideline de Reprodução Assistida

César Augusto Cornel
Silvana Chedid Grieco
Jonathas Borges Soares
Cláudio Barros Leal Ribeiro
Álvaro Pigatto Ceschin

Denominamos como **Reprodução Assistida** o conjunto de técnicas onde uma equipe multidisciplinar tem participação estreita no acompanhamento do desenvolvimento folicular, detecção e indução da postura ovular, facilitação ou mesmo realização do encontro dos gametas assim como na otimização da fase lútea (Quadro 1).

Vale lembrar que apesar de utilização conhecida há mais de um século, a Inseminação Artificial com sêmen do marido (IIU) ou de doador (IAD) faz parte deste arsenal terapêutico participando de maneira direta dos avanços obtidos nesta área, uma vez que seu caráter de baixa complexidade permitiu sua larga difusão no meio médico

Dentro deste conjunto, as técnicas a Fertilização *in vitro* com Transferência de Pré-Embriões^(1.,2), um dos maiores avanços obtidos nas últimas três décadas para a terapêutica da infertilidade conjugal, ocupam com certeza lugar de destaque já que permitiu a solução de problema até então insolúvel, a ausência da função tubária, além de trazer em seu rastro o desenvolvimento de um moderno e eficiente arsenal de drogas de indução e estimulação ovulatória.

Mais de uma década depois, com desenvolvimento da técnica de micromanipulação de gametas agregou-se ao arsenal terapêutico das técnicas de reprodução assistida, a Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide (ICSI, *IntraCito*plasmic *Sperm Injection*) que permitiu então o tratamento da infertilidade masculina severa⁽³⁾ de maneira eficiente e o início das pesquisas com o objetivo do tratamento direto dos gametas (Assisted Hatching, Defragmentação, Transferência de Citoplasma etc...) e também a prevenção da transmissão de patologias cromossômicas ou gênicas a partir da biópsia do oócito(corpo polar) ou do pré-embrião(blastômero), caracterizando o Diagnóstico Genético Pré-Implantacional (PGD).

O primeiro nascimento após fertilização *in vitro* de um ócito humano e transferência de pré-embrião, foi publicado há mais de 20 anos². A partir de então, os numerosos levantamentos e registros nacionais e continentais documentam em centenas de milhares as gestações obtidas com as técnicas de Reprodução Assistida pelo mundo, de tal maneira que estas técnicas são responsáveis na atualidade por 1 a 3% dos nascimentos nos EUA e Europa.

Dados do registro americano(CDC) para 2002⁽⁴⁾, mostram 115.392 ciclos de fertilização *in vitro* realizados naquele ano, com o conseqüente nascimento de 45.751 bebês, o que representou uma taxa de sucesso(nascidos vivos por transferência) de 34,8%, sem a inclusão dos programas de doação e recepção de oócitos e ou pré-embriões. Por outro lado, vale observar que quase 50% destas gestações foram múltiplas.

Resultados muito semelhantes são obtidos do registro de 2001 de 23 países europeus⁽⁵⁾, onde se observou em 120.946 ciclos de fertilização *in vitro* uma distribuição de um, dois, três e quatro pré-embriões transferidos em 12,0, 51,7, 30,8 e 5,5%, respectivamente. As taxas de nascimentos a partir de gestações múltiplas, neste registro, foram de 25,5%.

Quadro 1 - Principais técnicas de Reprodução Assistida

a. Com tubas saudáveis e pÉrvias:

1. Relação programada (coito programado)
2. Inseminação Artificial Intra-uterina
3. Transferência de Gametas Intratubária (GIFT)
4. Fertilização *in vitro* com transferência de Zigoto(ZIFT) e/ou Embriões(TET) intratubária.

b. Sem tubas saudáveis e/ou com tubas impÉrvias

1. Fertilização *in vitro* Convencional e Transferência Intra-uterina de Pré-Embriões (FIV e TE)
2. Fertilização *in vitro* com Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide (ICSI)

c. Técnicas auxiliares ou acessÓrias

1. Criopreservação de gametas (espermatozóides e óvulos)
 2. Criopreservação de Pré-embriões
 3. Assisted Hatching
 4. Cultura Prolongada até Blastocisto
 5. Defragmentação de Pré-embriões
 6. Transferência de citoplasma
 7. Transplante de Núcleo
-

Referência Bibliográfica

1. Steptoe, P.C.; Edwards, R.G.: **Reimplantation of a human embryo with subsequent tubal pregnancy.** *Lancet.* 1:880, 1976
2. Steptoe, P.C.; Edwards, R.G.: **Birth after the reimplantation of a human embryo.** *Lancet.* 2:366, 1978.
3. Palermo, G.; Joris, H.; Devroy, P. *et al* : **Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte.** *Lancet.* 340:17-18, 1992.
4. www.cdc.gov/reproductivehealth/ART02/download.htm

INDUÇÃO DA OVULAÇÃO PROTOCOLOS (longo e curto)

A estimulação da ovulação consiste em aumentar a exposição dos ovários às gonadotrofinas, promovendo o crescimento de múltiplos folículos ovarianos por ciclo. Além disto, o aumento da concentração das gonadotrofinas nas células da granulosa produz aumento da síntese de estradiol, de vários fatores de crescimento e de receptores hormonais, cuja ação sinérgica torna o ambiente folicular mais adequado para o desenvolvimento de oócitos viáveis.

A escolha do esquema de estimulação ovariana que produza a melhor resposta folicular da maneira mais fisiológica possível é o objetivo de todos os especialistas que atuam em Medicina Reprodutiva e os esquemas de hiperestimulação ovariana têm sido aprimorados através da utilização de novas opções terapêuticas.

Foliculogênese ovariana e maturação oocitária

A maturação folicular ocorre pela multiplicação das células foliculares e formação do antro. O folículo primordial forma-se a partir de um pequeno oócito circundado por uma única camada de células escamosas que vão dar origem à camada de células da granulosa. As células da granulosa vão sofrendo divisões mitóticas até o folículo conter cerca de 2.000 a 3.000 células e apresentar diâmetro de 150 a 400µm. A partir de então, coleções de líquido folicular aparecem para coalescer e formar uma cavidade única e esférica, o antro. A formação do antro é dependente de estimulação de FSH e E2.

As células da granulosa são as únicas células do nosso organismo que possuem receptores para o FSH. A função do FSH é estimular o crescimento folicular e a formação de estrogênio, através da ocupação dos receptores das células da granulosa. O FSH, porém, não é capaz de sintetizar estrogênios isoladamente. Uma pequena quantidade de LH também é

necessária. Sabe-se que um número mínimo de receptores de LH tem que estar ocupado para que ocorra uma esteroidogênese adequada. As células da teca possuem receptores para o LH, os quais estimulam a produção de androgênios (a partir do colesterol), que por sua vez, são metabolizados, ou seja, aromatizados em estrogênios nas células da granulosa e agem diretamente nessas células modificando sua responsividade ao FSH.

Hiperestimulação ovariana

Pode-se aumentar o FSH e o LH pelo aumento de sua síntese e liberação endógena (citrato de clomifeno) ou por meio de administração exógena (gonadotrofinas).

Quando administramos FSH, estimulamos a formação de moléculas que podem influenciar a responsividade da teca ao LH. Por outro lado, quando administramos LH estimulamos a formação de moléculas que podem influenciar a responsividade da granulosa ao FSH.

O LH estimula a síntese e a formação de esteróides sexuais masculinos, testosterona e androgênios. O FSH, através do processo de aromatização, metaboliza o androgênio em estrogênio.

ESQUEMAS DE HIPERESTIMULAÇÃO OVARIANA

Citrato de clomifeno

Ocupa receptores hipotalâmicos gerando maior liberação de GnRH que facilita a secreção de gonadotrofinas.

O citrato de clomifeno é a droga de primeira escolha para ciclos de coito programado ou de inseminação intrauterina mas não é em geral a primeira opção para estimulação ovariana em ciclos de fertilização “in vitro”, a menos que se queira viabilizar uma estimulação com custos mais acessíveis e em mulheres jovens. A dose utilizada em geral é de 100mg/dia, por um período de 5 dias. Doses superiores a 150mg/ dia podem ser utilizadas porém com resultados insatisfatórios. Vale lembrar que sendo um anti estrogênico o citrato de clomifeno altera a qualidade do endométrio.

Gonadotrofinas urinárias

Na década de 60, iniciou-se a utilização das gonadotrofinas extraídas da urina de mulheres menopausadas e que continham níveis similares de FSH e de LH (cerca de 75 UI de cada). É o hMG (*human menopausal gonadotrophin*) que contém quantidades iguais de LH e FSH, liofilizados, para posterior diluição e aplicação IM ou SC. Sua apresentação é em ampolas de 75 ou 150 UI.

Na década de 80, foi desenvolvida uma outra formulação urinária, porém desta vez utilizando anticorpos monoclonais, o que aumentava a especificidade da atividade hormonal. Dessa forma foi possível que cada ampola de 75 UI contivesse aproximadamente 75 UI de FSH, e menos de 0,1 UI de LH, em função do próprio entendimento da necessidade de uma maior quantidade de FSH em relação ao LH para o adequado desenvolvimento folicular. É o FSH “puro” apresentado em ampolas com 75 e 150 UI, de aplicação IM ou SC.

O HCG urinário é extraído da urina de mulheres grávidas e encontra-se disponível em ampolas de 5.000 e 10.000UI.

Gonadotrofinas recombinantes

Na década de 90, iniciaram-se as pesquisas com as gonadotrofinas recombinantes. Primeiramente o FSH contendo 75UI de FSH puro e nada de atividade LH, e posteriormente o LH recombinante contendo 75UI de LH puro e nada de atividade FSH. O FSH é apresentado em ampolas de 37,5, 50, 75, 100, 150 e 200UI ou em apresentação multidoso; o LH em ampolas de 75UI. Podem ser utilizados IM ou SC. O HCG também encontra-se disponível na fórmula recombinante com apresentação em ampolas de 6.000UI.

Qualquer que seja a gonadotrofina escolhida as doses iniciais dependem da idade da paciente e do protocolo utilizado: “step up” quando se inicia com doses baixas e vai se aumentando a depender da resposta ovariana ao ultrassom ou “step down” quando se inicia com doses maiores e depois vai se diminuindo a depender da resposta ovariana.

A dose inicial depende: da idade da paciente, do nível de FSH plasmático na fase folicular inicial, da presença ou não de anovulação crônica e da resposta prévia a estimulação (se houver). Utilizam-se doses iniciais menores (entre 75 e 150 UI por dia) nas pacientes mais jovens, nas que apresentam FSH basal mais baixo, nas portadoras da Síndrome dos Ovários Policísticos, e nas que apresentaram resposta exagerada em ciclo anterior. Nas pacientes entre 30 e 35 anos utiliza-se habitualmente doses iniciais entre 150 e 225UI e em pacientes acima de 35 anos ou naquelas que apresentam baixa reserva ovariana inicia-se com doses em torno de 300UI por dia. A variação da dose é feita então de acordo com as necessidades e particularidades de cada paciente.

