

# SBRH

Sociedade Brasileira de Reprodução Humana

ISSN 1413-2087

# Reprodução & Climatério

Sociedade Brasileira de Reprodução Humana

VOLUME 28 • Nº 3 • Setembro/Dezembro 2013

## Editorial

Mortalidade materna no Brasil. Insucesso no cumprimento do quinto Objetivo de Desenvolvimento do Milênio

## Artigos Originais

Cultura de células da granulosa humanas com fenótipo de fase folicular: influência do sistema quimicamente definido na morfologia, ultraestrutura, secreção de esteroides e relaxina

Produção de oócitos em mamíferos adultos: o camundongo como modelo

Prevalência de *Chlamydia trachomatis* em mulheres submetidas à fertilização assistida em Goiânia

## Artigos de Revisão

O impacto da criopreservação na qualidade seminal

Histerectomia total e subtotal: há diferença quanto ao impacto na sexualidade?

Biópsia embrionária: qual a melhor escolha?

## Relato de Caso

Gestação gemelar com mola hidatiforme completa e feto vivo após ovodação e fertilização *in vitro*: relato de caso



Volume 28 • Número 3 • Setembro/Dezembro 2013

## SUMÁRIO

### Editorial

Mortalidade materna no Brasil. Insucesso no cumprimento do quinto Objetivo de Desenvolvimento do Milênio

*Jefferson Drezett* ..... 89

### Artigos Originais

Cultura de células da granulosa humanas com fenótipo de fase folicular: influência do sistema quimicamente definido na morfologia, ultraestrutura, secreção de esteroides e relaxina

*Alessandra Aparecida Vireque, Jacira Ribeiro Campos, Carolina Oliveira Campos, Marcelo Picinin Bernuci, Maria Célia Jamur, Rui Alberto Ferriani, Marcos Felipe Silva de Sá e Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva* ... 92

Produção de oócitos em mamíferos adultos: o camundongo como modelo

*Daniel Blasioli Dentillo, Jacira Ribeiro Campos, Alfredo Ribeiro da Silva, Sérgio Britto Garcia, Marcos Felipe Silva de Sá e Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva* ..... 104

Prevalência de *Chlamydia trachomatis* em mulheres submetidas à fertilização assistida em Goiânia

*Isabela Aparecida Carvalho Proto, Jéssyka de Menezes Carneiro, Xisto Sena Passos, Fábio Silvestre Ataídes e Waldemar Naves do Amaral* ..... 108

### Artigos de Revisão

O impacto da criopreservação na qualidade seminal

*Vivian Taís Fernandes Cipriano e Gilberto da Costa Freitas* ..... 112

Histerectomia total e subtotal: há diferença quanto ao impacto na sexualidade?

*Lucian Pereira de Sousa, Marcelo José Gonçalves, Fabiene Valle e Selmo Geber* ..... 117

Biópsia embrionária: qual a melhor escolha?

*Aleister Crowley de Aquino, Ana Carolina Nogueira Martinhago e Ciro Dresch Martinhago* ..... 122

### Relato de Caso

Gestação gemelar com mola hidatiforme completa e feto vivo após ovodocação e fertilização *in vitro*: relato de caso

*Sofia Andrade de Oliveira, Lídia Lima Aragão Sampaio, Tulia Kleveston e Vamberto Oliveira de Azevedo Maia Filho* ..... 130



ELSEVIER

## Reprodução & Climatério

<http://www.sbrh.org.br/revista>


### Editorial

## Mortalidade materna no Brasil. Insucesso no cumprimento do quinto Objetivo de Desenvolvimento do Milênio

### Maternal mortality in Brazil. Failure to comply with the fifth Millennium Development Goal



Os Objetivos de Desenvolvimento do Milênio (ODM) foram estabelecidos em 2000 pela Declaração do Milênio da Organização das Nações Unidas (ONU). O documento, adotado por 191 Estados-membros, busca sintetizar os vários acordos firmados nas cúpulas mundiais, principalmente ao longo dos anos 1990, como a Rio-92. A Declaração do Milênio estabelece compromissos concretos que, cumpridos nos prazos planejados, levariam a uma significativa melhoria na qualidade de vida da humanidade até 2015. São oito objetivos, que incorporam 22 metas e 48 indicadores, os quais podem ser acompanhados, comparados e avaliados. Esses referenciais devem ser acessíveis às populações, que têm o direito de monitorar sua evolução e de exigir de seus representantes o cumprimento dos resultados.<sup>1</sup>

De fato, os ODM despertam a necessidade de enfrentar e, se possível, erradicar algumas históricas mazelas sociais: a pobreza extrema, a fome, a falta de acesso à educação de qualidade, a iniquidade de gênero, as doenças e mortes evitáveis, a exploração predatória do ambiente, a precariedade das condições de vida. Nesse sentido, o quinto ODM trata especificamente das condições de saúde das gestantes, com duas metas para serem atingidas no próximo ano: a redução da mortalidade materna em três quartos do nível observado em 1990 e a universalização do acesso à saúde sexual e reprodutiva.<sup>1</sup>

A preocupação da ONU ao estabelecer o quinto ODM procede e merece atenção. Os dados indicam que a atual razão de mortalidade materna nos países em desenvolvimento é de 230 por 100 mil nascidos vivos, enquanto que nos países desenvolvidos a média é de 16 por 100 mil. Essa proporção 14,3 vezes maior, mais do que perversa, desvela uma grave fissura social nos países em desenvolvimento: quase 99% das mortes maternas ocorrem nesses países e atingem, principalmente,

mulheres pobres e vulneráveis.<sup>2</sup> Não há como obscurecer uma vergonhosa situação de iniquidade no acesso aos serviços qualificados de saúde reprodutiva para as gestantes que deles mais necessitam.

A maioria dessas mortes maternas decorre de complicações que se estabelecem durante a gestação. Cerca de 80% dos casos envolvem hemorragias graves, infecções, hipertensão gestacional e abortamentos inseguros. A Organização Mundial da Saúde (OMS) assegura que parte expressiva dessas mortes é evitável, considerando-se que os meios necessários para prevenir e tratar essas complicações são bem conhecidos.<sup>3</sup>

Em síntese, todas as mulheres necessitam de acesso à assistência pré-natal de qualidade, atenção ao parto em condições seguras e cuidados apropriados depois dele. Contudo, a OMS adverte que os principais fatores que obstaculizam a assistência adequada para mulheres durante a gestação e o parto ainda são a pobreza, a distância dos serviços de saúde, a falta de informação, a escassez de serviços de saúde adequados e, em alguns países, antigas práticas culturais.<sup>3</sup>

Como resultado, morrem 800 mulheres no mundo a cada dia por complicações evitáveis relacionadas com a gestação, o parto e o puerpério.<sup>2</sup> Mas os esforços para reduzir esse número no mundo devem ser ressaltados. Desde 1990, vários países africanos reduziram as taxas de mortalidade materna quase à metade. Na América Latina a queda foi de 45%: passou-se de 130 para 72 óbitos maternos por 100 mil nascidos vivos. Mesmo assim, a razão de mortalidade materna vem sendo reduzida no ritmo de apenas 2,6% ao ano, quando o necessário seria de 5,5% para alcançar o quinto ODM.<sup>2,3</sup> É dado como certo que grande parte dos países em desenvolvimento não conseguirá atingir a primeira meta.

O Brasil também mostra avanços no enfrentamento da mortalidade materna. Os 141 óbitos maternos por 100 mil nascidos vivos em 1990 foram reduzidos para 64,8 por 100 mil em 2011. A variação nesse período se deve, principalmente, à queda de 67% dos óbitos maternos por causas diretas, de 126 para 43 mortes maternas por 100 mil nascidos vivos. Esse declínio anual de 5,1% é o mais promissor e próximo do necessário.<sup>4</sup>

Contudo, é seguro que a meta de reduzir a razão de mortalidade materna não será alcançada pelo Brasil em 2015. Os índices divulgados pela OMS, em 2013, mostram que no país ainda ocorrem 68,2 óbitos por 100 mil nascidos vivos, pouco menos do que o dobro da meta estabelecida pela ONU, de 35 óbitos por 100 mil.<sup>2</sup> A segunda meta também não será atingida, embora esteja mais próxima. Em 2011, 99% dos partos foram assistidos em estabelecimentos de saúde e quase 90% das gestantes concluíram quatro ou mais consultas pré-natais. Esse indicador está mais distante dos países em desenvolvimento, com 66% dos partos assistidos adequadamente e 51% das gestantes recebendo o número mínimo de consultas pré-natais.<sup>4</sup>

O insucesso brasileiro em relação ao óbito materno contrasta com o cumprimento dos outros sete ODM. Esse contraste é ainda maior quando se analisam as justificativas e os argumentos para não se ter alcançado o objetivo. A publicação do governo federal *Objetivos de Desenvolvimento do Milênio: Relatório Nacional de Acompanhamento*, lançada em 2014,<sup>4</sup> preocupa-se notadamente em valorar os avanços em relação a 1990, bem como em destacar uma situação mais favorável do que a média dos países em desenvolvimento, inclusive os da América Latina.

O referencial do governo brasileiro quanto à morte materna parece mais vinculado à lógica secular dos países em desenvolvimento e de suas trágicas estimativas e menos voltado para incorporar as lições exitosas e os modelos bem-sucedidos dos países desenvolvidos, que adotam a perspectiva de respeito aos direitos humanos e reprodutivos das mulheres. Repete-se, portanto, a desigualdade social e econômica como fator preponderante no óbito materno: mulheres negras e pobres, em plena idade reprodutiva, ainda são as que mais morrem no Brasil, principalmente das regiões menos favorecidas.

Contudo, explicar as dificuldades de reduzir a mortalidade materna no Brasil não pode ser minimizado apenas pela perspectiva econômica regional, ainda que seja um fato. Dados do Ministério da Saúde indicam que a razão de mortalidade materna no Estado de São Paulo foi de 40,8 por 100 mil nascidos vivos em 2011. Embora menor do que a média nacional, de 64,8 por 100 mil, no mesmo ano, a situação de São Paulo também supera os 35 óbitos por 100 mil desejados. Além disso, observa-se agravo injustificável dos números em relação a 2003, quando foram registrados 32,4 óbitos por 100 mil. Ainda no Sudeste brasileiro, o Estado do Rio apresentou razão de mortalidade materna de 74,3 por 100 mil, consideravelmente acima da média nacional. Por outro lado, Santa Catarina reduziu a morte materna para 25,2 por 100 mil, índice que atende à meta do quinto ODM.<sup>5</sup>

A publicação *Objetivos de Desenvolvimento do Milênio: Relatório Nacional de Acompanhamento* também mostra pouca

disposição de expor claramente as dificuldades que persistem no país para reduzir a morte materna e retém-se em generalidades. Entre as poucas explicações, alega-se como fator importante no óbito materno o crescimento do nascimento por cesárea, o qual saltou de 41% dos partos em 1996 para quase 54% em 2011.<sup>4</sup> Não cabe contestar a extravagância desses números comparados com os dos países desenvolvidos, nem seus efeitos maternos e perinatais. Mas é incompreensível que graves questões de saúde pública, a exemplo do abortamento inseguro, sequer sejam lembradas nesse documento.

A interrupção da gravidez em condições clandestinas é a quarta causa de mortalidade materna no país. O abortamento é a primeira causa de óbito materno em Salvador desde 1990 e a terceira em São Paulo. Mais uma vez, mulheres negras têm maior risco de morrer do que as brancas, por serem mais pobres e por enfrentarem maior dificuldade de acesso aos serviços de saúde de qualidade.<sup>6</sup> O problema pode ser ainda maior se admitirmos que entre as mortes maternas por causas obstétricas diretas, as relacionadas com complicações do abortamento são reconhecidamente subnotificadas, por razões culturais e consequências legais.<sup>2,3</sup>

A relação entre o abortamento inseguro e a mortalidade materna é contundente nos países em desenvolvimento.<sup>6</sup> Na América Latina e no Caribe, morrem 30 mulheres a cada 100 mil interrupções da gestação e na Ásia 160 a cada 100 mil.<sup>3</sup> Mas o impacto é desproporcionalmente maior nos países africanos, onde a taxa média de letalidade do abortamento inseguro é de 460 por 100 mil procedimentos.<sup>7</sup> Nos países subsaarianos ela é ainda maior e atinge 520 óbitos por 100 mil.<sup>3</sup> Em contraste, nos países em que o abortamento induzido é feito em condições legais e seguras, a letalidade é de 0,7 por 100 mil interrupções, diferença até 742,8 vezes menor.<sup>8</sup>

Embora o abortamento inseguro seja apenas um dos fatores que pesam sobremaneira na mortalidade materna no Brasil, a diferença em relação às práticas seguras nos países desenvolvidos legitima a OMS considerar esses óbitos como aqueles com o maior potencial de serem evitados.<sup>2,9</sup> Mesmo assim, a prestação de contas da autoridade brasileira omite a questão do abortamento, possivelmente por temer críticas e represálias políticas das bancadas religiosas no Congresso Nacional, sempre indiferentes às mortes dessas mulheres. Com a mesma precaução, a Rede Cegonha, lançada em 2011 com objetivo de reduzir a mortalidade materna e perinatal, também não torna explícita qual a sua política pública frente ao abortamento.