O aumento indiscriminado das doses de gonadotrofinas na tentativa de se otimizar as taxas de sucesso, ou o uso de protocolos sem comprovação científica, sem se avaliar a necessidade individual da paciente acaba levando a índices inaceitáveis de gestações múltiplas, com todas as suas complicações, ou por outro lado, a falta de resposta. Dessa forma é imprescindível se optar por protocolos mais “fisiológicos”, com o objetivo de se obter os melhores oócitos, e assim os melhores embriões e maiores taxas de gravidez. Os ajustes de dose devem ser acurados, não se utilizando doses inadequadas, e produzindo um melhor controle da resposta ovariana com menos chance de gestações múltiplas em excesso.

O acompanhamento do crescimento folicular é realizado por ultrasonografia transvaginal seriada e dosagens seriadas de estradiol, de modo que a dose do medicamento e a frequência das ultra-sonografias possam ser ajustadas conforme indicar o crescimento folicular e os níveis de estradiol.

O primeiro exame deve ser realizado sempre antes de se iniciar o estímulo ovulatório. Este exame basal proporciona avaliação do útero, da cavidade endometrial e do aspecto dos ovários. Quando o exame revelar cistos ovarianos de 20mm e níveis de estradiol maiores que 40pg/mL ou mais o ciclo de estímulo deve ser suspenso. Se evidenciadas alterações relevantes da textura uterina ou endometrial (miomas, pólipos, espessamentos endometriais e outras), estas podem merecer complementação propedêutica antes do início do tratamento. O segundo exame será agendado em torno do 4º ou 5º dia de estímulo. Segue-se o acompanhamento repetido das ultra-sonografias e dosagens de estradiol, quantas forem necessárias a cada 2 ou 3 dias até que se identifique folículos com diâmetro médio igual ou maior que 17 mm e valores de pelo menos 200 a 300pg/mL de estradiol.

Estudos demonstram que o LH em excesso pode suprimir a proliferação da granulosa, provocar luteinização prematura do folículo ou torná-lo atresico. Desta forma, a presença de altos níveis de atividade LH durante as fases iniciais da estimulação ovariana pode ocasionar um efeito deletério sobre os folículos em desenvolvimento. Isto pode ocorrer em algumas situações específicas como na síndrome dos ovários policísticos, onde os níveis de LH são, de forma absoluta ou relativa aumentados. Por outro lado, um mínimo de LH é necessário durante todo o ciclo de estimulação. Estudos realizados em pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico, que são consideradas como modelo para se determinar a necessidade real de cada uma das gonadotrofinas, demonstram que os folículos ovarianos crescem razoavelmente apenas com a administração de FSH. No entanto, para a esteroidogênese adequada, assim como para um desenvolvimento endometrial, a adição de LH é fundamental. Além da adição de LH levar à produção de estrogênio de forma dose-dependente, ele também antecipa o crescimento dos folículos, o que na prática poderia se traduzir por uma redução no número de dias de estimulação. A dose de LH que pareceu ser ótima para a maioria das pacientes foi de 75 UI por dia. Doses maiores, como de 225 UI de LH por dia parecem, ao contrário, exercer efeito deletério.

O LH ou o HMG podem ser utilizados para indução de ovulação em qualquer paciente, mas é imprescindível nos casos de mulheres inférteis com anovulação do tipo 1 da OMS. Tais pacientes têm níveis baixos demais ou ausentes de LH, o que torna impossível a produção de estrogênios.

Análogos e antagonistas do GnRH

Para um perfeito acompanhamento e programação da indução da ovulação e para evitarmos picos espontâneos de LH que poderiam inviabilizar a captação oocitária levando a ovulação e luteinização folicular precoces (antes da administração do HCG e da captação oocitária) é necessário utilizarmos drogas como os agonistas e os antagonistas do GnRH.

Os **agonistas do GnRH** começaram a ser utilizados na década de 80 e até hoje constituem-se em ferramentas fundamentais para o sucesso da estimulação ovariana. Existem várias opções disponíveis como o acetato de leuprolide (Lupron®), a goserelina (Zoladex®), o acetato de busarelina (Suprefact®), a triptorelina (Neodecapeptil®), etc. Realizamos a dessensibilização hipofisária com análogos do GnRH, iniciado tanto na fase folicular inicial quanto na fase lútea média. Após confirmação da supressão da função pituitária inicia-se a indução da foliculogênese propriamente dita.

Podem ser utilizados basicamente o **esquema longo** em que o análogo é iniciado em torno do 23º dia da fase lútea do ciclo prévio à estimulação ou no 1º dia do ciclo na dose de 0,10mUI por dia por um período de 2 ou 3 semanas, até se conseguir um bloqueio hipofisário (níveis de estradiol menores de 30-40pg/mL) e continuado durante a estimulação ovariana na dose de 0,05mUI por dia, até um dia antes da administração do HCG. No **esquema curto** o análogo é iniciado na fase lútea do ciclo prévio e após a menstruação e confirmando-se níveis baixos de estradiol é iniciada a estimulação ovariana. No esquema **ultra curto ou “flare up”** o análogo é iniciado concomitantemente com as gonadotrofinas no 1º ou 2º dias do ciclo menstrual. Este esquema é utilizado em pacientes má respondedoras ou com baixa reserva ovariana.

Os **antagonistas do GnRH** têm sido utilizados mais recentemente e realizam o bloqueio hipofisário após o início da estimulação ovariana. Têm a vantagem de permitirem uma aplicação mais confortável para a paciente pois são necessárias menos aplicações de injeções. Pode ser utilizada uma dose única de 3mg ou injeções diárias de 0,25mg por dia, aplicadas quando estiverem presentes folículos de pelo menos 14mm de diâmetro. Como exemplos de antagonistas do GnRH temos o acetato de ganirelix (Orgalutran®) e o acetato de cetrotrelis (Cetrotide®)

Pacientes com supressão hipofisária induzida por análogos do GnRH (agonsitas ou antagonistas) podem apresentar profunda supressão do LH, prejudicando uma adequada síntese de estradiol resultando em taxas de fertilização baixas e aumento de risco de abortamento. Tais pacientes necessitam de altas doses de FSH e apresentam melhora das taxas de implantação com a adição de LH ao protocolo de estimulação com FSH.

Os protocolos de hiperestimulação ovariana devem ser aplicados de maneira a mimetizar ao máximo a fisiologia ovariana. A individualização do tratamento, ministrando doses mais adequadas de acordo com cada indicação, é o objetivo final.

Opções disponíveis no mercado

Vão aqui alguns exemplos de opções comerciais disponíveis para os medicamentos utilizados na hiperestimulação ovariana:

Citrato de clomifeno	Clomid®	50 mg
	Genérico	50 mg
HMG (LH/FSH)	Serofene®	
	Pergonal®	75/75
	Menogon®	75/75
	Merional®	75/75 ou 150/150
	Menopur®	75/75
p-FSH	Fostimon®	75 ou 150
r-FSH	Puregon®	50, 100, 150 e 200
	Puregon Pen®	300 e 600
	Gonal-F®	37,5, 75 e 150
	Gonal-F® 600	1200
	r-LH	Luveris®
hCG	Choragon®	1500 e 5000
	Choriomon®	2000 e 5000
	Profasi HP®	2000, 5000 e 10000
	Pregnyl®	1500 e 5000
	Progesterona natural micronizada	Crinone®
Utrogestan®		100 e 200mg

Combinação de clomifeno e gonadotrofinas

Pode ser utilizado o clomifeno, na dose de 100mg/dia associado a gonadotrofinas. Este procedimento apresenta boa relação custo-benefício, apesar dos possíveis efeitos antiestrogênicos do citrato de clomifeno. Da mesma forma que ocorre com os esquemas anteriores, a ovulação é deflagrada quando o exame ultra-sonográfico mostrar que pelo menos 3 folículos atingiram o diâmetro maior ou igual a 17mm e nível de estradiol maior que 200 a 300pg/mL por folículo maduro.

Administração do HCG

A ovulação é deflagrada com 10.000 UI de gonadotrofina coriônica (hCG) urinária ou 6.000UI de HCG recombinante por via subcutânea (SC) ou intramuscular (IM) quando o exame ultra-sonográfico mostrar que pelo menos 3 folículos com diâmetro médio de pelo menos 17mm e nível de estradiol de pelo menos 200 a 300pg/mL por folículo maduro. Neste momento, simula-se o pico endógeno do LH. Programa-se a captação oocitária 36h após a injeção do HCG. O cancelamento do ciclo deverá ocorrer caso não se consiga obter pelo menos 2 ou 3 folículos maduros ou se o nível de estradiol estiver muito baixo.

Suplementação da fase lútea

A suplementação da fase lútea deverá sempre ser realizada para profilaxia da insuficiência do corpo lúteo. A suplementação pode ser feita usando-se a progesterona ou o HCG. Na literatura não há evidências que demonstrem a superioridade de uma ou outra forma de suplementação. A suplementação com HCG não deverá ser prescrita para pacientes com risco para hiperestímulo pois pode piorar o quadro. A suplementação pode ser descontinuada após a placenta assumir o pleno controle endócrino da gestação, o que ocorre após a décima segunda semana de gestação. O momento para se iniciar a suplementação da fase lútea é após a captação oocitária.

A suplementação com progesterona pode ser feita com progesterona por via oral, via intramuscular ou natural micronizada por via vaginal. O esquema mais utilizado por sua efetividade e menor incidência de efeitos colaterais, segurança de uso, facilidade de administração e custo, é a progesterona natural micronizada administrada por via vaginal na dose de 800mg por dia. Os níveis séricos de progesterona após tratamento vaginal com progesterona micronizada são menores que por via IM, porém os níveis no tecido uterino são maiores quando se usa a via vaginal. Quando o HCG foi comparado com a progesterona vaginal ou IM, não houve nenhuma diferença nos resultados. A aplicação vaginal da progesterona pode apresentar alguns efeitos colaterais como: corrimento e irritação vulvo-vaginal; a administração por via oral pode ocasionar: sedação, sonolência, náuseas, vômitos e retenção hídrica.

Quando se utiliza o HCG este é administrado a cada 4 dias a partir de 72 horas após a captação folicular na dose de 2.000UI em cada aplicação. Deve ser observado que a utilização do hCG na suplementação da fase lútea poderá resultar em testes de gravidez falso-positivos quando estes são realizados em curto espaço de tempo após a última aplicação.

O diagnóstico da gestação poderá ser realizado por exame plasmático de beta HCG quantitativo a partir de 12 dias após a transferência embrionária.

Outras drogas

Algumas drogas têm sido usadas em associação às gonadotrofinas para reduzir a hiperinsulinemia, aumentando sua sensibilidade em pacientes diabéticas obesas com hiperandrogenemia. Tem também se mostrado efetivas em mulheres insulino resistentes na ausência de diabetes declarada e em pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos.

A metformina (Glucoformin®, Dimefor®) um composto pertencente ao grupo das biguanidas, é utilizada na dose de 850 mg duas vezes ao dia, às refeições. O mecanismo primário de ação parece ser seu efeito na inibição da gliconeogênese hepática. Tem sido relatado que novos derivados da tiazolidinediona, como a troglitazona ou a rosiglitazona (Avantia®), melhoram a insulino-resistência e anormalidades reprodutivas em mulheres com SOP.