As políticas públicas em relação à mortalidade materna no Brasil são insuficientes e falhas para responder ao problema. Mahmoud Fathala, ex-presidente da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (Figo), assinala que “as mulheres não estão morrendo por doenças sem tratamento, mas sim porque sociedades inteiras ainda estão decidindo se a vida dessas mulheres merece ser salva”. É preciso reconhecer na mortalidade materna um drama violento, evitável, inaceitável. E, ao mesmo tempo, um indicador sensível do respeito que uma nação tem pela saúde e pelos direitos humanos e reprodutivos das mulheres. Diferentemente do que apregoava Martinho Lutero, no século XVI, ao se referir ao óbito materno: “Elas que fiquem parindo filhos até morrer por isso (...). É para isso que as mulheres existem”.

## REFERÊNCIAS

1. United Nations [homepage na internet]. Millennium Development Goals and beyond 2015. [acesso em 29 mai 2014]. Disponível em: <http://www.un.org/millenniumgoals/>
2. World Health Organization [homepage na internet]. Mortalidad materna: nota descritiva 348. May 2014 [acesso em 4 jun 2014]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs348/es/>
3. World Health Organization. Unsafe abortion: global and regional estimates of the incidence of unsafe abortion and associated mortality in 2008. World Health Organization. 6th ed. Geneva: World Health Organization; 2011.
4. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (Ipea). Objetivos de Desenvolvimento do Milênio: Relatório Nacional de Acompanhamento. Brasília: Ipea; 2014.
5. Brasil. Ministério da Saúde [homepage na internet]. Indicadores e dados básicos. Brasil – 2012 [acesso em 4 mar 2014]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2012/C03b.htm>
6. Andreoni S, Silva RS, Drezett J. Who is more likely to have had an induced abortion? A pooled analysis of three studies in women with history of pregnancy in the city of São Paulo (SP), Brazil. *Reprod Clim.* 2012;27(2):41–6.
7. Shah I, Ahman E. Unsafe abortion: global and regional incidence, trends, consequences and challenges. *J Obstet Gynaecol Can.* 2009;31(12):1149–58.
8. Bartlett LA, Berg CJ, Shulman HB, Zane SB, Green CA, Whitehead S, et al. Risk factors for legal induced abortion-related mortality in the United States. *Obstet Gynecol.* 2004;103(4):729–37.
9. Victora CG, Aquino EM, do Carmo Leal M, Monteiro CA, Barros FC, Szwarcwald CL. Maternal and child health in Brazil: progress and challenges. *Lancet.* 2011;377(9780):1863–76, doi: 10.1016/S0140-6736(11)60138-4.

Jefferson Drezett

Editor da Revista Reprodução & Climatério e Coordenador do Núcleo de Violência Sexual e Aborto Legal do Hospital Pérola Byington

E-mail: [jdrezett@gmail.com](mailto:jdrezett@gmail.com)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.recli.2014.06.003>

1413-2087/\$ – see front matter

© 2014 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana.

Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.



ELSEVIER

## Reprodução & Climatério

<http://www.sbrh.org.br/revista>


### Artigo original

# Cultura de células da granulosa humanas com fenótipo de fase folicular: influência do sistema quimicamente definido na morfologia, ultraestrutura, secreção de esteroides e relaxina<sup>☆</sup>

Alessandra Aparecida Vireque<sup>a</sup>, Jacira Ribeiro Campos<sup>a</sup>, Carolina Oliveira Campos<sup>a</sup>, Marcelo Picinin Bernuci<sup>a</sup>, Maria Célia Jamur<sup>b</sup>, Rui Alberto Ferriani<sup>a</sup>, Marcos Felipe Silva de Sá<sup>a</sup> e Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

<sup>b</sup> Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

#### INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

##### Histórico do artigo:

Recebido em 19 de novembro de 2012

Aceito em 14 de dezembro de 2012

On-line em 5 de dezembro de 2013

##### Palavras-chave:

Células da granulosa

Sistema quimicamente definido

Luteinização

Ultraestrutura

Esteroides

Relaxina

Maturação *in vitro*

Técnicas de reprodução assistida

#### R E S U M O

Está bem descrito na literatura o padrão de cultivo de células da granulosa (CG) humanas que perpetua a luteinização, simulando a fase lútea do ciclo. Nesse sistema, há redução na secreção de estradiol (E2) e aumento na síntese de progesterona (P4) e relaxina (RLN). Objetivamos padronizar um sistema de cultura livre de soro, com o intuito de reverter o processo de luteinização de CG obtidas em ciclos de fertilização *in vitro* (FIV), pré-luteinizadas pela gonadotrofina coriônica humana (hCG), para aplicação na maturação *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais. Foi feito estudo experimental com GC obtidas de 10 mulheres em tratamento de reprodução assistida. As CG foram cultivadas em  $\alpha$ -MEM contendo IGF-I, ITS, androstenediona, PVP-40 (meio quimicamente definido) ou TCM-199 contendo FSH/soro. Após 48, 96 e 144 horas, foram avaliados: morfologia das culturas, produção de E2, P4 (Quimioluminescência/Immulite), RLN (Elisa) e ultraestrutura (Microscopia Eletrônica). Os dados foram analisados por Anova e regressão linear com efeitos mistos (SAS versão 9.0). Células cultivadas em  $\alpha$ -MEM apresentam alta capacidade estrogênica e padrão de produção hormonal característico da fase folicular, mantendo características morfológicas/ultraestruturais semelhantes a células *in vivo*. No sistema de cultura padronizado, as CG não completam *in vitro* o processo de luteinização deflagrado pela hCG, assumindo fenótipo de fase folicular.

© 2012 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Publicado por Elsevier Editora Ltda.

Todos os direitos reservados.

<sup>☆</sup> Trabalho realizado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil.

\* Autor para correspondência.

E-mail: [anasars@fmrp.usp.br](mailto:anasars@fmrp.usp.br) (A.C.J.d.S. Rosa e Silva).

## Culture of human granulosa cells with follicular phase phenotype: influence of chemically defined system on morphology, ultrastructure, secretion of steroids and relaxin

### A B S T R A C T

#### Keywords:

Granulosa cells  
Chemically defined system  
Luteinization  
Ultrastructure  
Steroids  
Relaxin  
*In vitro* maturation  
Assisted reproduction techniques

It is well described in the literature the granulosa cells (GC) culture pattern that perpetuates human luteinizing simulating the luteal phase of the cycle. In this system, there is a reduction in the secretion of estradiol (E2) and increased synthesis of progesterone (P4) and relaxin (RLN). We aim to standardize a serum-free culture system, in order to reverse the luteinization process of GC obtained in IVF cycles, pre-luteinized by hCG, for use in *in vitro* maturation of preantral ovarian follicles. An experimental study was conducted with GC obtained from 10 women undergoing treatment for assisted reproduction. The GC were cultured in  $\alpha$ -MEM containing IGF-I, STI, androstenedione, PVP-40 (chemically defined medium) or TCM-199 containing FSH/serum. After 48, 96 and 144 h were analyzed: culture morphology, concentrations of E2, P4 (Chemiluminescence/Immulate), and RLN (Elisa), and ultrastructure (Electron Microscopy). Data were analyzed by Anova and linear mixed-effects regression (SAS version 9.0). Cells cultured in  $\alpha$ -MEM present estrogenic capacity and pattern of hormone production characteristic of the follicular phase, maintaining morphological/ultrastructural features similar that *in vivo* cell. In standard culture system, the CG not completes *in vitro* luteinization process triggered by hCG, assuming follicular phase phenotype.

© 2012 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

## Introdução

As células da granulosa (CG) sofrem profundas alterações morfológicas e funcionais ao longo do desenvolvimento folicular devido à complexa dinâmica do folículo e apresentam distintos graus de diferenciação de acordo com sua localização folicular, estágio de crescimento do folículo ovariano e também de acordo com a fase do ciclo menstrual. Os primeiros eventos de diferenciação das CG durante o desenvolvimento folicular incluem mobilização de colesterol (COL), reorganização do complexo de Golgi, lisossomos, gotas lipídicas e retículo endoplasmático liso e rugoso,<sup>1,2</sup> os quais promovem o transporte e o armazenamento intracelular do COL para sua conversão a hormônios esteroides.<sup>1</sup>

Essas mudanças ultraestruturais são acompanhadas pela expressão das enzimas P450 aromatase e P450 scc.<sup>3</sup> Os últimos eventos associam-se diretamente ao estabelecimento do processo de esteroidogênese e consistem em mudanças estáveis na estrutura e na forma das CG (forma poliédrica, com baixa razão citoplasma/núcleo), formação abundante de junções do tipo Gap e formação de cristas trabeculares dispostas nas mitocôndrias.<sup>2,4</sup>

Após a ovulação, as CG do folículo pré-ovulatório transformam-se em CG luteínicas, originando o corpo lúteo. Essas células tornam-se hipertrofiadas, sofrem modificações ultraestruturais e secretam grandes quantidades de progesterona, típicas da fase lútea do ciclo. As CG luteínicas apresentam ultraestrutura típica de células esteroidogênicas, com retículo endoplasmático liso abundante, mitocôndrias com cristas tubulares, ribossomos, acúmulo de numerosas gotas lipídicas contendo ésteres de colesterol no citoplasma, superfície celular com numerosas expansões e protuberâncias.<sup>5</sup> Além de haver um rearranjo do citoesqueleto, há uma diminuição das junções Gap.<sup>6,7</sup>

Culturas de células da granulosa têm sido rotineiramente usadas para estudo da diferenciação *in vitro* de células ovarianas e para aplicações na tecnologia de reprodução assistida (TRA) como suporte para a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos e cultivo embrionário.<sup>8</sup> Contudo, os sistemas de cultura de CG desenvolvidos nas últimas duas décadas têm sido caracterizados por um consistente declínio na produção de estradiol com o tempo de cultura,<sup>9,10</sup> enquanto a síntese de progesterona aumenta, sugerindo início de luteinização. Além disso, as CG só respondem a concentrações farmacológicas de FSH.

Quanto à suplementação proteica nesses sistemas de cultura, a prática usual tem sido a adição de soro ao meio. Como o soro promove a adesão das CG à superfície da placa de cultura, vários estudos usam o soro recobrando a placa de cultura antes de semear as células, adicionando-o ao meio nas primeiras horas de cultivo ou durante todo o período em baixas concentrações.<sup>11-14</sup> Células da granulosa humanas obtidas nos ciclos de fertilização *in vitro* (FIV) e cultivadas em meio suplementado com soro têm mostrado luteinização em cultura<sup>14</sup> e, conseqüentemente, têm sido usadas como modelo para simular células granulosas luteínicas, do corpo lúteo.<sup>15</sup> Vale ressaltar que a obtenção dessas células é feita após o uso do hCG para simulação do pico de LH e indução da maturação oocitária. A produção endócrina dessas culturas, portanto, é característica da segunda fase do ciclo e não pode ser comparada à função endócrina da fase folicular.

Sistemas de cultura de CG livres de soro foram descritos pela primeira vez por Campbell e Webb em 1996 com CG ovinas<sup>16</sup> e, posteriormente, CG bovinas.<sup>13</sup> Nesses sistemas de cultura a produção de estradiol pode ser induzida e mantida em resposta a concentrações fisiológicas de FSH, IGF-I e/ou insulina com aumento das respostas proliferativa e estrogênica até 144 horas de cultura. Além da capacidade estrogênica das CG e do padrão normal de produção hormonal característico da fase folicular do ciclo, as CG mantêm

*in vitro* características ultraestruturais semelhantes a células *in vivo*, agregando-se em cachos (clusters) sustentados por CG alongadas com aspecto semelhante a fibroblastos.<sup>2</sup>

O mecanismo de ação pelo qual as células de cocultura atuam na maturação e na capacitação do oócito *in vitro* e no desenvolvimento dos embriões é ainda discutível, mas nos sistemas de cultivo embrionário inclui a possibilidade de desintoxicação do meio pela remoção de íons de metais pesados, hipoxantina ou radicais livres e pela secreção de substâncias embriotróficas, como fatores de crescimento.<sup>17,18</sup>

O tema central deste estudo é a aquisição de conhecimentos sobre a diferenciação *in vitro* de CG humanas, a caracterização do perfil esteroidogênico das CG cultivadas em meio livre de soro e proteína e o estabelecimento de um modelo de cultura de CG suporte para a MIV de oócitos humanos em estágio de vesícula germinativa nos procedimentos de reprodução assistida (RA) e de folículos ovarianos pré-antrais para aplicação em programas de preservação de fertilidade.

Para tal, os resultados pretendidos devem ser gerados a partir da comparação de estudos *in vivo* e *in vitro*, mimetizando a fisiologia endócrina reprodutiva. *In vivo*, em resposta ao pico ovulatório de LH, as células do folículo pré-ovulatório são submetidas à sua etapa final de diferenciação e luteinizam. O comportamento de segunda fase não é adequado para a MIV, uma vez que até alcançar a maturidade o oócito secreta fatores inibidores de luteinização, a fim de evitar a luteinização precoce do folículo.<sup>19,20</sup>

A recuperação de oócitos imaturos para subsequente maturação *in vitro* e fertilização é no momento uma opção viável para as técnicas de RA. Com o uso de menores doses de gonadotrofinas para a estimulação ovariana, a MIV evita os efeitos colaterais e minimiza custos para os pacientes. Recentemente, foi proposta a combinação entre ciclo natural de FIV e MIV de oócitos imaturos como um enfoque em potencial para o tratamento da infertilidade. Mais recentemente, com as modalidades propostas para preservação de fertilidade em pacientes com risco de falência ovariana precoce ou portadoras de doenças neoplásicas e que serão submetidas à quimioterapia, desenvolveu-se a técnica de congelamento de tecido ovariano.<sup>8</sup> Nesses casos, quando da remissão da doença, há a possibilidade de se reimplantar o tecido congelado (autoenxerto) ou proceder-se à extração de folículos desse tecido, os quais certamente são imaturos, e maturá-los *in vitro* para posterior procedimento de RA.

As técnicas atualmente disponíveis de MIV são ainda bastante limitadas. Acreditamos que o desenvolvimento de um sistema de cocultivo de células da granulosa e oócitos possa mimetizar o estado fisiológico do microambiente ovariano e melhorar os resultados de MIV. Os padrões de cultivo de células da granulosa humanas atualmente descritos trabalham com células granuloso-luteínicas, ou seja, que já sofreram ação do LH e têm perfil de produção hormonal desfavorável para o crescimento de folículos nos estágios mais precoces do seu desenvolvimento. Assim, este estudo propôs padronizar um método de cultivar células da granulosa humanas em meio sem soro e albumina, ou seja, meio quimicamente definido, que acreditamos ter a capacidade de promover a reversão dessa luteinização, ao menos parcialmente.

O propósito do presente estudo foi investigar a função esteroidogênica pós-hCG das CG antrais, obtidas de aspirados de fluido folicular de pacientes submetidas à RA, em meio de cultura livre de soro e proteína (quimicamente definido), e padronizar um modelo de cultura de CG humanas cuja produção endócrina seja representativa da fase folicular ou estrogênica do ciclo menstrual, com produção mantida de E<sub>2</sub> e P<sub>4</sub> e alta relação E<sub>2</sub>/T ou E<sub>2</sub>/P<sub>4</sub>.

Portanto, para comprovar essa reversão, total ou parcial, analisamos comparativamente o comportamento das células da granulosa obtidas de mesmo pool folicular semeando-as em dois meios de cultivo: o meio padrão (TCM-199 suplementado com soro) e o novo meio proposto (quimicamente definido,  $\alpha$ -MEM), determinando a morfologia celular após o cultivo, as características ultraestruturais das CG por microscopia eletrônica de transmissão, o perfil de produção hormonal (proporções de estradiol e progesterona) e a secreção de RLN, um polipeptídeo produzido pelo corpo lúteo, como marcador de luteinização.

---

## Método

### Pacientes

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Processo n° 7474/2008). Foi feito um estudo experimental com CG humanas obtidas de aspirados de fluido folicular destinados ao descarte, resultantes da captação de oócitos em ciclos de reprodução assistida de pacientes tratadas no Serviço de Reprodução Humana do hospital.

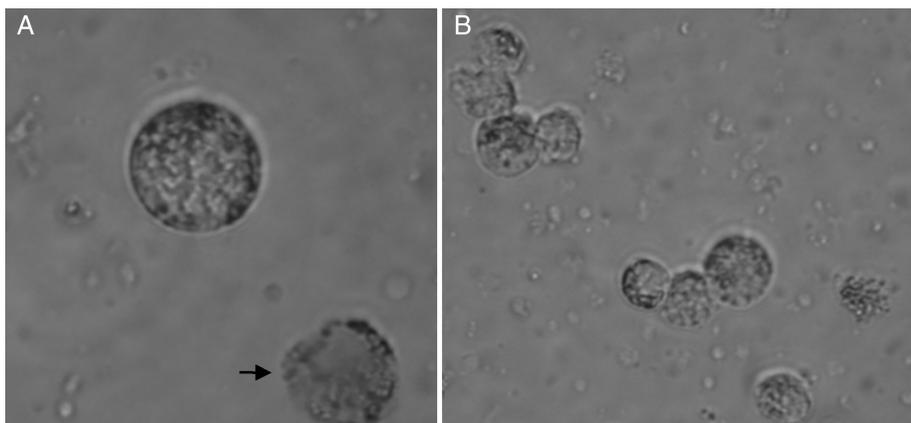
As pacientes foram incluídas neste estudo de acordo com seguintes critérios: idade entre 18 a 40 anos; ciclos ovulatórios; FSH menor do que 12 UI; indução de ovulação com FSH em associação com LH ou hCG; indicação de reprodução assistida por fator de infertilidade masculino ou tubário e assinatura do TCLE (Termo de Concordância Livre e Esclarecido). Os critérios de exclusão foram: presença de endocrinopatias, como hiperplasia adrenal congênita, hiperprolactinemia e doenças tireoideanas, ainda que compensadas, e pacientes com endometriose ou com falhas de fertilização em ciclos anteriores.

Dentre outros critérios de exclusão considerou-se o uso de medicamentos que sabidamente afetam a função reprodutiva ou metabólica, como tratamento com glicocorticoides ou antiandrogênicos por um período mínimo de 60 dias antecedentes ao início da indução.

### Hipestimulação ovariana controlada (HOC)

As pacientes receberam anticoncepcional oral de baixa dosagem (Ethinilestradiol 20+Gestodeno 75), iniciado entre o primeiro e o quinto dia do ciclo precedente ao ciclo de indução e até cinco dias antes da data programada para iniciar a indução com gonadotrofina no ciclo anterior para programação da menstruação.

O bloqueio hipofisário foi feito com análogo do Hormônio Liberador das Gonadotrofinas (GnRH<sub>a</sub>) (Acetato de Nafarelina – Synarel® – Pfizer) por via nasal, com uma borrifada a cada 12 horas iniciada na fase lútea do ciclo anterior (10 dias antes



**Figura 1 – Células da granulosa humanas observadas durante procedimento de contagem em câmara de Neubauer. Células vivas (A e B) e célula não viável corada em azul (seta). Coloração: azul de Trypan. Microscópio Óptico Comum, aumentos A, 600X; B, 400X.**

do início da indução) e mantida até o dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (hCG).

No dia programado para o início da indução da ovulação, a paciente foi submetida a exame de ultrassonografia, com a finalidade de avaliar os ovários e a anatomia uterina. Para a indução foi administrado FSH recombinante (Gonal® – Laboratório Serono – ou Puregon® – Laboratório Organon) em doses variáveis, de acordo com a resposta da paciente, por via subcutânea (SC) sempre às 18 horas. O ajuste de dose foi feito com base no recrutamento e no crescimento folicular acompanhados pela ultrassonografia transvaginal seriada. Na presença de pelo menos dois folículos com diâmetro superior a 17 mm, foi administrado hCG recombinante (Ovidrel®) na dose de 250 µg às 22 horas. Após um intervalo de 34 a 36 horas, os oócitos foram captados.

#### Coleta do fluido folicular

Todos os folículos com diâmetro superior a 14 mm foram punccionados e aspirados. A aspiração dos folículos foi obtida por uma pressão constante de 100 mm de mercúrio (mm Hg) com controle eletrônico (Labotect GmbH, modelo 3014). O fluido aspirado foi coletado em tubos estéreis de polipropileno (Falcon-Costar) previamente aquecidos e mantidos a temperatura de 37 °C e, em seguida, identificados e enviados para a sala em anexo (Laboratório de Fertilização *in vitro*), aos cuidados de uma embriologista, para identificação e retirada dos oócitos. O aspirado folicular contendo as CG foi enviado imediatamente para os procedimentos preparatórios para o cultivo celular.

#### Recuperação das células da granulosa do aspirado folicular

O aspirado folicular total de cada paciente foi transferido para tubo Falcon de 15 mL contendo 2 mL de PBS acrescido de antibiótico/antimicótico e mantido em gelo. Em seguida, o conteúdo folicular foi vertido para placa de Petri estéril de 60 mm e após sedimentação das células sanguíneas recuperaram-se rapidamente os grumos de CG com auxílio de micropipeta e microscópio estereoscópio. Finalmente, foram transferidas para tubo Falcon de 15 mL e centrifugadas a

1.500 rpm por 10 min a 4 °C. Após centrifugação, o pellet foi ressuspenso em 1 mL de meio  $\alpha$ -MEM, as CG foram suavemente depositadas sobre a coluna de Histopaque e centrifugadas a 2.000 rpm por 20 minutos a 4 °C. A camada de CG visível na interface foi isolada lentamente por pipetagem e as CG foram lavadas em 2 ml de PBS e centrifugadas a 2.000 rpm por 10 min a 4 °C. Em seguida, o pellet foi ressuspenso em 100 µL de meio  $\alpha$ -MEM ou TCM previamente equilibrado em incubadora de CO<sub>2</sub>. Foi retirada amostra da suspensão celular para determinação da concentração e do número de células viáveis.

#### Determinação da concentração e da viabilidade das células da granulosa

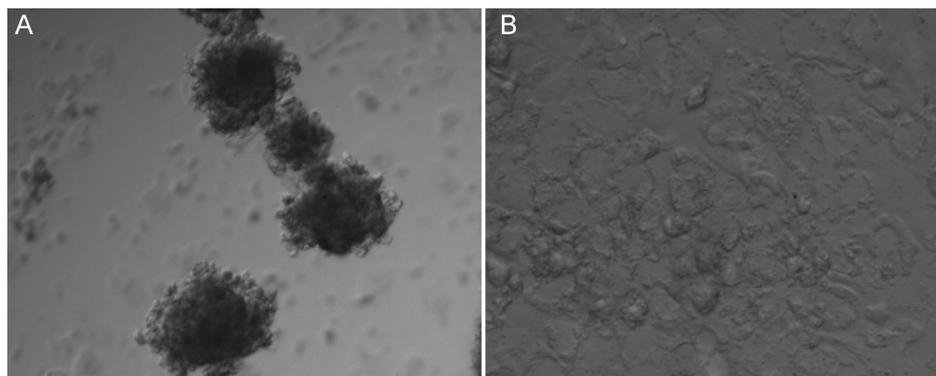
A concentração celular e o índice de viabilidade foram determinados pelo método de exclusão do Azul de Trypan. Resumidamente, uma amostra da suspensão celular foi diluída (1:10) em solução a 0,2% de Azul de Trypan (Trypanblau, Merck, Alemanha) e analisada em câmara de Neubauer. A viabilidade foi estimada dividindo-se o número de células viáveis pelo número total de células. De acordo com os princípios da técnica, as células mortas mostram-se coradas pelo Azul de Trypan, enquanto as células vivas permanecem não coradas, com aspecto refringente à visualização em microscópio óptico (fig. 1).

#### Cultivo das células da granulosa

##### Meios de cultura

Foram usados dois sistemas de cultura:

- 1) TCM 199 (sistema convencional – controle): meio TCM-199 (Invitrogen-Gibco BRL), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado a 56° C durante 30 minutos, 0,5 µg/mL de FSH (Folltropin-Bioniche Canadá, London, ON, Canadá) e 2 mM de glutamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).
- 2)  $\alpha$ -MEM (sistema quimicamente definido): meio  $\alpha$ -MEM (Invitrogen-Gibco BRL) acrescido de suplementação específica para estimular a capacidade estrogênica das CG (Pedido



**Figura 2 – Padrão de crescimento de células da granulosa humanas cultivadas em sistema de cultura convencional ou quimicamente definido. A, crescimento característico em suspensão (clusters) das células da granulosa cultivadas no meio  $\alpha$ -MEM; B, monocamada de células da granulosa em cultivo no meio TCM-199. Microscópio Invertido acoplado a Micromanipulador Nikon Diaphot 300. 200X.**

de patente enviado à Agência USP de Inovação). As células foram cultivadas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> durante 144 horas. A cada 48 horas, os meios de cultura foram renovados e coletados para as dosagens de E2, P4 e RLN.

#### Condições de cultura

As células foram plaqueadas nas concentrações de 20.000 ou 40.000 células viáveis em cada poço da placa de cultura contendo 200  $\mu$ L de meio previamente equilibrado, em duplicata para cada concentração celular e tratamento (meio de cultura). As células foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços em meio TCM-199 ou  $\alpha$ -MEM a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> durante 144 horas. A cada 48 horas, os meios de cultura foram renovados.<sup>2</sup>

#### Avaliação morfológica e ultraestrutural

Para a fixação das células para a microscopia eletrônica de transmissão, os meios de cultura foram substituídos por meio recém-preparado com 120 horas de cultivo e as células fixadas após 24 horas. Foram feitas primeiramente as etapas de lavagem com PBS e tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,4) e logo em seguida as células foram fixadas com 2% de glutaraldeído, 2% de formaldeído e 0,05% de CaCl<sub>2</sub> em PBS com Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>.

Em seguida as amostras foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% feito em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,4), contrastadas com acetato de uranila 0,5%, desidratadas em séries crescentes de etanol P.A (Merck), incluídas em resina. Foram montados os blocos e confeccionadas lâminas com cortes de meio micra e coradas com Azul de Toluidina. Após exame das células em microscopia de luz, as amostras emblocadas e bem preservadas foram processadas. Foram feitos cortes ultrafinos (60 nm) para montagem das grades de cobre e contrastadas com acetato de uranila 0,5% e citrato de chumbo para posterior análise da ultraestrutura.