Complicações

As principais complicações relacionadas à FIV são o risco de gravidez múltipla e a síndrome de hiperestímulo ovariano.

Para se evitar as **gestações múltiplas** já comentamos que a hiperestimulação ovariana deve ser cautelada e individualizada e a tendência da maioria dos centros hoje é transferir um pequeno número de embriões.

A **Síndrome de Hiperestímulo Ovariano** é a complicação mais temida devido a sua gravidade. A paciente apresenta múltiplos folículos ovarianos acompanhados de ascite, alterações hematológicas (hemoconcentração), derrame pleural e alterações hepáticas e de coagulação. Pode ser evitada através de uma indução de ovulação com baixas doses e evitando-se a administração de HCG. Caso a administração já tenha sido feita os embriões podem ser congelados para transferência num outro ciclo, já que os casos graves de Síndrome de Hiperestímulo Ovariano só se manifestam em pacientes grávidas.

Referências bibliográficas

Bomsel-Helmreich O. Vu N Huyen L. Durand-Gasselín I. Effects of varying doses of HCG on the evolution of preovulatory rabbit follicles and oocytes. Human Reproduction. 4(6):636-42, 1989 Aug.

Burgués S; Spanish Collaborative Group on Female Hypogonadotropic Hypogonadism. The effectiveness and safety of recombinant human LH to support follicular development induced by recombinant human FSH in WHO group I anovulation: evidence from a multicentre study in Spain. Hum Reprod 16(12): 2525-32, 2001.

Check JH. Adelson HG. Dietterich C. Stern J. Pelvic sonography can predict ovum release in gonadotrophin-treated patients as determined by pregnancy rate. Human Reproduction. 5(3):234-6, 1990 Apr.

Crave, JC.; Fimbel, S.; Lejeune, H. et al.. Effects of diet and metformin administration on Sex hormone-binding globulin, androgens, and insulin in hirsute and obese women. J.Clin.Endocrinol.Metab., 80: 2057-63, 1995.

Dunaif, A.; Scott, D.; Finegood, D. et al.. The insulin-sensitizing agent troglitazone improves metabolic and reproductive abnormalities in the polycystic ovary syndrome. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, 81: 3299-306, 1996.

Dunaif, A; Mandelli, J.; Fluhr, H. et al.. The impact of obesity and chronic hyperinsulinemia on gonadotropin release and gonadal steroid secretion in the polycystic ovary syndrome. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, 66: 133-39, 1988.

Ehrmann, DA.. Recent advances in the medical treatment of PCOS. Abstract presented in ASRM/CFAS, pp 131-43, 1999

Ehrmann, DA.; Cavaghan, M.; Imperial, J. et al.. Effects of metformin on insulin secretion, insulin action, and ovarian steroidogenesis in women with polycystic ovary syndrome. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, 82, 524-30, 1997

Fleming R, Lloyd F, Herbert M, Fenwick J, Griffiths T, Murdoch A. Effects of profound suppression of luteinizing hormone during ovarian stimulation on follicular activity, oocyte and embryo function in cycles stimulated with purified follicle stimulating hormone. *Hum Reprod* 13(7):1788-92, 1998.

Fleming R, Rehka P, Deshpande N, Jamieson ME, Yates RW, Lyall H. Suppression of LH during ovarian stimulation: effects differ in cycles stimulated with purified urinary FSH and recombinant FSH. *Hum Reprod* 15(7):1440-5, 2000.

Giudice E, Crisci C, Eskhol A et al. Composition of commercial gonadotropin preparation extracted from human post menopausal urine: characterization of no gonadotropin proteins. *Hum Reprod* 9 (12): 2291-2299, 1994.

Gosden RG, Hunter RH, Telfer E, Torrance C, Brown N. J Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. *Reprod Fertil* 82(2):813-25, 1988.

Hillier SG. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Hum Reprod.* 9(2):188-91, 1994.

Hillier SG. Roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in controlled ovarian hyperstimulation. *Hum Reprod.* 11 Suppl 3:113-21, 1996.

Jialial, J.; Naiker, P.; Reddi, K. et al.. Evidence for insulin resistance in nonobese patients with polycystic ovarian disease. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, 64: 1066-69, 1987.

Lisi F, Rinaldi L, Fishel S, Lisi R, Pepe G, Picconeri MG, Campbell A, Rowe P. Use of recombinant FSH and recombinant LH in multiple follicular stimulation for IVF: a preliminary study. *Reprod Biomed Online* 3 (3): 190-194, 2001.

Lisi F, Rinaldi L, Fishel S, Lisi R, Pepe GP, Picconeri MG, Campbell A. Use of recombinant LH in a group of unselected IVF patients. *Reprod Biomed Online* 5(2):104-8; 2002.

Lunenfeld B. Development of gonadotrophins for clinical use. *Reprod Biomed Online.* 1 (4); Suppl 1:11-7, 2002.

Nestler, J.; Jakubowicz, D.; Evans, W. et al.. Effects of Metformin on spontaneous and clomiphene-induced ovulation in the polycystic ovary syndrome. *N.Engl.J.Med.*,338: 1876-80, 1998.

Ronnberg L. Endometriosis and infertility. *Annals of Medicine*. 22(2):91-6, 1990 Apr.

Shoham Z. The clinical therapeutic window for luteinizing hormone in controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril* 77(6):1170-7, 2002.

Stokman PGW, de Leeuw R, van den Wijngaard HAGW et al. Human chorionic gonadotropin in commercial human menopausal gonadotropin preparations. *Fertil Steril* 60: 175-178, 1993.

The European Recombinant Human LH Study Group. Recombinant human luteinizing hormone (LH) to support recombinant human follicle-stimulating hormone (FSH)-induced follicular development in LH- and FSH-deficient anovulatory women: a dose-finding study. *J Clin Endocrinol Metab* 83(5):1507-14, 1998.

Westergaard LG, Erb K, Laursen S, Rasmussen PE, Rex S. The effect of human menopausal gonadotrophin and highly purified, urine-derived follicle stimulating hormone on the outcome of in-vitro fertilization in down-regulated normogonadotrophic women. *Hum Reprod* 11(6):1209-13, 1996.

Westergaard LG, Laursen SB, Andersen CY. Increased risk of early pregnancy loss by profound suppression of luteinizing hormone during ovarian stimulation in normogonadotrophic women undergoing assisted reproduction. *Hum Reprod* 15(5):1003-8, 2000.

INSEMINAÇÃO INTRA - UTERINA

Definição

Introdução de espermatozóides, previamente capacitados na cavidade uterina.

Técnica

O primeiro passo é a indução da ovulação, realizada com objetivo de selecionar folículos pré-ovulatórios, com diâmetros médios de 18mm (no máximo quatro) e endométrio trilaminar, apto a receber os embriões. É importante sincronizar o dia da inseminação com o dia da ovulação, através da monitorização da ovulação, com acompanhamento da ultra-sonografia transvaginal observando o número, o sincronismo e tamanho dos folículos assim como a espessura endometrial, para administração de HCG, em média 36h antes da inseminação.

A preparação dos espermatozóides deverá ser feita para selecionar os de melhor morfologia e de boa motilidade. As técnicas utilizadas sejam gradiente de concentração ou swim-up apresentam resultados semelhantes.

No dia da inseminação, com os espermatozóides já capacitados, seguiremos as seguintes etapas:

Introdução do espéculo vaginal

Embrocação da vagina com soro, para promover a assepsia do colo uterino e paredes vaginais.

Aspiração do muco cervical

Introdução do cateter com os espermatozóides capacitados (0,5 ml), na cavidade uterina, onde serão depositados.

Retirada de espéculo

Repouso no leito por 10 min

Apenas uma inseminação será suficiente. Muitos estudos mostram que repetir a inseminação após alguns dias não traz nenhum benefício.

Os catéteres utilizados na inseminação apresentam os mesmos resultados, seja o Soft ou Hard-tip catheter

Indicações

Fator Cervical - muco cervical de baixa qualidade, presença de anticorpos antiespermatozóides.

Fator Masculino relativo - oligoastenozoospermia, defeitos nos mecanismos de ejaculação.

Infertilidade Sem Causa Aparente

Inseminação com sêmen de doador

Resultados

Os índices variam entre 12,5 e 18% de gravidez por ciclo, em mulheres até 35 anos. Os principais fatores dos baixos índices de sucesso estão na incapacidade de avaliar a qualidade dos óvulos liberados, assi

Referências bibliográficas

1 - THE COCHRANE DATABASE OF SYSTEMATIC REVIEWS 2006 ISSUE 2
COPYRIGHT © 2006 THE COCHRANE COLLABORATION. PUBLISHED BY JOHN
WILEY & SONS, LTD.

*INTRA-UTERINE INSEMINATION VERSUS TIMED INTERCOURSE FOR CERVICAL
HOSTILITY IN SUBFERTILE COUPLES*

2 - THE COCHRANE DATABASE OF SYSTEMATIC REVIEWS 2006 ISSUE 2
COPYRIGHT © 2006 THE COCHRANE COLLABORATION. PUBLISHED BY JOHN
WILEY & SONS, LTD.

SEMEN PREPARATION TECHNIQUES FOR INTRAUTERINE INSEMINATION
BOOMSMA CM, HEINEMAN MJ, COHLEN BJ, FARQUHAR C

3 - *THE COCHRANE DATABASE OF SYSTEMATIC REVIEWS* 2006 ISSUE 2
COPYRIGHT © 2006 THE COCHRANE COLLABORATION. PUBLISHED BY JOHN
WILEY & SONS, LTD.

*SINGLE VERSUS DOUBLE INTRAUTERINE INSEMINATION (IUI) IN STIMULATED
CYCLES FOR SUBFERTILE COUPLES*
CANTINEAU AEP, HEINEMAN MJ, COHLEN BJ

4 – AHMED M. ABOU-SETTA, RAGAA T. MANSOUR, HESHAM G. AL-INANY, MONA A.
ABOULGHAR, AHMED KAMAL, MOHAMED A. ABOULGHAR, AND GAMAL I.
SEROUR

*INTRAUTERINE INSEMINATION CATHETERS FOR ASSISTED REPRODUCTION: A
SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS*
*HUM. REPROD., ADVANCE ACCESS PUBLISHED ON MAY 4, 2006; DOI:
DOI:10.1093/HUMREP/DEL139*

5 - A.-M. VERMEYLEN, T. D'HOOGHE, S. DEBROCK, L. MEEUWIS, C.
MEULEMAN, AND C. SPIESSENS
THE TYPE OF CATHETER HAS NO IMPACT ON THE PREGNANCY RATE AFTER
INTRAUTERINE INSEMINATION: A RANDOMIZED STUDY
HUM. REPROD., ADVANCE ACCESS PUBLISHED ON MAY 16, 2006; DOI:
DOI:10.1093/HUMREP/DEL154

5 - [HUM REPROD UPDATE](#). 2002 JUL-AUG;8(4):373-84.

INTRAUTERINE INSEMINATION: A SYSTEMATIC REVIEW ON DETERMINANTS
OF SUCCESS.

[DURAN HE](#), [MORSHEDI M](#), [KRUGER T](#), [OEHNINGER S](#).