#### Dosagens hormonais

Após 48, 96 e 144 horas de cultivo, os meios de cultura foram coletados e mantidos a -20 °C até a análise. A concentração

de estradiol e progesterona nas amostras dos meios de cultura foi determinada pelo método de quimioluminescência, usando kit comercial (DPC, Immulite System, Los Angeles, CA, USA), de acordo com instruções do fabricante. As análises foram feitas em duplicata, sem extração, e cada esteroide foi analisado em um único ensaio para evitar variação entre-ensaios.

Os coeficientes de variação intraensaio foram menores do que 15% para o E2 e 10% para P4. As sensibilidades analíticas dos kits de estradiol e de progesterona foram de 15 pg/mL e 0,1 ng/mL, respectivamente. A relaxina foi dosada por Elisa, usando kit comercial (Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for Human Relaxin, USCN Life Science, USA). Os ensaios foram feitos no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do hospital.

#### Análise estatística

Os dados da concentração de esteroides e relaxina nos meios de cultura foram analisados por Anova e teste de regressão linear de efeitos mistos usando o procedimento GLM (PROC GLM) do software SAS® 9.0. Os dados são apresentados como média e desvio-padrão e o nível de significância adotado foi de 5% ( $\alpha = 0,05$ ).

## Resultados

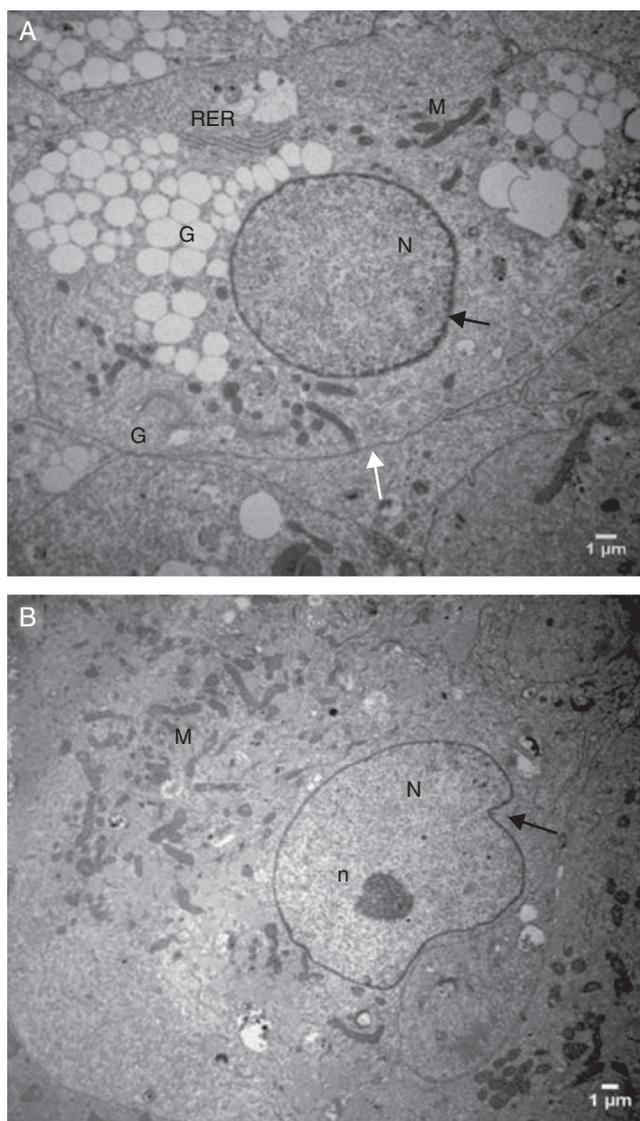
### Caracterização morfológica da cultura

#### $\alpha$ -MEM

Nesse sistema de cultura, as células crescem em suspensão, formando clusters de células justapostas com fenótipo semelhante às CG *in vivo* (fig. 2A). As CG desses agregados mantêm a forma poliédrica e apresentam-se fortemente compactadas (fig. 2A).

#### TCM-199

As características celulares nesse sistema de cultivo são bem descritas na literatura. Por causa da adição de soro, as CG



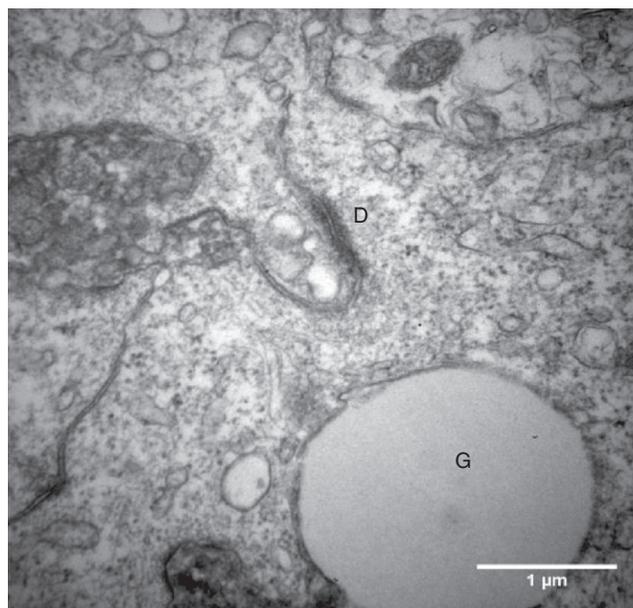
**Figura 3 – Eletromicrografias de CG cultivadas em meio  $\alpha$ -MEM (144 h).** A, notar forma poliédrica da célula, organelas e membrana nuclear bem evidente. B, observar a presença de núcleo bem desenvolvido e nucléolo (seta). N, núcleo; n, nucléolo; M, mitocôndria; GL, gota lipídica; RER, retículo endoplasmático rugoso; G, complexo de Golgi. ME: A, 6.700X; B, 5.000X.

crecem formando monocamadas aderentes ao fundo da placa de cultura (fig. 2B) e apresentam aspecto de fibroblastos.

#### **Análise descritiva da ultraestrutura das células da granulosa**

##### *Formato celular*

Células da granulosa cultivadas em  $\alpha$ -MEM apresentaram formato predominantemente poliédrico (fig. 3). Em contraste, as células cultivadas em TCM-199 apresentaram formato alongado, semelhante a fibroblasto (fig. 4), característica morfológica sugestiva de início de luteinização.



**Figura 4 – Eletromicrografias de CG cultivadas em meio  $\alpha$ -MEM (144 h).** D, notar a presença de desmossomos, região de comunicação entre as células. ME: 27.000X.

##### *Características ultraestruturais das células cultivadas em meio $\alpha$ -MEM*

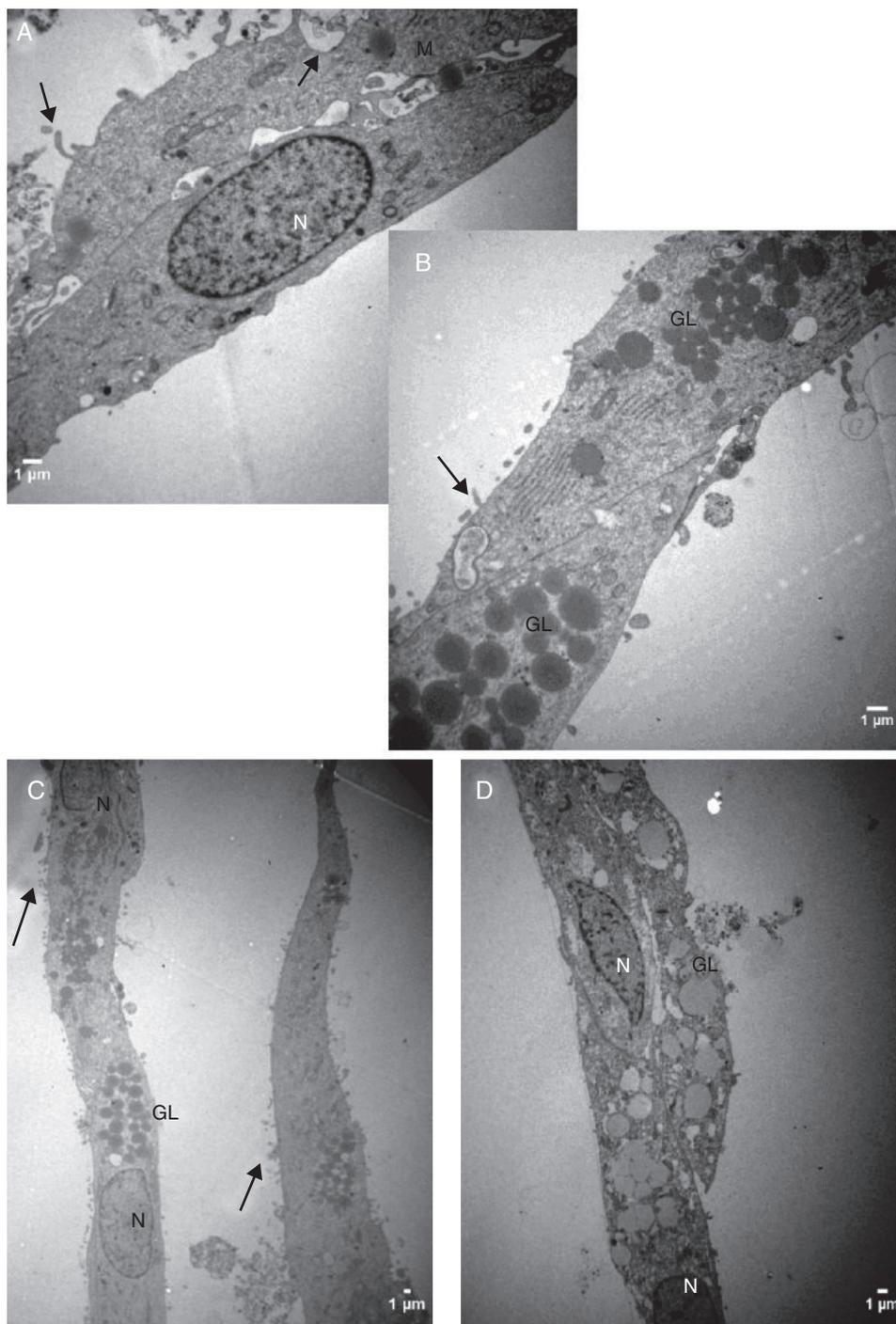
Por causa da característica de formarem clusters de células fortemente compactadas e aderidas entre si, observamos, na maioria das eletromicrografias, a presença de muitas interdigitações de membrana, áreas de comunicação celular e estruturas de junção celular responsáveis pela forte adesão entre as células, como, por exemplo, os desmossomos (fig. 4).

##### *Características ultraestruturais das células cultivadas em meio TCM-199*

Diferentemente das CG cultivadas no meio  $\alpha$ -MEM, as CG cultivadas no meio TCM-199 apresentaram membrana citoplasmática irregular por causa de inúmeras microvilosidades, evaginações e protruções pleomórficas sugestivas de luteinização (figs. 5 e 6).

##### *Perfil hormonal: esteroides*

O perfil da secreção de esteroides foi determinado em amostras de meios obtidos de culturas das CG que apresentaram alta viabilidade celular pré-cultivo (> 85%) e características morfológicas compatíveis com os dois sistemas de cultura usados, representados pelos meios  $\alpha$ -MEM e TCM-199. As células da granulosa cultivadas em  $\alpha$ -MEM (sistema de cultura quimicamente definido) secretaram progressivamente concentrações mais elevadas de estradiol durante o período de cultura, enquanto as células cultivadas em TCM-199 (controle) apresentaram uma produção consistentemente menor de estradiol em todos os tempos de cultivo avaliados (fig. 7;  $p < 0,001$ ). A secreção de P4 foi reduzida com o tempo de cultivo no meio  $\alpha$ -MEM e aumentou significativamente no

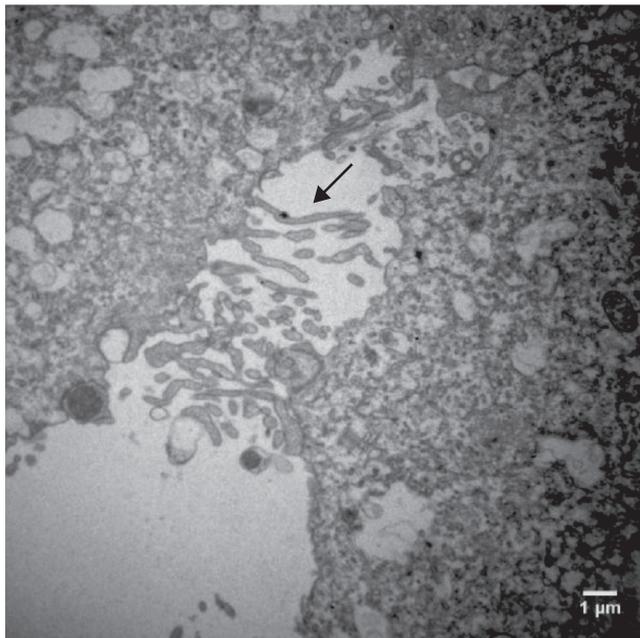


**Figura 5 – Eletromicrografias de CG cultivadas em meio TCM-199 (144 h). Observar o formato alongado das células e superfície citoplasmática irregular (setas) (A e D). N, núcleo; M, mitocôndria; GL, gota lipídica. ME: A, 6.700X, B, 8.000X, C, 2.700X, D, 4000X.**

TCM-199 (fig. 8;  $p < 0,001$ ). As concentrações celulares testadas influenciaram diferencialmente apenas a secreção de P4 no meio TCM-199, com incremento na produção de P4 com a concentração de  $2 \times 10^5$  células/mL (40.000/200  $\mu$ L) nos tempos 96 e 144 horas (fig. 8;  $p < 0,001$ ).