6 - HUM. REPROD. ADVANCE ACCESS ORIGINALLY PUBLISHED ONLINE ON
APRIL 3, 2006
HUMAN REPRODUCTION 2006 21(7):1680-1697; DOI:10.1093/HUMREP/DEL075

ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY IN EUROPE, 2002. RESULTS
GENERATED FROM EUROPEAN REGISTERS BY ESHRE

7 – FERTILDADE E INFERTILDADE HUMANA – 1997 – MEDSI – BADALOTTI M,
TELOKEN C, PETRACCO A

INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZÓIDE (ICSI)

Definição

É a técnica de RA em que apenas um espermatozóide capacitado é micro-injetado no interior do citoplasma ovocitário.

Este procedimento consiste nas diversas etapas a seguir:

Aspiração folicular
Identificação e classificação ovocitária
Preparação e capacitação espermática
Preparação e limpeza ovocitária
Microinjeção dos espermatozóides
Avaliação embrionária
Transferência embrionária

Técnica

Paciente em posição ginecológica, sob sedação com uso de hipnoanalgésicos de ação ultracurta.

Antissepsia da cavidade vaginal.

Aspiração folicular com auxílio de ultra-som transvaginal.

Transporte imediato do líquido folicular para o laboratório para identificação e avaliação ovocitária.

Materiais utilizados para avaliação ovocitária

- Placas de Petri pré-aquecidas
- Pipetas de Pasteur Humagen esterilizadas
- Seringas de 20 ml pré-aquecidas

-Lupa aquecida (pelo menos 15 minutos de antecedência)

-Placas de Petri duplo poço contendo meio de cultura(HTF Modificado 15% SSS)

-Placas de Petri com gotas de 25 microlitros de HTF Simples 15% SSS cobertos com óleo mineral (Irvine Embryotested) preparadas na véspera.

Procedimento de identificação e avaliação ovocitária

Observar na lupa o líquido folicular e capturar os óvulos com o auxílio de pipeta de Pasteur.

Transferir os óvulos para as placas com HTF Modificado, lavando-os sucessivamente para a retirada de células indesejáveis (hemácias, etc.). Acada seis óvulos capturados, transferir para as placas com HTF Simples e colocar a seguir na incubadora evitando contato prolongado com o ambiente externo. Manter os óvulos nas gotas de HTF Simples pelo menos duas horas até o momento da limpeza.

Materiais utilizados para a limpeza ovocitária

Pipetas de Paster Humagen esterilizadas

Stripper com ponteira de 135 mc

Pipetas de pasteur Humagen estiradas

Placas de Petri duplo poço aquecidas

HTF com Hepes e 15% de soro substituto à 37°C

Hialorunidase 80U/ml à 37°C

2 seringas BD ultrafine

Lupa aquecida

Procedimento de limpeza ovocitária

Mergulhar os óvulos (3 em 3) na solução de hialuronidase contida no poço central da placa de Petri.

Lavagem sucessiva dos mesmos com pipetas não estiradas até a dissolução do cumulus (não ultrapassar 1 minuto).

Retira-los com a pipeta estirada colocando-os na parte externa da placa preenchida com HTF Modificado. Com o auxílio do stripper completar a limpeza dos óvulos.

Coloca-los nas gotas com HTF simples e transferi-los para a incubadora até o momento da ICSI (1 hora).

Separar os ovócitos em M II para a ICSI

Enquanto os ovócitos estão na incubadora, preparar as placas para ICSI:

8 gotas de 5 microlitros em forma de círculo e numeradas, contendo HTF Modificado e 2 gotas na pare central de PVP cobertas com óleo mineral.

Injeção intracitoplasmática realizada com auxílio de micropipetas Humagen 30° contendo um único espermatozóide pré-capacitado.

Os óvulos retornam para a incubadora de CO₂.

Avaliação de fertilização após 16/18 hs.

Avaliação embrionária no segundo dia.

Avaliação e transferência embrionária no segundo ou terceiro dia

Indicações

1- Fator masculino alterado

 Oligoastenospermia

 Azoospermia obstrutiva

 Teratospermia

 Falhas na fertilização clássica

2- Ausência ou baixo índice de fertilização na FIV convencional

Resultados

IDADE	< 34	34-38	38-43	43 ≥
GRAVIDEZ CLÍNICA	41%	34%	17%	8%
NASCIMENTO	35%	28%	10%	4%

Referências bibliográficas

1 - HUMAN REPRODUCTION 2006 21(4):1018-1024; DOI:10.1093/HUMREP/DEI418
ICSI OUTCOMES IN OBSTRUCTIVE AZOOSPERMIA: INFLUENCE OF THE
ORIGIN OF SURGICALLY RETRIEVED SPERMATOZOA AND THE CAUSE OF
OBSTRUCTION

2 - ASRM FACT SHEET: [INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION \(PDF\)](#)
(AUGUST 2001) - CURRENTLY BEING REVISED

3 - HANNU MARTIKAINEN, MAURI ORAVA, JOUNI LAKKAKORPI, AND LEENA
TUOMIVAARA
DAY 2 ELECTIVE SINGLE EMBRYO TRANSFER IN CLINICAL PRACTICE:
BETTER OUTCOME IN ICSI CYCLES
HUM. REPROD., JUN 2004; 19: 1364 - 1366.

4 – **COCHRANE REVIEW:**
M.M.E. VAN RUMSTE, J.L.H. EVERS, AND C.M. FARQUHAR
ICSI VERSUS CONVENTIONAL TECHNIQUES FOR OOCYTE INSEMINATION
DURING IVF IN PATIENTS WITH NON-MALE FACTOR SUBFERTILITY: A
COCHRANE REVIEW
HUM. REPROD., FEB 2004; 19: 223 - 227.

5 - ART LABORATORY: ICSI, MESA, TESE
HUM. REPROD., JUN 2005; 20: I154 - I155.

6 - D. STRASSBURGER, S. FRIEDLER, A. RAZIEL, E. KASTERSTEIN, M.
SCHACHTER, AND R. RON-EL
THE OUTCOME OF ICSI OF IMMATURE MI OOCYTES AND RESCUED *IN VITRO*
MATURED MII OOCYTES
HUM. REPROD., JUL 2004; 19: 1587 - 1590.

7 - B. J. VAN VOORHIS
OUTCOMES FROM ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY
OBSTET. GYNECOL., JANUARY 1, 2006; 107(1): 183 - 200.

8 - 22ND ANNUAL MEETING OF THE EUROPEAN SOCIETY OF HUMAN
REPRODUCTION AND EMBRYOLOGY, 18-21 JUNE 2006

9 - [HTTP://WWW.PRONUCLEO.CJB.NET/](http://www.pronucleo.cjb.net/)

Fertilização *in vitro* convencional (FIVc e TE)

A fertilização *in vitro* convencional refere-se ao procedimento onde um ou mais oócitos são aspirados dos folículos ovarianos, incubados juntamente com espermatozóides previamente processados, fertilizados espontaneamente por um destes espermatozóides e então um ou mais dos pré-embriões assim obtidos são transferidos para a cavidade uterina.

Indicações:

A indicação desta técnica implica numa busca apurada da causa básica da infertilidade conjugal, obtida a partir de uma avaliação clínica e laboratorial completa realizada em ambos os parceiros.

A experiência inicial com a FIVc teve como indicação principal as patologias tubárias sem possibilidade de correção cirúrgica. Posteriormente e de maneira progressiva, a partir do estabelecimento de melhores condições de cultivo, da otimização do processo de estimulação ovariana e obtenção de oócitos que em conjunto determinaram a eficácia do procedimento, viu-se a expansão das indicações. Assim foi que, outras causas de infertilidade feminina e até mesmo algumas masculinas tiveram seu tratamento viabilizado através da FIVc.

São indicações de FIVc:

- Ausência ou obstrução tubária
- Insucesso de Salpingólise e/ou Reanastomose tubária
- Endometriose Severa
- Fator masculino moderado
- Disovulias e/ ou anovulias em falha de tratamentos anteriores
- Infertilidade Sem Causa Aparente (falha de tratamento(s) prévio)
- Falência ovariana (programa de ovodoação)

Considerações importantes:

A indicação definitiva da FIVc deve ser precedida de algumas reflexões, em que pesem seu alto custo, a necessidade de procedimento mais invasivo e a utilização de medicamentos de estimulação da foliculogênese associados com alguns riscos para a mulher. Além destes não se pode esquecer o aumento na taxa de gestações múltiplas que é responsável diretamente por muitos dos custos das gestações obtidas pelas técnicas de fertilização in vitro⁽⁶⁾ e também pelo aumento das complicações fetais.

A opção de tratamentos mais conservadores deve sempre ser levada em conta nos casais com tubas pérvias e sem fator masculino mais acentuado (moderado ou severo).

Causas de subfertilidade deverão ser tratadas antes de iniciadas as tentativas de FIVc, uma vez que não só as taxas de concepção natural mas também as da própria FIVc podem ser melhoradas com tais cuidados.

Geralmente, na ausência de fatores absolutos de infertilidade tais como a obstrução tubária bilateral e fator masculino severo, deve-se oferecer a estes casais de três a seis ciclos de estimulação e inseminação.

Em casais onde a mulher apresenta idade superior a 40 anos encontra-se apoio na literatura para se oferecer a FIVc como tratamento de primeira opção, não se desprezando contudo o tratamento prévio de fatores que venham a afetar negativamente o resultado final.

É consenso na literatura que a presença de hidrossalpinge ao exame ultrassonográfico da pelve feminina, reduz de maneira significativa os resultados da FIV convencional ou com ICSI. A salpingectomia prévia, na situação citada, recebe apoio da literatura e das principais sociedades internacionais, como maneira mais eficiente de aumentarem-se as taxas de sucesso do tratamento.

Não se encontra na literatura consenso quanto a garantir-se melhores resultados com a ICSI nos casos onde a FIVc pode ser utilizada.

Descrição da Técnica:

1. Identificação:

O líquido folicular é recebido e aliquotado em plaquetas de Petri onde, sob visão microscópica os oócitos são identificados e classificados quanto a sua maturidade.

2. Classificação oocitária:

Existem várias classificações porém a mais utilizada e aconselhada para utilização em nosso meio pelo **I Consenso Brasileiro de Embriologia em Medicina Reprodutiva – 2004**⁽⁶⁾, é baseada naquela descrita pela Clínica Bourn Hall (Cambridge) , como se segue:

a. *Vesícula Germinativa* – Células do cúmulo e da corona aderidas ao oócito e vesícula germinativa presente no citoplasma. O oócito esta em Prófase (P).

b. *Oócito Imaturo* – Células da corona compactadas com células do cúmulo apresentando algum grau de dispersão. Oócito em geral em Metáfase I (M1).

c. *Oócito Pré-Ovulatório* – Células da corona ainda aderidas e as do cúmulo bem dispersas. O primeiro corpúsculo polar já liberado. Oócito em Metáfase II (M2).

d. *Oócito Pós-Maduro* – Corona ausente com intensa dispersão das células do cúmulo. O primeiro corpúsculo polar é ainda visível e o oócito permanece em metáfase II.

e. *Oócito Luteinizado* – Ausência de corona e a arquitetura das células do cúmulo é representada como uma massa gelatinosa.

f. *Oócito Degenerado* ou *Atrésico* – Cúmulo retraído com células escassas ao redor do oócito. Podem ser identificados diferentes sinais de anormalidades como: citoplasma retraído e escurecido, vacúolos, zona pelúcida(ZP) fraturada ou rta e ainda ZP vazia.