#### **Relação estradiol: progesterona**

A relação E2/P4 foi significativamente maior no  $\alpha$ -MEM quando comparada ao TCM-199, independentemente do tempo de cultivo (T48h =  $0,13 \pm 0,12$  vs  $0,01 \pm 0,02$  ( $p < 0,01$ );



**Figura 6 – Eletromicrografias de CG cultivadas em meio TCM-199 (144 h). Observar superfícies citoplasmáticas irregulares devido à presença de microvilosidades, evaginações e protusões pleomórficas sugestivas de luteinização (seta). ME: 10.000X.**

96 h =  $0,12 \pm 0,06$  vs  $0,01 \pm 0,01$  ( $p < 0,01$ ); 144 h =  $0,90 \pm 0,87$  vs  $0,01 \pm 0,06$  ( $p = 0,06$ ), respectivamente).

**Secreção de relaxina**

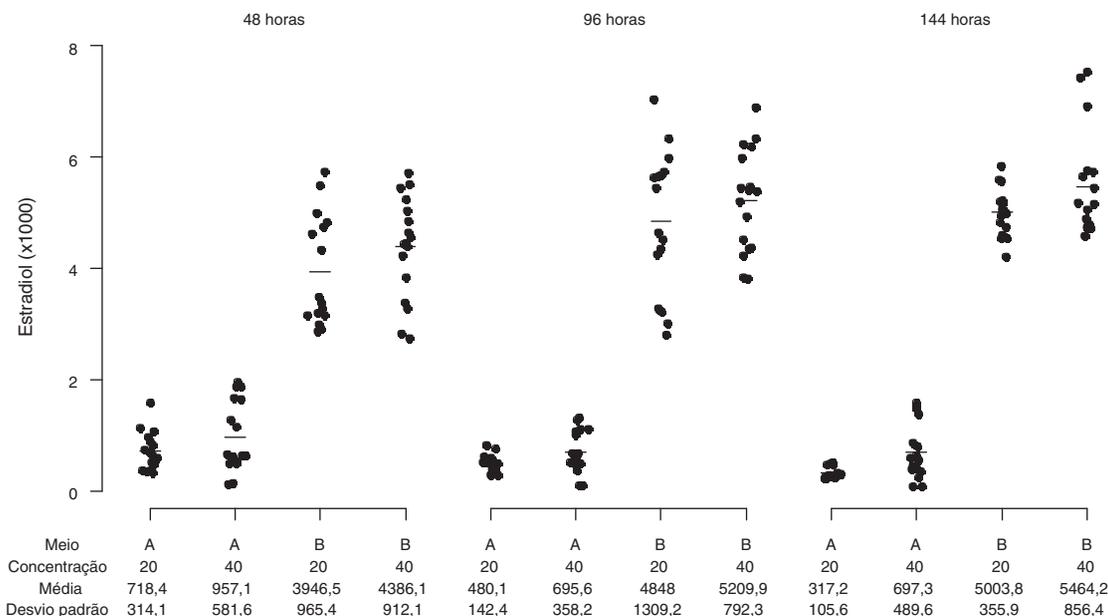
A secreção de RLN pelas CG (fig. 9) não diferiu no tempo 48 horas entre os dois sistemas de cultura, porém foi significativamente maior no meio TCM-199 quando comparada ao meio  $\alpha$ -MEM após 96 e 144 horas de cultivo ( $p = 0,0095$ ).

**Discussão**

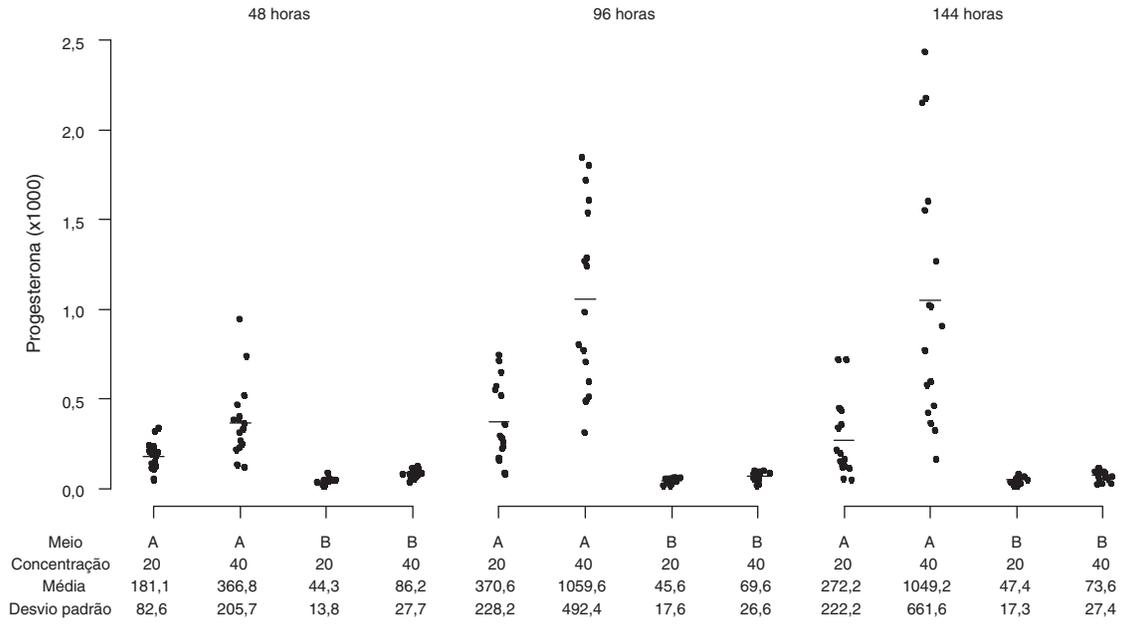
No presente estudo, células da granulosa humanas cultivadas em sistema quimicamente definido foram avaliadas quanto à capacidade de reverter o processo de luteinização deflagrado pela hCG usada na HOC e de simular o perfil esteroidogênico característico da fase folicular do ciclo menstrual.

Nosso modelo experimental *in vitro* foi padronizado em meio de cultura que pode ser considerado como quimicamente definido, já que usa macromolécula sintética como substituto do soro fetal e BSA.<sup>21</sup> Foram comparados dois sistemas de cultivo distintos: o sistema já descrito na literatura, representado pelo meio TCM-199 suplementado com soro, e o sistema proposto, representado pelo meio  $\alpha$ -MEM acrescido de suplementação específica para estimular a capacidade estrogênica das CG.

Nossos resultados demonstram influência importante do sistema de cultivo na diferenciação *in vitro* das CG humanas. Ao se compararem os dois sistemas testados, a morfologia das culturas foi marcadamente distinta em 100% dos cultivos, sem variações entre indivíduos, bem como as características ultraestruturais analisadas à microscopia eletrônica



**Figura 7 – Secreção de estradiol (pg/mL) por células da granulosa humanas ( $10^5$ /mL e  $2 \times 10^5$ /mL) cultivadas em sistema quimicamente definido ou controle. Meio A = TCM-199 (controle); Meio B =  $\alpha$ -MEM. Concentração 20 ou 40 = 20.000 ou 40.000 células/200  $\mu$ L de meio de cultura. Os desvios-padrão referem-se à variabilidade inter-indivíduos estimada por modelos de efeitos mistos (n = 10).**

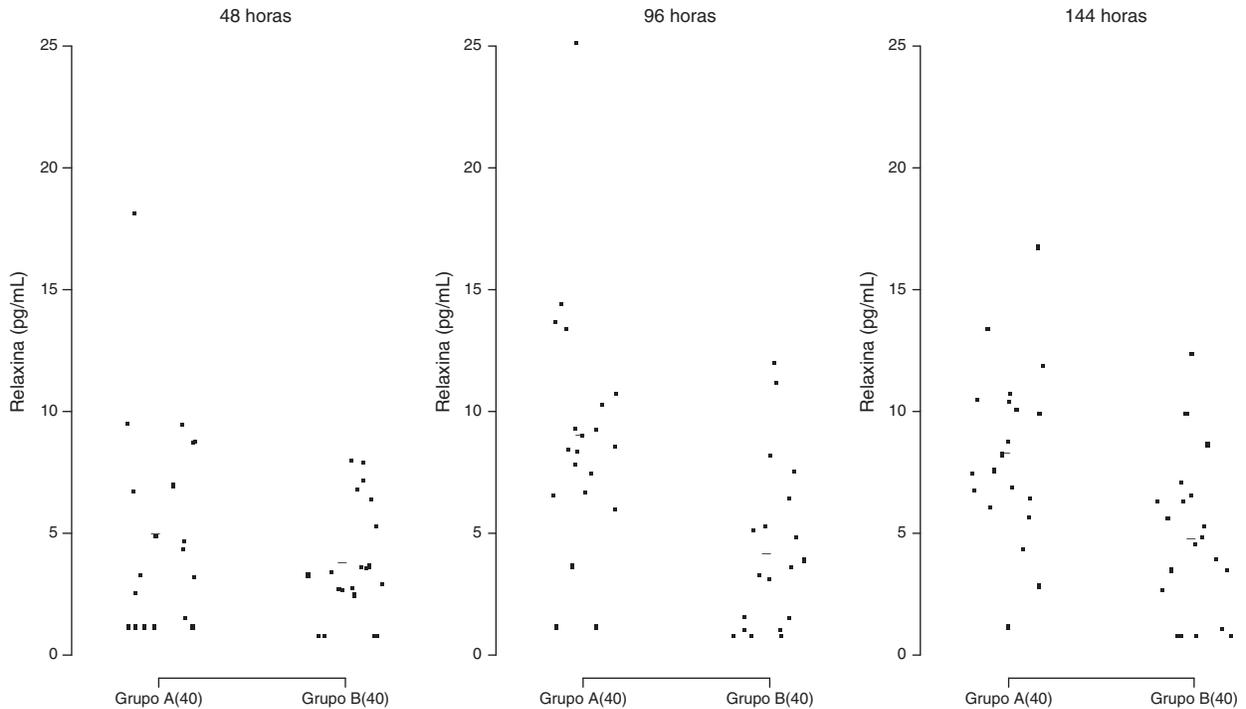


**Figura 8 – Secreção de progesterona (ng/mL) por células da granulosa humanas ( $10^5/mL$  e  $2 \times 10^5/mL$ ) cultivadas em sistema quimicamente definido ou controle. Meio A = TCM-199 (controle); Meio B =  $\alpha$ -MEM. Concentração 20 ou 40 = 20.000 ou 40.000 células/200  $\mu$ L de meio de cultura. Os desvios-padrão referem-se à variabilidade inter-indivíduos estimada por modelos de efeitos mistos (n = 10).**

de transmissão. As CG cultivadas no meio  $\alpha$ -MEM demonstraram características morfológicas similares às CG *in vivo*. As células mantêm a forma poliédrica e crescem em suspensão formando clusters (fig. 2), os quais aumentam em número, distribuindo-se por toda a área de cultivo, além de

aumentarem em diâmetro e tornarem-se visivelmente mais compactados ao longo da cultura.

Segundo Gutierrez et al. (1997),<sup>13</sup> o padrão de formação de clusters de CG em sistemas livres de soro permite um íntimo contato físico entre as células e isso pode ser responsável



**Figura 9 – Secreção de relaxina (pg/mL) por células da granulosa humanas ( $2 \times 10^5/mL$ ) cultivadas em sistema quimicamente definido ou controle. Meio A = TCM-199 (controle); Meio B =  $\alpha$ -MEM. Concentração 40 = 40.000 células/200  $\mu$ L de meio de cultura. Os desvios-padrão referem-se à variabilidade inter-indivíduos estimada por modelos de efeitos mistos (n = 10).**

por prevenir a luteinização.<sup>2</sup> Essa morfologia de crescimento típica também é observada em culturas de CG de outras espécies, como ovinos,<sup>16</sup> suínos<sup>22</sup> e bovinos.<sup>2</sup>

No nosso estudo, investigamos adicionalmente a influência da densidade celular (concentração de células/área da placa de cultivo) no perfil de secreção de esteroides das culturas. Cultivamos as CG nas concentrações de 20.000 ou 40.000/200  $\mu$ L de meio e observamos que a capacidade estrogênica das CG cultivadas em meio  $\alpha$ -MEM não aumenta proporcionalmente ao aumento da densidade celular, a despeito da alta produção de E2 até 144 horas de cultivo.

O padrão de crescimento e compactação das CG em clusters provavelmente exerce influência no aporte de hormônios e, conseqüentemente, na sua biodisponibilidade nas camadas mais internas de CG do cluster, contribuindo para o estabelecimento de subpopulações de CG com distintos perfis esteroidogênicos, como ocorre *in vivo*.<sup>23-25</sup> Contudo, estudos mais detalhados devem ser instituídos para confirmar esse achado. No meio TCM-199 também não foi verificada produção aumentada de E2, o que provavelmente deve-se à perda de atividade da aromatase, sendo indiferente a densidade de células em cultivo. O efeito da densidade celular sobre a capacidade esteroidogênica das CG foi evidente apenas na secreção de P4 no meio TCM-199 após 96 e 144 horas de cultivo, indicando a diferenciação irreversível das CG em direção ao fenótipo de fase lútea, com incremento na produção de P4 proporcional ao aumento da densidade celular.

O íntimo contato entre as CG que crescem em clusters foi evidenciado no presente estudo por meio da presença das comunicações celulares nas amostras analisadas por microscopia eletrônica. Observamos a presença de muitas junções intercelulares, como os desmossomos (fig. 4), na maioria das eletromicrografias das CG que foram cultivadas no meio  $\alpha$ -MEM, compatível com a ultraestrutura relatada na literatura de folículos nas fases iniciais de desenvolvimento.<sup>7</sup> A maturação das células da granulosa e a luteinização são processos que implicam mudança na forma da célula e diminuição ou até mesmo ausência das junções celulares e das regiões de aderência celulares no folículo.<sup>7,22</sup> Portanto, pode-se inferir, considerando esses aspectos morfológicos, que o sistema de cultivo proposto foi capaz de reverter ou retardar o processo de luteinização das CG.

Do ponto de vista ultraestrutural, as diferenças mais proeminentes observadas entre os dois sistemas estudados foram o formato e o tamanho das células e as características da superfície celular. Células da granulosa cultivadas em  $\alpha$ -MEM apresentaram formato predominantemente poliédrico e presença de desmossomos, *gap junctions* e microvilosidades interdigitadas (figs. 3 e 4). Em contraste, as células cultivadas em TCM-199 apresentaram formato alongado semelhante a fibroblasto contendo microvilosidades, evaginações e protuberâncias da membrana plasmática (fig. 5), características morfológicas compatíveis com instalação do processo de luteinização. Os resultados deste estudo estão de acordo com os relatos da literatura sobre as diferenças ultraestruturais das CG em relação aos seus diferentes estágios de proliferação e luteinização.<sup>26,27</sup>

Os resultados de estudos *in vitro* só são significativos se as células mantiverem durante a cultura características funcionais semelhantes às que mantêm *in vivo*, para que a partir

desses resultados se façam inferências a respeito da fisiologia do processo estudado. Do ponto de vista funcional, o padrão de produção hormonal de cada sistema de cultura foi acentuadamente distinto. No sistema convencional com soro (TCM-199), as CG foram predominante produtoras de progesterona (característica de fase lútea), enquanto no sistema proposto ( $\alpha$ -MEM) as CG secretaram altas concentrações de estradiol, sem o incremento de progesterona, mantendo alta relação estradiol/progesterona, a qual indica manutenção da atividade da aromatase característica da fase folicular. Apesar da alta proliferação celular característica de CG cultivadas em sistema contendo soro, cujo índice pode aumentar 100% durante apenas três dias de cultivo,<sup>28</sup> a secreção de E2 apresentou consistente declínio no meio TCM-199, enquanto a progesterona aumentou significativamente em função do tempo de cultura (figs. 6 e 7).

A adição do soro durante as primeiras horas de cultura ou a feitura de um pré-tratamento dos poços da placa de cultura com soro são práticas usuais para melhorar a adesão celular.<sup>11</sup> Porém, a capacidade das CG de produzirem esteroides *in vitro* pode ser potencialmente alterada. O soro pode induzir luteinização das CG e células da teca, caracterizada pela diminuição da produção de estradiol e androstenediona e por um rápido aumento na secreção de progesterona, com produção sustentada durante todo o período de cultivo.<sup>11,13,29,30</sup> Corroborando esses achados, Gutiérrez et al. (1997)<sup>13</sup> demonstraram os efeitos negativos da adição do soro ao meio de cultivo na produção de estradiol *in vitro* por CG bovinas.

As células obtidas após a aspiração do fluido folicular de pacientes submetidas a ciclos de RA são comumente chamadas de células pré-luteinizadas, mas diferem entre si quanto ao tipo de cristas mitocondriais, à proliferação do complexo de Golgi, ao tipo de retículo endoplasmático e ao número e tamanho das gotas lipídicas.<sup>31</sup> No presente estudo, as CG cultivadas nos dois sistemas analisados partiram dos mesmos pools de fluidos foliculares, ou seja, o tamanho do folículo e a concentração de E2 à qual as CG estavam expostas foram os mesmos, porém se diferenciaram *in vitro*, assumindo características morfofuncionais distintas, demonstrando um perfil de fase folicular no meio  $\alpha$ -MEM e outro de fase lútea no meio TCM-199.

Adicionalmente, observamos que a secreção de RLN pelas CG, um polipeptídeo sintetizado pelo corpo lúteo, foi significativamente maior no meio TCM-199 quando comparado ao  $\alpha$ -MEM, o que comprova o fenótipo de célula luteinizada no TCM-199 e indica reversão do processo de luteinização no sistema quimicamente definido. De fato, CG humanas cultivadas em sistema contendo soro secretam quantidades expressivas de RLN e são capazes de simular o perfil de secreção do corpo lúteo característico do período gestacional.<sup>7</sup> Portanto, a produção endócrina da cultura (esteroides ovarianos e RLN) em meio TCM-199 foi indicativa de fase final de diferenciação e de luteinização das CG.<sup>2,7</sup>

A secreção *in vitro* de RLN tem sido detectada em culturas de CG luteínicas a partir do sexto dia de cultivo,<sup>32</sup> enquanto a secreção de RLN *in vivo* é detectada de cinco a sete dias após o pico de LH.<sup>33,34</sup> No nosso estudo, foi possível detectar mais precocemente (dois dias de cultivo) a produção de RLN e em culturas de CG não estimuladas com hCG ou LH. As

concentrações de RLN em culturas de CG humanas luteinizadas observadas por Stewart et al. (1997)<sup>15</sup> foram indetectáveis ou inferiores a 200 pg/mL até o sexto dia de cultivo das CG. A menor concentração de RLN observada por esses autores foi de 46 pg/mL no décimo dia de cultivo em culturas estimuladas com 0,02 UI/mL de hCG. A baixa secreção de RLN observada em nosso estudo, independentemente do sistema de cultura, provavelmente deve-se à ausência de hCG ou LH no meio de cultura.

Gutierrez et al.<sup>2,13</sup> demonstram a íntima relação entre estrutura e função em sistemas de cultura de CG livres de soro. Nessas culturas, as concentrações de estradiol são mantidas ao longo do cultivo e as CG apresentam características ultraestruturais de células normais, semelhantes às CG *in vivo*. Essas células contêm retículo endoplasmático em abundância, mitocôndrias com cristas trabeculares e uma extensiva rede de junções Gap. Ao contrário, as CG cultivadas em placas revestidas com soro mostram características de perda da atividade da enzima aromatase. Essa perda de aromatização foi correlacionada com a morfologia das células, que se apresentavam mais alongadas, compatíveis com os resultados obtidos no presente estudo, tanto em relação ao formato alongado das células quanto à redução na atividade da aromatase no meio TCM-199 (fase lútea). Portanto, as características morfológicas e ultraestruturais, bem como o perfil endócrino das culturas obtido com o sistema quimicamente definido, são similares às CG *in vivo* de folicúlos ovarianos em crescimento, enquanto o sistema de cultura convencional com soro irrefutavelmente simula o perfil morfológico/endócrino das células granulosa luteínicas do corpo lúteo em diferenciação (fig. 9).<sup>15,35</sup>

## Conclusões

O sistema de cultura quimicamente definido induziu a reversão do processo de luteinização droga-induzida durante a HOC, enquanto o sistema padrão, como já descrito na literatura, tende a completar o processo de luteinização, servindo como modelo *in vitro* de corpo lúteo. A importância deste estudo reside no estabelecimento de um sistema de cultura de CG humanas que, além do potencial de aplicação nos protocolos de preservação de fertilidade, torna-se um modelo adequado para a investigação dos efeitos das gonadotrofinas usadas nos protocolos de estimulação ovariana, como o HMG, as isoformas de FSH e as associações FSH/LH, e na diferenciação e luteinização das CG pós-ovulatórias e pode ser útil para estudar diferenças na resposta endócrina em CG coletadas de pacientes com diferentes etiologias de infertilidade e fornecer informações de relevância clínica.

## Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## Agradecimentos

A Maria Cristina Picinato pela grande ajuda na coleta de amostras durante as captações de oócitos e pela ajuda nas etapas envolvendo procedimentos laboratoriais. A Maria Albina

Vercesi e a Tatiana Marina Vieira Giorgenon pela realização de todas as dosagens hormonais.

## REFERÊNCIAS

1. Amsterdam A, Rotmensch S, Ben-Zeev A. Coordinated regulation of morphological and biochemical differentiation in a steroidogenic cell: the granulosa cell model. *Trends Biochem Sci.* 1989;14(9):377-82.
2. Gutierrez CG, Glazyrin AL, Robertson GW, Campbell BK, Gong JG, Bramley TA, et al. Ultra-structural characteristics of bovine granulosa cells associated with maintenance of oestradiol production *in vitro*. *Mol Cell Endocrinol.* 1997;31:51-8, 134(1).
3. Xu Z, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA, Youngquist RS. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol Reprod.* 1995;53(4):951-7.
4. Amsterdam A, Gold RS, Hosokawa K, Yoshida Y, Sasson R, Jung Y, et al. Crosstalk among multiple signaling pathways controlling ovarian cell death. *Trends Endocrinol Metab.* 1999;10(7):255-62.
5. Blanchette EJ. Ovarian steroid cells. I. Differentiation of the lutein cell from the granulosa follicle cell during the preovulatory stage and under the influence of exogenous gonadotrophins. *J Cell Biol.* 1966;31(3):501-16.
6. Amsterdam A, Rotmensch S. Structure-function relationships during granulosa cell differentiation. *Endocr Rev.* 1987;8(3):309-37.
7. Schmidt CL, et al. Characterization of long-term monolayer cultures of human granulosa cells from follicles of different size and exposed *in vivo* to clomiphene citrate and hCG. *J Reprod Fertil.* 1984;71:279-87.
8. Xu M, West E, Shea LD, Woodruff TK. Identification of a stage-specific permissive *in vitro* culture environment for follicle growth and oocyte development. *Biol Reprod.* 2006;75:916-23.
9. Gong JG, Bramley T, Webb R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. *Biol Reprod.* 1991;45(6):941-9.
10. Luck MR, Rodgers RJ, Findlay JK. Secretion and gene expression of inhibin, oxytocin and steroid hormones during the *in vitro* differentiation of bovine granulosa cells. *Reprod Fertil Dev.* 1990;2(1):11-25.
11. Gong JG, McBride D, Bramley TA, Webb R. Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on bovine granulosa cell steroidogenesis *in vitro*. *J Endocrinol.* 1994;143(1):157-64.
12. Picton HM, Campbell BK, Hunter MG. Maintenance of oestradiol production and expression of cytochrome P450 aromatase enzyme mRNA in long-term serum-free cultures of pig granulosa cells. *J Reprod Fertil.* 1999;115(1):67-77.
13. Gutierrez CG, Campbell BK, Webb R. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biol Reprod.* 1997;56(3):608-16.
14. Schipper I, Fauser BC, van Gaver EB, Zarutskie PW, Dahl KD. Development of a human granulosa cell culture model with follicle stimulating hormone responsiveness. *Hum Reprod.* 1993;8(9):1380-6.
15. Stewart DR, Vandervoort CA. Simulation of human luteal endocrine function with granulosa lutein cell culture. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(9):3078-83.