3. Processamento Seminal:

O Sêmen coletado após período de liquefação, é avaliado quanto às suas características biofísicas e passa então por técnica de processamento com a associação de lavagens, centrifugações e migrações (Swim-Up, Centrifugação em Gradientes Descendentes ou outros), em meios específicos (Isolate, Pure-Sperm ou outros) que visam a separação do plasma seminal e seleção dos espermatozoides mais móveis e capazes para a inseminação dos oócitos⁽⁹⁾.

4. Inseminação dos Oócitos:

Após período de incubação de 2 a 3h em meio de cultura específico (HTF, Ham F10 ou outros) e enriquecido 10 a 20% com fonte de proteína (Albumina, Soro Materno ou Substitutos Sintéticos) em ambiente a 5% de CO₂, 37°C e 90% de umidade, os oócitos maduros recebem os espermatozoides processados (100 – 200 x 10³ espz/ml/oócito).

5. Verificação da Fertilização:

A fertilização é confirmada 17 a 20 horas após a inseminação quando é observada a presença dos pró-núcleos feminino e masculino(2PN).

Neste momento, para alguns autores, já se poderia identificar os futuros bons pré-embriões para a transferência, baseando-se na posição dos pró-núcleos, assim como no número e distribuição dos nucléolos observados em cada pró-núcleo.

6. Verificação da Clivagem:

A clivagem embrionária com a formação dos pré-embriões é observada na maioria dos protocolos publicados, após período de mais 24 horas da fertilização confirmada, isto é, por volta de 48 horas após a inseminação dos oócitos.

Alguns autores aconselham a identificação da *clivagem precoce*, avaliada 25 a 29 horas após a inseminação, como maneira mais eficiente para a identificação do melhor pré-embrião para a transferência.

7. Classificação dos Pré-Embriões:

Vários sistemas de classificação dos pré-embriões estão disponíveis na literatura especializada⁽⁷⁾. Quase a totalidade dos métodos baseia-se na equivalência de tamanho e número de blastômeros, porcentagem e características da fragmentação. Estes autores consideram como bons pré-embriões para a transferência aqueles com maior número, equivalência de tamanho entre os blastômeros e ausência ou menos de 20% de fragmentação visível no espaço peri-vitelínico.

A opção do cultivo prolongado até fases mais tardias do desenvolvimento in vitro (mórula ou blastocisto) parece ter no terceiro dia de cultivo o momento decisivo, uma vez que neste momento a presença de pré-embriões de boa qualidade e com 8 blastômeros ou mais, parece predizer com boa dose de acerto a possibilidade de obtenção do blastocisto.

8. Transferência dos Pré-Embriões:

A transferência do(s) pré-embrião(ões) pode ser realizada com 48 (2 – 4 células), 72 (6 -10 células) ou 120 horas (mórula ou blastocisto) após o dia da coleta e inseminação dos oócitos.

Catéteres mais macios conjugados a camisa externa, parecem determinar melhores resultados finais.

A decisão do número de pré-embriões para a transferência deverá estar calcada em fatores que equilibrem a melhor chance de gestação com a menor possibilidade de ocorrência da gemelaridade ou multigestação. Assim sendo, como o número de pré-embriões é o fator determinante desta última ocorrência, este deverá ser diminuído até limites mínimos que garantam taxa de gestação aceitável. Estudos demonstram que é possível a utilização da transferência de pré-embrião único em inúmeras situações clínicas com boa taxa de sucesso. Quando não se observam estas condições, a transferência de número superior a 4 pré-embriões só parece receber apoio da literatura em idade superiores a 40 anos na mulher, sendo que muitos autores demonstram resultados bastante aceitáveis com transferência nunca superior a 2 pré-embriões em idades inferiores.

Resultados

O maior determinante de sucesso das técnicas de fertilização in vitro, FIVC ou com ICSI, é sem dúvida a idade da mulher.

Em 2002, o registro americano mostrou que as taxas de nascidos vivos por ciclo em mulheres com idade inferior a 35 anos foi de 37%, de 35 a 37 anos de 31%, 38 a 40 anos 21%, 41 a 42 anos 11% e acima de 42 anos 4% ⁽⁴⁾.

No continente sul-americano a distribuição percentual dos procedimentos de fertilização assistida, registrados e publicados pela Rede Latinoamericana de Reprodução Assistida para os ciclos realizados entre os anos de 1992 e 2003 mostra uma nítida redução na utilização da FIVc frente a ICSI. **Figura 1**

A observação dos resultados obtidos com FIVc não demonstram qualquer vantagem para a ICSI quando se comparam as taxas de gestação por aspiração e por transferência, assim como as taxas de parto por aspiração e por transferência. **Figura 2**

**TIPO DE PROCEDIMIENTO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA
Y SU DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL (1992-2003)**

Figura 1

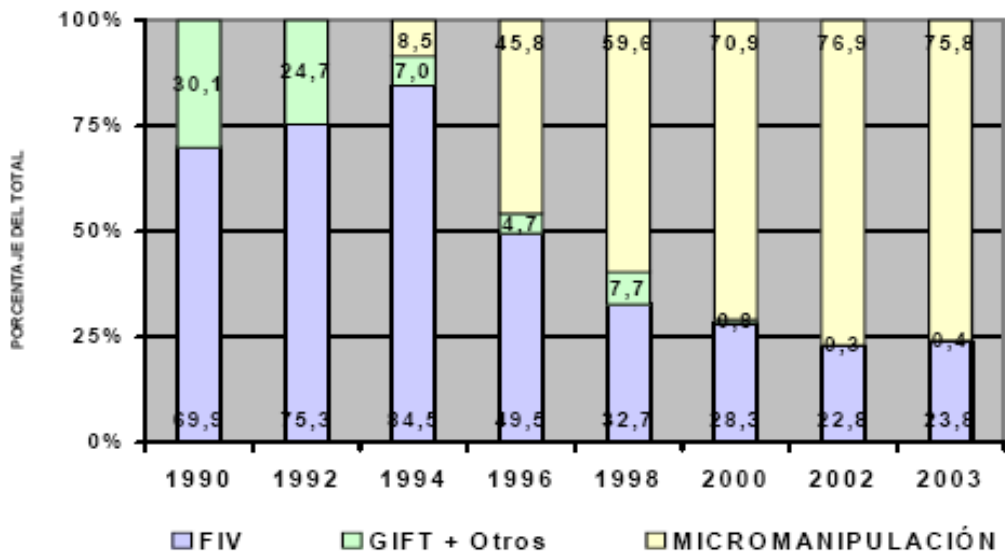


Figura 2 Resultados do Registro da REDLARA - 2003

	FIVc(%)	FIV com ICSI(%)
% Gestação Clínica por:		
<i>aspiração</i>	30,7	29,4
<i>transferência</i>	34,0	33,1
% Parto por:		
<i>aspiração</i>	24,9	23,5
<i>transferência</i>	27,5	26,1
Total de Ciclos	3344	8874

Bibliografia Recomendada

1. Andersen, A.N.; Gianaroli, L.; Felberbaum, R. et al: **Assisted reproductive technology in Europe, 2001. Results generated from European registers by ESHRE: *Human Reproduction*. 20: 1158, 2005**
2. Perin, P.; Mancebo, A.C.A.; Alegretti, J.R. : in “ **I Consenso Brasileiro de Embriologia em Medicina Reprodutiva** ” - O Oócito: cap2:11-20, 2004. **Pronúcleo – Núcleo Brasileiro de Embriologistas em Medicina Reprodutiva**
3. Soares, J.B.; Mizrahi, F.E.; Nunes, C.M.: in “ **I Consenso Brasileiro de Embriologia em Medicina Reprodutiva** ” – Do Zigoto ao Blastocisto: cap4:39-48, 2004. **Pronúcleo – Núcleo Brasileiro de Embriologistas em Medicina Reprodutiva**
4. www.redlara.com/registro/2003/download.htm
5. Soares, J.B.; Esteves, S.C.; Rhoden, E.L.: in “ **I Consenso Brasileiro de Infertilidade Masculina** ” – O Que o Laboratório Pode Fazer Pelo Espermatozóide: cap11:81-90, 1999. **Sociedade Brasileira de Urologia.**
6. Ledger, W.L.; Anumba, D.; Marlow, N.: **The Costs to the NHS of Multiple Births After IVF treatment in UK. *BJOG*. 113:21-26, 2006.**
7. van Rooij, I.A.; Bancsi, L.F.; Broekmans, F.J.: **Women older than 40 years of age and those with elevated follicle-stimulating hormone levels differ in poor response rate and embryo quality in in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. 79: 482-490, 2003.**
8. Strandell, A.; Lindhard, A.: **Why does hydrosalpinx reduce fertility: The importance of hydrosalpinx fluid. *Human Reproduction*. 17: 1141 – 1150, 2002.**
9. Van Voorhis, B.J.: **Outcomes from assisted reproductive technology: *Obstetric and Gynecology*. 107: 183 – 198, 2006.**
10. Bhattacharya, S.; Hamilton, B.P.R.; Shaaban, M.: **Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for the treatment of non-male-factor infertility: a randomized controlled trial. *Lancet*. 357: 2075, 2001.**
11. van Rumste, M.M.; Evers, J.L.; Farquhar, C.M.: **Intra-cytoplasmic sperm injection versus conventional techniques for oocyte insemination during in vitro fertilization in patients with non-male subfertility. *Cochrane Database System Review*. CD001301, 2003.**
12. Boiso, I.; Veiga, A.; Edwards, R.G.: **Fundamentals of human embryonic growth in vitro and the selection of high-quality embryos for transfer. *Reproductive Biomedicine Online*. 5: 328, 2002.**
13. Veeck, L.L.: **An Atlas of Human Gamets and Conceptuses. Parthenon Publishing. 1999.**

14. Who Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction. 4th edition, Cambridge University Press, UK. *World Health Organization*, 1999.

PROCOLOS DE CRIOPRESERVAÇÃO EM LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA

1. Introdução

A criobiologia (estudo dos processos de congelamento de células e tecidos) tem permitido a preservação de células por tempos prolongados, geralmente com a manutenção de suas propriedades biológicas, uma vez descongeladas. Todas as células dos mamíferos funcionam com uma pequena variação de temperatura, que vai de 37°C a 39°C, e todas contêm água, tornando possível a criopreservação se forem resfriadas em nitrogênio líquido a - 196 °C . Isso significa que as células toleram a exposição a temperaturas não fisiológicas e a mudança do estado líquido para o sólido, já que o gelo se forma em uma temperatura pouco abaixo de 0° C. Os danos sofridos pelas células dos mamíferos durante a criopreservação estão diretamente ligados à velocidade de resfriamento e aquecimento das células.

A criopreservação é cada vez mais importante para a medicina reprodutiva. O principal objetivo de um programa de congelamento é causar o mínimo de dano possível no

momento em que os gametas, embriões e tecido germinativo estiverem expostos a uma temperatura muito baixa não-fisiológica. Quando os espermatozoides, os oócitos, os zigotos, e os pré-embriões estão expostos a soluções hipermolares, reagem a elas perdendo água. Quando alguns componentes são adicionados ao meio de criopreservação, a relação entre sobrevivência e temperatura pode ser drasticamente alterada. A sobrevivência das células e tecidos vivos criopreservados depende em grande parte do meio crioprotetor. Dessa maneira, a utilização de agentes crioprotetores adequados é indispensável para prevenir danos às células e tecidos germinativos.

Os protocolos usados hoje em dia envolvem, essencialmente, técnicas que permitem a desidratação da célula, prevenindo a formação de gelo intracelular, que pode causar danos pelo arrebentamento e dispersão das organelas celulares, ou por provocar quebras da membrana citoplasmática.. Quando os gametas ou embriões são colocadas em um meio contendo um agente de crioproteção intracelular, a água sai da célula devido à alta concentração extra-celular de crioprotetores . Isso causa o encolhimento da célula até o equilíbrio osmótico ser atingido pela difusão lenta dos crioprotetores para o interior celular. Para prevenir o super-resfriamento durante o congelamento, um cristal de gelo é introduzido num processo controlado chamado "seeding". Isto contribui para desidratação intracelular.

Um correto equilíbrio entre a velocidade de congelamento e a concentração do crioprotetor diminui os danos que o congelamento pode causar nas estruturas celulares no processo de desidratação. Se a taxa de resfriamento é muito rápida, a água não pode sair suficientemente rápido da célula e, ocorre a formação intensa de cristais de gelo. A taxa de penetração dos crioprotetores depende da temperatura; o equilíbrio é ativado rapidamente em altas temperaturas. Por esta razão, oócitos e embriões são usualmente colocados no meio de crioproteção em temperatura ambiente. Entretanto, como alguns crioprotetores, como o dimetilsulfóxido (DMSO), são tóxicos em elevadas concentrações, este é freqüentemente usado em baixas temperaturas para reduzir os efeitos adversos.

Se o resfriamento final ocorre a uma temperatura relativamente alta ($>-30^{\circ}\text{C}$) , a célula carrega mais gelo intracelular do que se o resfriamento for mais demorado, com baixas temperaturas ($<-80^{\circ}\text{C}$). Assim, para proteger a célula naquela situação, o descongelamento deve ser realizado rapidamente, induzindo a uma rápida dispersão do gelo. Inversamente, amostras resfriadas a $<- 80^{\circ}\text{C}$ devem ser descongeladas mais lentamente para permitir a re-hidratação gradual e evitar o risco de arrebentamento da célula. Desta maneira, amostras descongeladas são usualmente expostas progressivamente em diluições mais baixas de crioprotetores para removê-los da célula gradativamente.

1.1. Crioprotetores

- *estabilizam proteínas intracelulares.*
- *reduzem a formação de gelo intracelular.*
- *moderam o impacto da concentração de eletrólitos intra e extracelulares.*

- *hidrossolúveis.*
- *baixa toxicidade mesmo em concentrações elevadas.*
- *facilmente permeáveis às membranas da célula.*

- *Dimetilsulfóxido (DMSO), Propanodiol (PROH) e Glicerol (GLY) - agentes celulares com pequenas moléculas – facilmente permeáveis à membrana celular. DMSO e PROH são freqüentemente usados para congelamento de embriões em estágio de pouca divisão celular, e o glicerol é sempre usado para blastocistos.*
- *Sacarose – substância extracelular com grandes moléculas não permeáveis. Apresenta efeito osmótico, acelerando a desidratação da célula. Não pode ser usada isoladamente, é utilizada junto a crioprotetores intracelulares padrão.*

1.2. Amostras suscetíveis à criopreservação

- Espermatozóides
- Pré-zigotos em estágio de pronúcleo
- Embriões em estágio clivado
- Embriões em blastocisto
- Oócitos
- Tecido ovariano

2. Tipos de Congelamento

2.1 Lento ou Computadorizado

- *Interação das amostras com substância crioprotetora - equilíbrio.*
- *Transferência para recipiente apropriado*
- *Colocados na máquina de congelamento computadorizada.*
- *Programação das rampas de congelamento*
- *“Seeding” -*
- *Decréscimo lento da temperatura (TA até -30 ou -40 °C).*
- *Transferência para cilindro contendo nitrogênio líquido (-196 °C) onde são armazenados.*

Deve haver um correto equilíbrio entre a velocidade de congelamento e a concentração do crioprotetor.

2.2 Ultra-rápido

As amostras são colocadas em substância crioprotetora altamente concentrada (DMSO a 3,5 M e sacarose a 0,25M), onde permanecem por um breve período de equilíbrio e então são mergulhados diretamente no nitrogênio líquido. O congelamento é tão rápido que não permite a desidratação. O descongelamento é feito rapidamente em banho-maria à 37°C para remover o crioprotetor em um só passo.

O método ultra-rápido é bem mais simples e mais barato. Os resultados, entretanto, apresentam-se ainda inferiores aos encontrados no congelamento lento. Gordts et al, em 1990, relataram quatro casos de gravidez após o congelamento ultra-rápido de embriões. No estudo, alta taxa de sobrevivência foi observada em embriões congelados em prónucleos comparados a embriões clivados, achado condizente com outras pesquisas. Em contrapartida, Lai et al (1996), utilizando técnica de congelamento ultra-rápido, reportaram taxa de sobrevivência de 83% e de nascidos de 16% com embriões clivados. As estruturas mitocondriais e de outras organelas apresentaram-se preservadas após o processo de criopreservação.

2.3 Vitrificação

A vitrificação como técnica ultra-rápida de refrigeração baseia-se no contato direto entre a solução de vitrificação, que contém os agentes crioprotetores altamente concentrados, e o nitrogênio líquido. Em contraste com o protocolo de congelamento lento, durante a vitrificação a solução permanece completamente inalterada e a água não precipita, assim nenhum cristal de gelo é formado e ocorre a transformação instantânea de líquido em sólido. Os estudos de vitrificação iniciaram em 1987, com Rall, que submeteu embriões de ratos a esse processo de criopreservação. Kuleshova et al, em 1999, relataram o nascimento de uma menina saudável após a vitrificação de oócitos maduros de pacientes submetida à fertilização *in vitro*.

Os protocolos para vitrificação são simples, e permitem às células e tecidos serem colocados rapidamente em contato com os crioprotetores e mergulhados diretamente em nitrogênio líquido. Vários métodos diferentes foram usados para

vitrificar oócitos e embriões humanos antes da implantação, com diferentes taxas de sucesso. Os métodos incluem o uso de payettes convencionais, utilizando uma cânula denominada *cryoloop*, as OPS - *Open Pulled Straws* (Vajta et al, 1998; Chen et al, 2000); as pipetas de desnudação flexíveis - FDP (Liebermann et al, 2002) e as grades de microscopia eletrônica para sustentação (Martino et al, 1996 e Park et al, 1999).

Yoon et al e Yokota et al (2000); El-Danasouri e Selman (2001); Vanderzwalmen et al e Jelinkova et al (2002), concluíram que os embriões apresentam maiores índices de sobrevivência após a vitrificação do que os oócitos, porém Kuleshova et al (1999) e Lucena et al (2006) apresentaram estudo com gravidez e nativos após a vitrificação oocitária..

Com relação à vitrificação de tecido ovariano, poucas pesquisas foram realizadas. Em 2004, Hasegawa et al estabeleceram um modelo experimental em camundongos. Os autores concluíram que o método utilizado apresentou-se eficaz para o armazenamento de ovários, uma vez que os oócitos preservaram a capacidade de fertilização e desenvolvimento embrionário pré-implantação.

Yeoman, Wolf e Lee, em 2005, estudaram a criopreservação de tecido ovariano de macaco utilizando as técnicas de vitrificação e congelamento lento. Antes da análise de viabilidade folicular, algumas amostras do tecido descongelado foram colocadas em cocultura com fibroblastos fetais de camundongos com inativação de mitose. Os resultados levaram à conclusão de que a cocultura do tecido ovariano descongelado aumenta a porcentagem de folículos viáveis, e que o método de vitrificação de tecido ovariano é tão eficaz quanto o congelamento lento.

Ceschin et al, em 2005, compararam criopreservação por congelamento lento e vitrificação de tecido ovariano de ratas. O processo de vitrificação demonstrou menor grau de degeneração tissular e maior índice de viabilidade folicular.

Os crioprotetores utilizados na vitrificação são DMSO, EG e PROH, isolados ou em associação, adicionados à sacarose, sempre em altas concentrações.

A maioria dos protocolos de vitrificação segue o de Nakagata et al (1997), com algumas modificações.

A remoção do protetor é realizada por exposição progressiva da amostra em diluições mais baixas de crioprotetores, proporcionando a lenta retirada da célula.

Etapas da vitrificação:

- **Desidratação da amostra em duas etapas:**
Solução de equilíbrio: 15-20% de crioprotetores por 2-20 minutos.
Solução de vitrificação: 30-40% de crioprotetores por 20-90 segundos.
- **Colocação das amostras em OPS/Cryoloop/Cryotop/Cryotip - quantidade de meio de vitrificação é crítica.**
- **Colocação em nitrogênio líquido.**
- **Devitrificação - diluição dos crioprotetores em 3 etapas, com diminuição da concentração de sacarose:**

Solução de aquecimento: 1,0 M de sacarose

Solução de diluição: 0,5 M de sacarose

Solução de lavagem: sem sacarose.

3. Congelamento de espermatozóides

3.1 Indicações:

- **Criopreservação terapêutica:** manutenção de fertilidade em homens a serem submetidos à quimio ou radioterapia ou cirurgias que possam comprometer o potencial fértil (dissecção do retroperitônio, ressecção endoscópica da próstata, cirurgias envolvendo o colo da bexiga). A presença de tumores ou outras neoplasias, aliada às terapias de erradicação podem ter como resultado a indução de oligozoospermia ou mesmo de azoospermia, sendo essas alterações podendo ser temporárias ou definitivas.
- **Inseminação artificial ou fertilização *in vitro* com sêmen de doador** - Formação de banco de sêmen
- **Inseminação com sêmen do parceiro:** nos casos de ausência temporária ou definitiva do mesmo, baixa frequência sexual e disfunção erétil em procedimentos de inseminação intrauterina ou fertilização *in vitro*.
- **Preservação do material genético** - Pacientes que desejam ser submetidos à vasectomia, poderão guardar amostras de sêmen para serem utilizadas no futuro procedimentos de reprodução assistida.
- **Criopreservação dos espermatozóides obtidos durante microcirurgias** para reconstrução do sistema reprodutivo (reversão de vasectomia) ou por técnicas cirúrgicas do epidídimo ou do parênquima testicular (aspiração microcirúrgica do epidídimo; biópsia convencional ou microcirúrgica do testículo), para futura utilização em micromanipulação de gametas.
- **Criopreservação de sêmen de indivíduos que trabalham em profissões de alto risco** (mergulhadores de elevada profundidade, pilotos, indústrias químicas, exposição a agrotóxicos e pesticidas e exposição a radiações ionizantes).