16. Campbell BK, Scaramuzzi RJ, Webb R. Induction and maintenance of oestradiol and immunoreactive inhibin production with FSH by ovine granulosa cells cultured in serum-free media. *J Reprod Fertil.* 1996;106(1):7-16.
17. Menezes YJ, Guerin JF, Czyba JC. Improvement of human early embryo development in vitro by coculture on monolayers of Vero cells. *Biol Reprod.* 1990;42(2):301-6.
18. Kauma SW, Matt DW. Coculture cells that express leukemia inhibitory factor (LIF) enhance mouse blastocyst development in vitro. *J Assist Reprod Genet.* 1995;12(2):153-6.
19. Joyce IM, Clark AT, Pendola FL, Eppig JJ. Comparison of recombinant growth differentiation factor-9 and oocyte regulation of KIT ligand messenger ribonucleic acid expression in mouse ovarian follicles. *Biol Reprod.* 2000;63(6):1669-75.
20. Spicer LJ, Aad PY, Allen D, Mazerbourg S, Hsueh AJ. Growth differentiation factor-9 has divergent effects on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells. *J Endocrinol.* 2006;189(2):329-39.
21. Vireque AA, Camargo LS, Serapiao RV, Rosa ESAA, Watanabe YF, Ferreira EM, Navarro PA, Martins WP, Ferriani RA. Preimplantation development and expression of Hsp-70 and Bax genes in bovine blastocysts derived from oocytes matured in alpha-MEM supplemented with growth factors and synthetic macromolecules. *Theriogenology.* 2009;71:620-7.
22. Picton HM, Campbell BK, Hunter MG. Maintenance of oestradiol production and expression of cytochrome P450 aromatase enzyme mRNA in long-term serum-free cultures of pig granulosa cells. *J Reprod Fertil.* 1999;115:67-77.
23. Salustri A, Hascall VC, Camaioni A, Yanagishita M. Oocyte-granulosa cell interactions. In: Adashi PCL EY, editor. *The Ovary.* New York: Raven Press; 1993. p. 209-25.
24. Monget P, Monniaux D. Growth factors and the control of folliculogenesis. *J Reprod Fertil Suppl.* 1995;49:321-33.
25. Rouillier P, Sirard MA, Matton P, Guilbault LA. Immunoneutralization of transforming growth factor alpha present in bovine follicular fluid prevents the suppression of the follicle-stimulating hormone-induced production of estradiol by bovine granulosa cells cultured in vitro. *Biol Reprod.* 1997;57(2):341-6.
26. Davoodian N, Mesbah F, Kafi M. Oocyte ultrastructural characteristics in camel (*Camelus dromedarius*) primordial to large antral follicles. *Anat Histol Embryol.* 2011;40(2):120-7.
27. Nottola SA, Heyn R, Camboni A, Correr S, Macchiarelli G. Ultrastructural characteristics of human granulosa cells in a coculture system for in vitro fertilization. *Microsc Res Tech.* 2006;69(6):508-16.
28. Chaffikin L, Luciano A, Peluso J. The role of progesterone in regulating human granulosa cell proliferation and differentiation in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 1980;51:74-7.
29. Langhout DJ, Spicer LJ, Geisert RD. Development of a culture system for bovine granulosa cells: effects of growth hormone, estradiol, and gonadotropins on cell proliferation, steroidogenesis, and protein synthesis. *J Anim Sci.* 1991;69(8):3321-34.
30. Wrathall JH, Knight PG. Effects of inhibin-related peptides and oestradiol on androstenedione and progesterone secretion by bovine theca cells in vitro. *J Endocrinol.* 1995;145(3):491-500.
31. Spanel-Borowski K, Sterzik K. Ultrastructure of human preovulatory granulosa cells in follicular fluid aspirates. *Arch Gynecol.* 1987;240(3):137-46.
32. Mayerhofer A, Engling R, Stecher B, Ecker A, Sterzik K, Gratzl M. Relaxin triggers calcium transients in human granulosa-lutein cells. *Eur J Endocrinol.* 1995;132:507-13.
33. Stewart DR, Celniker AC, Taylor CA, Cragun JR, Overstreet JW, Lasley BL. Relaxin in the peri-implantation period. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990;1771-3.
34. Stewart DR, Overstreet JW, Celniker AC, Hess DL, Cragun JR, Boyers SP, Lasley BL. The relationship between hCG and relaxin secretion in normal pregnancies vs periimplantation spontaneous abortions. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1993;38:379-85.
35. Lobb DK, Soliman SR, Daya S, Younglai EV. Steroidogenesis in luteinized granulosa cell cultures varies with follicular priming regimen. *Human Reprod.* 1998;13:2064-7.



ELSEVIER

## Reprodução & Climatério

<http://www.sbrh.org.br/revista>


### Artigo original

# Produção de oócitos em mamíferos adultos: o camundongo como modelo

Daniel Blasioli Dentillo<sup>a</sup>, Jacira Ribeiro Campos<sup>a</sup>, Alfredo Ribeiro da Silva<sup>b</sup>,  
Sérgio Britto Garcia<sup>b</sup>, Marcos Felipe Silva de Sá<sup>a</sup>  
e Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil

<sup>b</sup> Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil

#### INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

##### Histórico do artigo:

Recebido em 10 de outubro de 2013  
Aceito em 30 de outubro de 2013  
On-line em 9 de dezembro de 2013

##### Palavras-chave:

Oócitos  
Oogênese  
Reprodução  
Infertilidade feminina

#### R E S U M O

**Objetivo:** identificar produção de oócitos em mamíferos adultos com o uso de camundongo como modelo experimental.

**Método:** empregamos a técnica de imuno-histoquímica em cortes de ovários de camundongos Balb-c (45 dias de idade) com o uso de anticorpo específico para marcação de células germinativas. Como controles positivos da reação, usamos cortes de testículos de camundongos.

**Resultados:** as células germinativas (espermatogônias, espermatócitos e espermatídes) dos controles positivos sofreram marcação, enquanto células não pertencentes a essa linhagem (células de Leydig e de Sertoli) mostraram negatividade de reação; nos cortes ovarianos observou-se marcação de oócitos de folículos em diferentes estágios de maturação, mas houve também marcação de células não englobadas pela estrutura folicular.

**Conclusões:** os achados sugerem que durante a puberdade ovários de camundongos fêmeas contêm células da linhagem germinativa em estágios anteriores à formação folicular, o que corrobora estudos anteriores; o trabalho é pioneiro no Brasil e progredirá para a completa caracterização de células com potencial oogênico em outras espécies de mamíferos. Resultados positivos poderão alterar o entendimento da biologia reprodutiva e abrir novas portas para o tratamento de infertilidade.

© 2013 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Publicado por Elsevier Editora Ltda.  
Todos os direitos reservados.

#### Oocyte production in adult mammals: mice as the model

#### A B S T R A C T

**Objective:** to identify oocyte production in adult mammals using the mouse as the experimental model.

#### Keywords:

Oocytes

\* Autor para correspondência.

E-mail: [anasars@fmrp.usp.br](mailto:anasars@fmrp.usp.br) (A.C.J.d.S. Rosa e Silva).

Oogenesis  
Reproduction  
Female infertility

*Method:* we used the immunohistochemistry technique on ovary sections of Balb-c mice (45 days old), with antibody that labels germline cells specifically. We used sections of mice's testes as positive reaction controls.

*Results:* in testes samples, germ cells (spermatogonia, spermatocytes and spermatids) were stained, while cells not belonging to germ lineage (Leydig and Sertoli cells) showed negative reaction; in ovarian samples, oocytes from follicles in different stages of maturation were stained, but the reaction was also positive for cells not enclosed by the follicular structure. *Conclusions:* the findings suggest that, during puberty, female mice ovaries contain germline cells in earlier stages before follicular formation, as was found in previous studies. The work, pioneering in Brazil, must progress to a complete characterization of these cells (with oogenesis potential) in mice and in other mammal species. Positive results may change the understanding of the reproductive biology and open new possibilities for infertility treatment.

© 2013 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Published by Elsevier Editora Ltda.  
All rights reserved.

## Introdução

Segundo a biologia reprodutiva de mamíferos, os machos são os únicos dotados de células capazes de produzir gametas durante toda a vida adulta, enquanto as fêmeas geram gametas somente durante a fase embrionário-fetal e após o nascimento não há produção de novos oócitos (oogênese) nem formação de novos folículos (foliculogênese).<sup>1,2</sup>

Apesar de esse conhecimento representar um dogma desde 1951, ele vem sendo questionado. Estudos recentes apresentaram fortes indícios da existência de células precursoras de oócitos em ovários de camundongos adultos.<sup>3-6</sup> Sendo essas células algo comum em diferentes espécies de mamífero, inclusive humanos, isso permitiria a elaboração de tratamentos diferenciados para infertilidade feminina, além de alargar as fronteiras do que se sabe sobre reprodução humana até os dias de hoje.

Ainda que seja possível a presença de células capazes de oogênese em tecido ovariano adulto, refutar o conhecimento tradicional é ainda algo distante, já que os achados recentes não são unanimidade na literatura científica nem são facilmente reprodutíveis.<sup>7,8</sup> Na tentativa de verificar a possibilidade de oogênese adulta, nosso trabalho tem como objetivo identificar a presença pós-natal de células precursoras de oócitos em mamíferos, por meio de marcadores pré-diplóteno, com o uso de camundongo como modelo experimental.

## Método

Usamos a técnica de imuno-histoquímica em ovários (cortes de 5 µm de espessura) obtidos cirurgicamente de 10 camundongos da linhagem Balb-c de 45 a 51 dias de idade, considerada adulta para esses organismos. Os órgãos foram fixados em formol 10% e permaneceram nessa solução pelo menos 24 horas antes de ser processados para inclusão em parafina.

A partir dos cortes feitos no material parafinado e após confirmação histológica por meio da observação microscópica dos cortes corados com hematoxilina e eosina (HE), as reações de imuno-histoquímica foram executadas com o kit Polímero Picture TM Max® (Invitrogen), segundo protocolo fornecido

pela empresa. Os cortes em lâmina, após ser desparafinizados e hidratados, passaram por recuperação antigênica em meio tamponado (tampão citraro, pH, 6,00) por 40 minutos a 98 °C. Posteriormente foram tratados por 30 minutos com peróxido de hidrogênio (solução 3%) e depois com soro normal de cavalo (NCL-H-SERUM, Novocastra) por mais 30 minutos. Então, cada lâmina foi incubada com o anticorpo primário anti-DDX/MVH (Abcam), diluído de acordo com as especificações do fabricante, por duas horas em câmara úmida. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo secundário e, por último, foi feita a etapa de reação avidina-biotina, por uma hora. As reações foram avaliadas por meio de microscopia de luz e identificadas após revelação por tratamento com o cromógeno diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich), por cinco minutos, e contra coloração com hematoxilina de Harris.

A imunorreatividade foi considerada positiva quando detectada coloração castanha no citoplasma das células. Cortes de testículos de camundongos, das mesmas idade e linhagem que as fêmeas, foram usados como controles positivos da reação. Paralelamente a todas as reações, um corte de tecido ovariano e um de tecido testicular serviram como controles negativos da reação a partir da omissão do anticorpo primário, o que resultou em completa ausência de sinal.

## Resultados

Nos controles positivos, as células da linhagem germinativa (espermatogônias, espermatócitos e espermatídes) sofreram marcação, enquanto células não pertencentes a essa linhagem (células de Leydig e de Sertoli) mostraram negatividade de reação (fig. 1). Nos cortes ovarianos observou-se positividade de reação em oócitos de unidades foliculares em diferentes estágios de maturação (primordial, primário, pré-antral e antral), mas também células não englobadas pela estrutura folicular, dispostas na superfície ovariana, apresentaram marcação (fig. 2).

## Discussão

Como se acredita pelo ensino tradicional, em mamíferos não há renovação de gametas femininos. Seu número declina

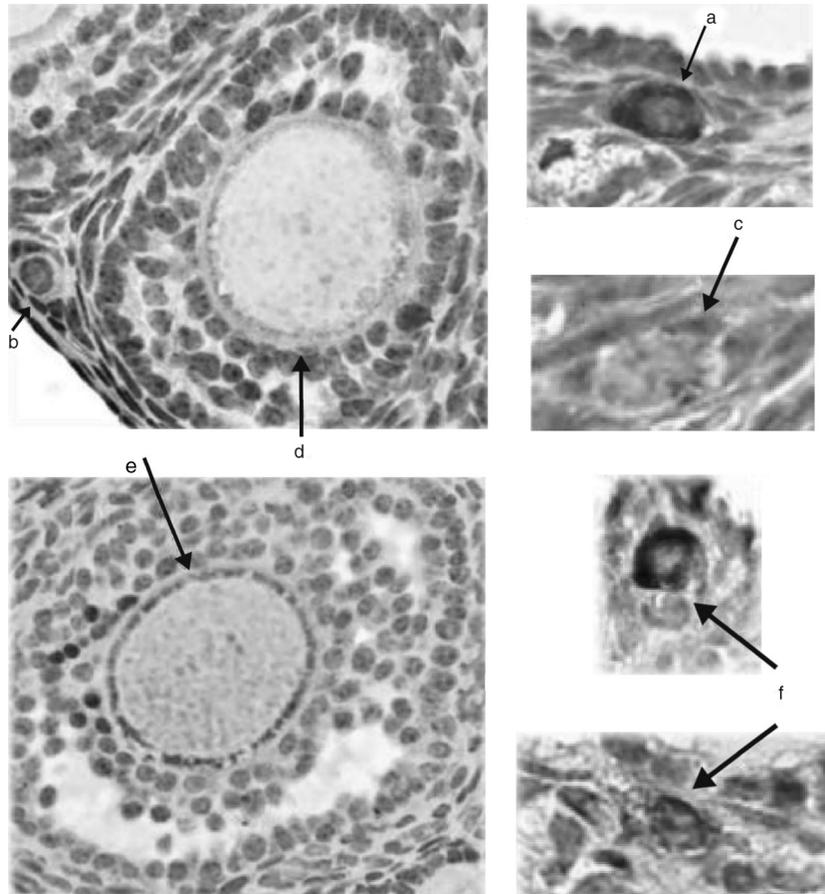


**Figura 1 – Corte de testículo. Nos túbulos seminíferos pode-se observar que a marcação citoplasmática de DDX4/MVH (cor castanha) foi negativa para: a, fibroblasto; b, células de Leydig; c, células de Sertoli. Marcações positivas: d, espermatogônias; e, espermatócitos; f, espermátides (aumento de 40×).**

durante a vida, quer seja por meio da ovulação ou de mecanismos que envolvem morte celular.<sup>9,10</sup> Desde 2004, porém, estudos sugerem que células capazes de gerar novos oócitos permaneceriam nas fêmeas de mamíferos até a vida adulta. Assim, poder-se-ia expandir, *in vitro*, o número de oócitos e impedir a falência ovariana que ocorre por causas naturais e/ou após tratamento quimioterápico.<sup>3,6</sup> No entanto, estudos contradizem os resultados dessas pesquisas, além do que nenhuma pesquisa conseguiu, até agora, conclusões convincentes quanto à existência dessas células precursoras de oócitos em diferentes espécies de mamíferos.<sup>7,11-13</sup>

O presente trabalho corrobora os achados de que pode haver produção pós-natal de oócitos. Como mostram nossos resultados, durante a puberdade, ovários de camundongos fêmeas mostraram abrigar células da linhagem germinativa não englobadas pela estrutura folicular, o que sugere que essas células estariam em estágios mais indiferenciados, anteriores à formação do folículo. São necessárias outras investigações para melhor caracterização celular, como grau de diferenciação, potencial de proliferação e meiótico. Somente assim saberemos sobre a biologia e real função dessas células.