3.2 Coleta das amostras:

Todos os pacientes que desejam criopreservar amostras seminais devem realizar, previamente ao procedimento, os seguintes exames: HIV I e II; HTLV I e II; VDRL; HBsAg; Anti-HBc; Anti-HBe; Anti-HBs; Anti-HCV; Grupo ABO; Fator Rh; Clamídia, Ureaplasma, Micoplasma, Gonorréia, Espermograma e Espermocultura. Os marcadores de hepatite e AIDS devem ser repetidos após 3 meses da coleta para afastar o risco de resultado falso negativo devido à janela imunológica.

3.3 Avaliação das amostras:

- Identificação adequada da amostra.
- Separação de uma alíquota para análise após a autoliquefação.
- São utilizados os critérios de análise:
 - Caracteres gerais: volume, pH, cor, aspecto, viscosidade, presença ou não de grumos e tempo de autoliquefação.
 - Contagem espermática inicial: número total de espermatozóides, células jovens, células epiteliais, leucócitos e hemácias.

- Motilidade, morfologia e viabilidade iniciais.

3.4 Taxas -Espermatozóides

- *Taxa de sobrevivência de espermatozóides criopreservados ⇒ 25 a 75%*
- *Taxas de gravidez (espermatozóides criopreservados) ⇒ semelhante à obtida com esperma a fresco.*

4. Congelamento de embriões:

4.1 Indicações:

- Preservar os pré-embriões formados após ciclos de FIV/ICSI, reduzindo o risco de gravidez múltipla e aumentando a chance de gravidez por ciclo.
- Aumentar a possibilidade de concepção em pacientes que não apresentem endométrio adequado após indução.
- Permitir posterior transferência embrionária em pacientes com hiperestimulação ovariana.
- Permitir a posterior transferência em casos de não-sincronia dos ciclos de doadora e receptora.
- Permitir a doação de embriões a casais impossibilitados de produzir seus próprios embriões.
- Possibilitar o armazenamento de embriões para pacientes a serem submetidas à quimio/radioterapia ou cirurgia ginecológica radical.

4.2 Pré-zigotos

O pré-zigoto, estágio de desenvolvimento do óvulo após a penetração do espermatozóide, se caracteriza pela presença, no centro da célula, de dois corpúsculos separados, que representam as cargas cromossômicas provindas do óvulo e do espermatozóide, os pronúcleos. O congelamento neste estágio celular tem sido realizado há mais de uma década e culminado em milhares de nascimentos. O fato da perda do fuso no pré-zigoto é, em grande parte, responsável pela excelente sobrevivência e potencial de implantação. Quando congelados pré-embriões em estágio de pró-núcleo, a seleção pode ser feita unicamente através da classificação baseada na posição, no alinhamento e no número de nucléolos, por isso a maioria dos centros prefere efetuar o congelamento após clivagem. A vantagem da criopreservação nesse estágio consiste no fato dos pronúcleos não apresentarem a decondensação dos núcleos, na qual um novo ser geneticamente identificado é formado, portanto diminui questões éticas associadas ao congelamento embrionário.

É de extrema importância congelar o pré-zigoto antes do desaparecimento dos pronúcleos, para garantir melhores resultados. A morfologia dos pré-zigotos descongelados é, geralmente, semelhante a sua aparência pré-congelamento, porém, ocasionalmente, o citoplasma é mais claro e há reduzido número de organelas em torno das estruturas pronucleares. Após o descongelamento os nucléolos são frequentemente vistos espalhados dentro dos pronúcleos apesar de seu prévio alinhamento nas junções pronucleares antes do congelamento. Pode ocorrer a condensação de dois pronúcleos em um grande pronúcleo durante o processo de criopreservação. Deixado em cultura por 15-24 horas, o pronúcleo saudável com completa o processo de fertilização, e prossegue para primeira clivagem, o que indica verdadeiramente a sobrevivência após o descongelamento; < 5% dos pré-zigotos que parecem estar saudáveis após o descongelamento falham no seguimento deste padrão.

4.3 Pré-embriões em clivagem

Como em oócitos em estágio de pronúcleo, os pré-embriões em clivagem se desenvolvem após o descongelamento e resultam em taxas aceitáveis de gestação. São comumente congelados, semelhantemente aos pré-zigotos, em soluções 1,5M de propanodiol associadas à sacarose.

O protocolo lento para criopreservação embrionária tem sido largamente utilizado desde o primeiro relato de gravidez obtida após o descongelamento de pré-embriões clivados, em 1983, por Trounson e Mohr.

Os pré-embriões clivados podem ser congelados quando se encontram com 2 a 8 células, sem necessidade de restrições com relação ao momento da criopreservação. Além dessa vantagem, o congelamento nesse estágio permite melhor seleção embrionária conforme as características morfológicas e conseqüentemente otimizar as taxas de sobrevivência e implantação. Tornou-se mais comum escolher os melhores embriões para transferência a fresco e congelar todos os outros com boa morfologia somente após ter sido feita a seleção a fresco.

O descongelamento pode resultar em pré-embriões com blastômeros vivos e mortos, o que se apresenta como a desvantagem desse processo, já que a avaliação da viabilidade torna-se mais difícil. Cultivar esse pré-embrião por 18 a 24 horas pode confirmar viabilidade, se ocorrer uma ou duas divisões nesse período. Em geral, um pré-embrião que possui mais de 50% de blastômeros viáveis no descongelamento é considerado um sobrevivente. Não existe evidência convincente de que a perda de um ou dois blastômeros é claramente danosa para os pré-embriões no seu desenvolvimento inicial. Apesar disso, tem sido relatado que pré-embriões humanos inteiramente intactos demonstram uma taxa de implantação mais elevada do que aqueles parcialmente intactos.

Devem ser congelados nesse estágio os embriões remanescentes, após transferência, com características morfológicas satisfatórias – zona pelúcida íntegra, clivados no dia 2 para dia 3, que apresentarem blastômeros simétricos ou com discreta assimetria e com menos de 50% de fragmentação. Os demais embriões devem ser mantidos em cultura até dia 5, quando serão congelados somente os blastocistos viáveis.

4.4 Blastocistos

Existe uma tendência crescente em cultivar o embrião até estágio de blastocisto em alguns centros com intuito de sincronizar de maneira mais efetiva esse estágio e o desenvolvimento endometrial e assim selecionar os embriões com maior potencial de implantação e reduzir a frequência de gestações múltiplas. Conseqüentemente, ocorre o aumento na rotina de congelamento de blastocistos expandidos. Vários autores têm relatado o sucesso do congelamento e nascidos vivos, e muitos deles usaram sistemas de co-cultura para suportar o crescimento dos pré-embriões, porém a taxas de implantação de blastocistos descongelados não é melhor do que a de embriões em estágio de clivagem, apesar da melhor seleção.

Em centros onde o cultivo de blastocisto não é rotina, é difícil conseguir uma amostra satisfatória para criar um parâmetro de sucesso da criopreservação em blastocisto.

4.5 Vitriificação de embriões

O primeiro relato de gravidez após vitriificação de embriões humanos data de 1990 (Gordts et al). Os resultados clínicos decorrentes de blastocistos vitriificados permanecem controversos (Hartshorne et al, 1991; Menezo et al, 1992; Choi et al., 2000).

Porém Huang et al, em 2005, realizaram a criopreservação de blastocistos de camundongos e humanos utilizando um novo protocolo de vitriificação, realizado em duas etapas, e alcançaram alta taxa de sucesso. No estudo, os blastocistos foram vitriificados em *cryoloops* após tratamento em solução de vitriificação (VS) 50% e 100% (solução composta por 20% EG, 20% DMSO e 0,5 mol/l de sucrose de mol/l em meio HTF, suplementado com 20% soro-albumina humano) por 2 minutos e 30 segundos, respectivamente. Os embriões foram devitriificados após tratamento em 0,25 e 0,125 mol/l de sucrose por 2 e 3 min, respectivamente. O índice de sobrevivência dos blastocistos de camundongos foi de 87% e taxa de prenhez de 50%. Os blastocistos humanos devitriificados atingiram índice de sobrevida de 77,1% e taxa de gravidez de 53,8%, levando os autores a concluir que a criopreservação por vitriificação apresenta-se como uma alternativa viável ao congelamento embrionário por protocolo lento.

4.6 Taxas de implantação e nascimentos com embriões criopreservados

Atualmente, ao descongelar embriões, as taxas de sobrevida flutuam entre 40 e 100%. Essas taxas têm relação, acima de tudo, com o potencial biológico dos embriões, previamente ao congelamento. É altamente provável que aqueles embriões que não sobrevivem ao serem descongelados, são os mesmos que não teriam atingido o desenvolvimento embrionário até a implantação.

A taxa de gravidez clínica ao transferir embriões congelados é inferior à obtida com embriões frescos, porém varia também conforme a idade da paciente e o número de embriões transferidos, como indicam a tabela 1 e 2.

Tabela 1 - Taxa de gravidez com transferência de embriões a fresco e criopreservados -
 Fonte: REDLARA 2003

	FIV a fresco	ICSI a fresco	FIV Crio	ICSI Crio
Transferências	3344	8874	592	1434
Gravidez clínica	1136	2936	11.6	234
% gravidez	33,97%	33,08%	19,59%	16,31%

Tabela 2 - Taxa de gravidez com transferência de embriões criopreservados de acordo com a idade da paciente - Fonte: 2003 - REDLARA

TASA DE EMBARAZO CLÍNICO CON TRANSFERENCIA DE EMBRIONES CRIOPRESERVADOS DE ACUERDO A LA EDAD DE LA MUJER (2003)			
Nº EMBRIONES	EMBRIONES CRIOPRESERVADOS		
	EDAD (años)	Nº TRANSFERENCIAS	TASA EMBARAZO
UNO	< 35	99	7,1%
	35-39	65	4,6%
	≥ 40	23	0,0%
	SUBTOTAL	187	5,3%
DOS	< 35	333	14,7%
	35-39	173	11,0%
	≥ 40	44	6,8%
	SUBTOTAL	550	12,9%
TRES	< 35	397	20,4%
	35-39	213	15,0%
	≥ 40	61	19,7%
	SUBTOTAL	671	18,6%
CUATRO	< 35	256	27,7%
	35-39	153	21,6%
	≥ 40	44	11,4%
	SUBTOTAL	453	24,1%

5. Congelamento de oócitos

A criopreservação de oócitos humanos ainda é uma metodologia em desenvolvimento, apesar das primeiras gestações pós-descongelamento já terem sido descritas em meados da década de oitenta (Chen, 1986; Van Uem et al, 1987).

A possibilidade de criopreservação de oócitos humanos e seu armazenamento por tempo indeterminado poderiam beneficiar tanto pacientes com neoplasias que apresentam risco de tornar-se estéreis após a terapia quanto mulheres que pretendam postergar a gravidez.. A outra indicação seria reduzir os conflitos éticos e religiosos associados ao congelamento e armazenamento de embriões, já que a tendência atual constitui a transferência de embrião único, assim, a produção de números excessivos de embriões parece cada vez mais imprópria. Pacientes submetidas a tratamentos de FIV ou ICSI que

obtiverem um grande número de oócitos poderiam congelar os excedentes e utilizá-los em uma outra tentativa ou ainda doá-los a um banco de óvulos.

6. Criopreservação de tecido ovariano:

Enquanto a criopreservação do sêmen está disponível para homens, os protocolos de preservação de oócitos permanecem aquém do desejado e ainda não há método apropriado para crianças pré-púberes. As vantagens da criopreservação do tecido ovariano no lugar dos oócitos incluem a abundância de oócitos disponíveis numa fase de maturação em que são menos susceptíveis aos danos potenciais do procedimento, além de dispensar o uso de TRA. Uma desvantagem a ser considerada é a possibilidade de se reimplantar células cancerosas em pacientes já tratados. Dessa forma, a criopreservação de tecido ovariano, embora promissora, precisa ser melhor estudada antes de ser oferecida como alternativa para preservação da fertilidade.

Atualmente, o congelamento lento e a vitrificação têm sido estudados no processo de criopreservação de tecido ovariano, utilizando diversos protocolos, com diferentes crioprotetores. A idéia principal do procedimento é congelar os folículos primordiais imaturos *in situ* no córtex ovariano, já que se sabe que esses folículos são os que sobrevivem à criopreservação.

7. Protocolos utilizados em criopreservação de células e tecidos germinativos em humanos:

7.1 Protocolo de criopreservação seminal:

Verheyen et al (1993)

Agca e Crister (2002)

Leibo et al (2002)

Schuster et al (2003)

Isachenko et al (2004)

7.2 Protocolos de congelamento de pré-zigoto em pronúcleo e pré-embriões clivados - PROH e sucrose

Baker et al (1991)

Testart et al (1986)

7.3 Protocolos de congelamento de pré-embriões em estágio de blastocisto - GLY e sucrose

Gardner (1999)

Menezo et al (1992,1996)

7.4 Protocolos de vitrificação de embriões -

Nakagata (1997)

Lane et al (1999)

7.5 Protocolos de congelamento de oócitos -

Chen (1986)

Van Uem (1987)

Tucker et al (1998)

Porcu (1997, 2001)

Stachecki (1998, 2002, 2004)

Quintas et al (2002)

7.6 Protocolos de vitrificação de oócitos -

Stachecki JJ e Cohen , 2004

Kuleshova et al (1999)

Lucena et al (2006)

7.7 Protocolos de congelamento de tecido ovariano -

Newton et al (1996)

Almodin et al (2004) - fase experimental

7.8 Protocolos de vitrificação de tecido ovariano -

Martinez-Madrid (2004)

Ceschin et al (2005) - fase experimental

Gandolfi et al (2006)

Referências Bibliográficas:

Agca Y, Critser JK. Cryopreservation of spermatozoa in assisted reproduction. *Semin Reprod Med.* 2002 Feb;20(1):15-23. Review.

Almodin CG, Minguetti-Camara VC, Meister H, Ceschin AP, Kriger E, Ferreira JO. Recovery of natural fertility after grafting of cryopreserved germinative tissue in ewes subjected to radiotherapy. *Fertil Steril* 2004; 81:160-4.

Ceschin AP. Utilização de técnica histológica e marcação imunohistoquímica com Ki-67 na avaliação da viabilidade de ovário criopreservado por congelamento lento e vitrificação - estudo em ratos. Tese (Doutorado) - Faculdade Evangélica do Paraná, Instituto de Pesquisas Médicas. Curitiba, 2005.

Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet.* 1986 Apr 19;1(8486):884-6.

Chen SU, Lien YR, Chao KH, Lu HF, Ho HN, Yang YS. Cryopreservation of mature human oocytes by vitrification with ethylene glycol in straws. *Fertil Steril* 2000; vol.74, n.4, p.804-8.

Choi DH, Chung HM, Lim JM, Ko JJ, Yoon TK, Cha KY. Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitrified blastocysts in an IVF-ET program. *Fertil Steril.* 2000 Oct;74(4):838-9.

El-Danasouri I, Selman H. Successful pregnancies and deliveries after a simple vitrificação protocol for day 3 human embryos. *Fertil. Steril* 2001,vol.76, p.400-2.

Ferriani RA, Navarro PAAS. *Protocolos de condutas em infertilidade conjugal.1a. Edição.*São Paulo: Conexão Brasil, 2004, 207p.

Gandolfi F, Paffoni A, Papasso Brambilla E, Bonetti S, Brevini TA, Ragni G. Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. *Fertil Steril.* 2006 Apr;85 Suppl 1:1150-6.

Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 1999 Jun;11(3):307-11. Review.

Gordts S, Roziars P, Campo R, Noto V. Survival and pregnancy outcome after ultrarapid freezing of human embryos. *Fertil Steril.* 1990 Mar;53(3):469-72.

Hartshorne GM, Elder K, Crow J, Dyson H, Edwards RG. The influence of in-vitro development upon post-thaw survival and implantation of cryopreserved human blastocysts. *Hum Reprod.* 1991 Jan;6(1):136-41.

Hovatta O. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online.* 2005 Jun;10(6):729-34. Review.

Huang C, Lee T, Chen S, Chen H et al. Successful pregnancy following blastocyst cryopreservation using super-cooling ultra-rapid vitrification. *Human Reproduction* 2005, 20(1):122-128.

Isachenko V, Isachenko E, Katkov II, Montag M, Dessole S, Nawroth F, Van Der Ven H. Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability. *Biol Reprod.* 2004 Oct;71(4):1167-73.

Jelinkova L, Selman HA, Arav A, Strehler E, Reeka N, Sterzik K. Twin pregnancy after vitrificação of 2-pronuclei human embryos. *Fertil Steril* 2002, vol 77, p.412-4.

Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Hum Reprod.* 1999 Dec;14(12):3077-9.

Lai AC, Lin BP, Chang CC, Tsai HD, Hwang VW, Lo HY. Pregnancies after transfer of ultrarapidly frozen human embryos. *J Assist Reprod Genet.* 1996 Sep;13(8):625-8.

Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil Steril.* 1999 Dec;72(6):1073-8.

Leibo SP, Picton HM, Gosden RG. Cryopreservation of human spermatozoa. In *Current Practice and Controversies in Assisted Reproduction - Report of a World Health Organization, Switzerland.* 2002.

Liebermann J, Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Tucker MJ. Potential Importance of Vitrification in Reproductive Medicine. *Biol. Reprod* 2002, vol.67, p.1671 – 80.

Liebermann J, Tucker M, Graham J, Taylor H, Davis D, Levy MJ. Blastocyst development after vitrification of multipronucleate zygotes using the flexipet-denuding pipette (FDP). *RBM Online* 2002, vol.4, p.148-52.

Lucena E, Bernal DP, Lucena C, Rojas A, Moran A, Lucena A. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. *Fertil Steril.* 2006 Jan;85(1):108-11.

Martinez-Madrid B, Dolmans MM, Van Langendonck A, Defrere S, Donnez J. Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. *Fertil Steril.* 2004 Nov;82(5):1390-4.

Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol. Reprod.* 1996, vol.54, p.1059–69.

Menezo Y, Nicollet B, Herbaut N, Andre D. Freezing cocultured human blastocysts. *Fertil Steril.* 1992 Nov;58(5):977-80.

Menezo Y. Cryopreservation of IVF embryos: which stage? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004 Apr 5;113 Suppl 1:S28-32. Review.

Menezo YJ, Sakkas D, Janny L. Co-culture of the early human embryo: factors affecting human blastocyst formation in vitro. *Microsc Res Tech.* 1995 Sep 1;32(1):50-6. Review.

Nakao K, Nakagata N, Katsuki M. Simple and efficient vitrification procedure for cryopreservation of mouse embryos. *Exp Anim.* 1997 Jul;46(3):231-4.

Newton H, Aubard Y, Rutherford A, Sharma V, Gosden R. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 1996; 11:1487-91.

Park SP, Kim EY, Kim DI, Park NH, Won YS, Yoon SH, Chung KS, Lim JH. Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscopic grid. Hum. Reprod 1999, vol.14, p.2838-43.

Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, Ciotti PM, Magrini O, Flamigni C. Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. Fertil Steril. 1997 Oct;68(4):724-6.

Porcu E. Oocyte Cryopreservation. In Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. (eds) Textbook of Assisted Reproductive Techniques: Laboratory and Clinical Perspectives. Martin Dunitz Ltd, London, UK. 2001.

Quintas CJ, Donaldson MJ, Bertolino MV, Pasqualini RS. Birth of two babies using oocytes that were cryopreserved in a choline-based freezing medium. Human Reproduction 2002, 17(12): 3149-3152.

Rall WF. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by **vitrification**. Cryobiology 1987; 24:387-402..

Schuster TG, Keller LM, Dunn RL, Ohl DA, Smith GD. Ultra-rapid freezing of very low numbers of sperm using cryoloops. Hum Reprod. 2003 Apr;18(4):788-95.

Stachecki JJ, Cohen J, Schimmel T, Willadsen SM. Fetal development of mouse oocytes and zygotes cryopreserved in a nonconventional freezing medium. Cryobiology 2002, 44: 5-13.

Stachecki JJ, Cohen J, Willadsen SM. Cryopreservation of unfertilized mouse oocytes: the effect of replacing sodium with choline in the freezing medium. Cryobiology. 1998 Dec;37(4):346-54.

Stachecki JJ, Cohen J. An overview of oocyte cryopreservation. Reprod Biomed Online. 2004 Aug;9(2):152-63. Review.

Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. Nature. 1983 Oct 20-26;305(5936):707-9.

Tucker M, Morton P, Liebermann J. Human oocyte cryopreservation: a valid alternative to embryo cryopreservation? Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2004 Apr 5;113 Suppl 1:S24-7. Review.

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

Van Uem JF, Siebzehnruhl ER, Schuh B, Koch R, Trotnow S, Lang N. Birth after cryopreservation of unfertilized oocytes. Lancet. 1987 Mar 28;1(8535):752-3.

Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche CH, Standaert V, van Roosendaal E, Vandervorst M, Bollen N, Zech H, Mukaida T, Takahashi K, Schoysman R. Births after vitrificação at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrificação. Hum Reprod 2002, vol.17, p.744-751.

Verheyen G, Pletinckx I, Van Steirteghem A. Effect of freezing method, thawing temperature and post-thaw dilution/washing on motility (CASA) and morphology characteristics of high-quality human sperm. Hum Reprod. 1993 Oct;8(10):1678-84.

Yeoman RP, Wolf DP, Lee DM. Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow rate freezing. Fertil Steril 2005, vol.83, suppl 1, p.1248-54.

Yokota Y, Sato S, Yokota M, Yhikawa Y, Makita M,Asada T, raki Y Successful pregnancy following blastocyst vitrificação. Hum. Reprod. 2000, 15:1802-3.

Yoon TK, Chung HM, Lim JM, Han SY, Ko JJ, Cha KY. Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitrified oocytes in a stimulated in vitro fertilization-embryo transfer program [letter]. Fertil. Steril. 2000, vol.74, p.180-1.