Pesquisas na área têm significante aplicação clínica, como o desenvolvimento de tratamentos de pacientes com problemas reprodutivos. Além disso, o congelamento dessas células poderia permitir que mulheres em idade mais avançada



**Figura 2 – Corte de ovário. A marcação citoplasmática de DDX4/MVH (cor castanha) foi positiva somente para oócitos em: a, oócito em folículo primordial; b, oócito em folículo em transição primordial-primário; c, oócito em folículo primário; d, oócito em folículo pré-antral; e, oócito em folículo antral; f, foram marcadas células germinativas alheias à estrutura folicular (aumento de 40×).**

gestassem com menor chance de gerar descendentes afetados por alterações gênicas e/ou cromossômicas.

Nosso estudo é pioneiro no Brasil e progredirá para a completa caracterização de células com potencial oogênico em outras espécies de mamíferos. Resultados positivos poderão alterar o entendimento da biologia reprodutiva humana e abrir novas portas para o tratamento de infertilidade.

### Financiamento

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

### Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

### REFERÊNCIAS

1. Camargos AF, Lemos CNCD. Fisiologia reprodutiva. In: Scheffer BB, Remohí J, Garcia-Velasco JAOrg, editors. Reprodução humana assistida. São Paulo: Atheneu Editora; 2003. p. 17-21.
2. Moore KL, Persaud TVN. Embriologia clínica. 8<sup>th</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
3. Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 2004;428:145-50. <http://dx.doi.org/10.1038/nature02316>.
4. Bukovsky A, Caudle MR, Svetlikova M, Upadhyaya NB. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004;2:20. <http://dx.doi.org/10.1186/1477-7827-2-20>.
5. Tilly JL, Rueda BR. Minireview: stem cell contribution to ovarian development, function, and disease. *Endocrinology*. 2008;149:4307-11. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2008-0458>.
6. Zou K, Yuan Z, Yang Z, Luo H, Sun K, Zhou L, et al. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat Cell Biol*. 2009;11:631-6. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1869>.
7. Kerr JB, Duckett R, Myers M, Britt KL, Mladenovska T, Findlay JK. Quantification of healthy follicles in the neonatal and adult mouse ovary: evidence for maintenance of primordial follicle supply. *Reproduction*. 2006;132:95-109. <http://dx.doi.org/10.1530/rep.1.01128>.
8. Begum S, Papaioannou VE, Gosden RG. The oocyte population is not renewed in transplanted or irradiated adult ovaries. *Hum Reprod*. 2008;23:2326-30. <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/den249>.
9. Faddy MJ. Follicle dynamics during ovarian ageing. *Mol Cell Endocrinol*. 2000;163:43-8.
10. Tilly JL. Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2:838-48. <http://dx.doi.org/10.1038/35099086>.
11. Bukovsky A, Svetlikova M, Caudle MR. Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Reprod Biol and Endocrinol*. 2005;3:17. <http://dx.doi.org/10.1186/1477-7827-3-17>.
12. Virant-Klun I, Rozman P, Cvjeticanin B, Vrtacnik-Bokal E, Novakovic S, Rüllicke T, et al. Parthenogenetics embryo-like structures in the human ovarian surface epithelium cell culture in postmenopausal women with no naturally present follicles and oocytes. *Stem Cells Dev*. 2009;18:137-49. <http://dx.doi.org/10.1089/scd.2007.0238>.
13. Liu Y, Wu C, Lyu Q, Yang D, Albertini DF, Keefe DL, et al. Germline stem cells and neo-oogenesis in the adult human ovary. *Dev Biol*. 2007;306:112-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.03.006>



## Artigo original

# Prevalência de *Chlamydia trachomatis* em mulheres submetidas à fertilização assistida em Goiânia<sup>☆</sup>



Isabela Aparecida Carvalho Proto<sup>a</sup>, Jéssyka de Menezes Carneiro<sup>a</sup>, Xisto Sena Passos<sup>a,\*</sup>, Fábio Silvestre Ataídes<sup>a</sup> e Waldemar Naves do Amaral<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Faculdade de Biomedicina da Universidade Paulista (Unip), Goiânia, GO, Brasil

<sup>b</sup> Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, GO, Brasil

## INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

## Histórico do artigo:

Recebido em 15 de março de 2014

Aceito em 27 de maio de 2014

On-line em 3 de julho de 2014

## Palavras-chave:

*Chlamydia trachomatis*

Sorologia

Infertilidade feminina

Fertilização

Fertilização *in vitro*

## RESUMO

**Objetivo:** identificar dentre as mulheres que recorrem à fertilização assistida as que têm positividade para sorologia de *Chlamydia trachomatis*.

**Método:** estudo retrospectivo, do tipo transversal. As informações foram obtidas por meio da avaliação de prontuários de pacientes. Para que o estudo fosse concluído foi necessária uma amostra de 120 prontuários. A coleta foi feita com a seleção da primeira paciente de cada mês, a exclusão da segunda, a seleção da terceira e assim consecutivamente, para constituir uma amostra significativa de forma aleatória. Por meio da análise dos prontuários foram verificados os critérios de inclusão e exclusão.

**Resultados:** a frequência de infecção por *Chlamydia trachomatis* foi de 39% e uma paciente apresentou as duas sorologias positivas. A maior incidência de IgG positivo foi na faixa entre 36 e 39 anos.

**Conclusão:** a prevalência de sorologia positiva para *Chlamydia trachomatis* foi de 40%. É importante o desenvolvimento de ações assistenciais e educacionais contínuas para o cuidado com a saúde, principalmente o rastreamento em mulheres jovens, para controle da disseminação e prevenção de sequelas das doenças sexualmente transmissíveis.

© 2014 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

## Prevalence of *Chlamydia trachomatis* in women undergoing assisted reproduction in Goiânia

## ABSTRACT

**Objective:** identify among women using assisted fertilization those with seropositivity for *Chlamydia trachomatis*.

**Method:** was a retrospective, cross-sectional. Data were collected through evaluation of patient records, the required sample was 120 charts. The collection was made by selecting the

## Keywords:

*Chlamydia trachomatis*

Serology

<sup>☆</sup> Trabalho desenvolvido na Faculdade de Biomedicina da Universidade Paulista (Unip), Goiânia, GO, Brasil.

\* Autor para correspondência.

E-mail: xisto.sena@gmail.com (X.S. Passos).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.recli.2014.05.003>

1413-2087/© 2014 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

Infertility female  
Fertilization  
Fertilization in vitro

first patient of each month and was performed after a jump from a patient, with a close third to be analyzed, and so on, constitute a significant sample randomly without giving preferences. Through the analysis of the records were checked for inclusion and exclusion criteria.

Results: the frequency of *Chlamydia trachomatis* infection was 39%, one patient had two positive tests. The highest incidence of positive IgG was aged between 36-39 years.

Conclusion: the prevalence of positive serology for *Chlamydia trachomatis* was 40%. It is important to develop actions and continuing educational assistance for health care, especially in screening young women for controlling the spread and prevention of sequelae of sexually transmitted diseases.

© 2014 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Published by Elsevier Editora Ltda.

All rights reserved.

## Introdução

Entre as principais causas de doenças sexualmente transmissíveis (DST), a *Chlamydia trachomatis* (CT) constitui um dos agentes etiológicos bacterianos mais frequentes em todo o mundo, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento.<sup>1</sup> A infecção por esse patógeno pode ser assintomática em cerca de 80% dos casos e sintomática em 20%. A recorrência é comum, especialmente em indivíduos infectados antes dos 20 anos.

A *Chlamydia trachomatis* é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbica, parasita intracelular obrigatório, que contém tanto ácido desoxirribonucleico (DNA) quanto ácido ribonucleico (RNA) e de parede celular rígida. Essa bactéria necessita de células colunares ou pseudoestratificadas para sua sobrevivência e é um dos agentes responsáveis por doenças do trato urogenital feminino.<sup>2</sup>

As infecções por *Chlamydia trachomatis* no aparelho reprodutivo são assintomáticas, o que dificulta o seu diagnóstico precoce. As principais manifestações são salpingite, cervicite, uretrite, endometrite, doença inflamatória pélvica (DIP), infertilidade e gravidez ectópica. A infecção se inicia usualmente pela endocérvice, onde ocorre uma evolução para obstrução tubária<sup>3</sup> e DIP que se associa à infertilidade tubária.<sup>4</sup>

A gravidez ectópica está relacionada com acometimento das trompas de falópio, onde ocorre obstrução e danos ciliares, o que explica a infertilidade como uma das principais consequências das manifestações por *Chlamydia trachomatis*.<sup>5</sup> O paradoxo em relação à infecção por *Chlamydia trachomatis* é que, mesmo assintomática, poderá ter como uma das principais consequências a infertilidade, como nos casos de imunopatologia tubária e salpingite latente.

A ausência de diagnóstico e tratamento das infecções por *Chlamydia trachomatis* representa um grave problema de saúde pública.<sup>6</sup> Mulheres sexualmente ativas, idade precoce de início sexual, número de parceiros sexuais, troca frequente de parceiros e baixa adesão ao uso de preservativos constituem fatores de risco, tanto de infecção como de reinfecção por *Chlamydia trachomatis*.<sup>7</sup>

Os anticorpos contra alguns antígenos da *Chlamydia trachomatis* são produzidos regularmente pelo hospedeiro infectado.<sup>2</sup> Em clínicas de infertilidade o teste de anticorpo para esse patógeno é rotina base de investigação.<sup>8</sup> Soro anti-*Chlamydia trachomatis* IgG é usado no rastreamento de

mulheres com infertilidade.<sup>9</sup> O teste sorológico para *Chlamydia trachomatis*, pela detecção de vários anticorpos específicos, é, hoje em dia, uma opção metodológica eficaz e muito aceitável. A presença de IgM específica indica uma infecção aguda por *Chlamydia trachomatis*. No entanto, a sua ausência não exclui a presença de uma infecção, especialmente nos casos recorrentes e crônicos. A IgG é marcadora de resposta imune positiva para essa bactéria, quer em infecções correntes, crônicas ou passadas.

Diante do exposto, este estudo tem como objetivo identificar dentre as mulheres que recorrem à fertilização assistida as que têm positividade para sorologia de *Chlamydia trachomatis*.

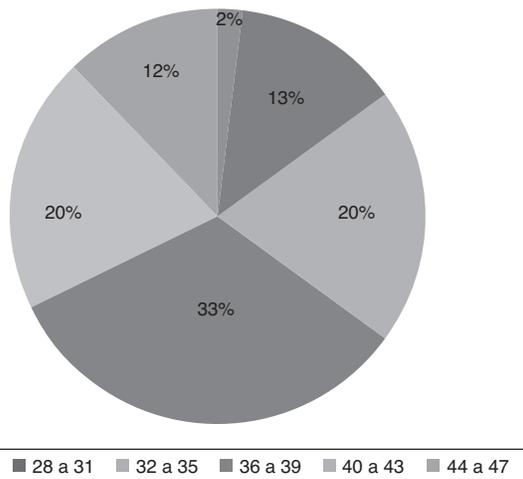
## Método

Estudo retrospectivo, do tipo transversal, em que foram analisados prontuários de 120 pacientes atendidas de janeiro a dezembro de 2012 em uma clínica de fertilização em Goiânia, Goiás. A coleta dos dados foi feita com a seleção da primeira paciente de cada mês, exclusão da segunda, seleção da terceira e assim sucessivamente. Isso se repetiu durante todo o período em que foi conduzida a pesquisa, constituiu uma amostra significativa aleatória e seguiu sempre os critérios de inclusão e exclusão.

Dentro dos prontuários foram analisados os resultados de sorologia para *Chlamydia trachomatis*. A amostra foi constituída de prontuários de pacientes de fertilização *in vitro* e para o cálculo do tamanho amostral foi usado um erro de 5%, um intervalo de confiança de 95% e considerado que o percentual máximo de pacientes com sorologia positiva seja de 85%, o que totalizou 120 pacientes.

Como critérios de inclusão foram usados os resultados dos exames de pacientes com idade maior ou igual a 18 anos cadastradas para fertilização *in vitro*. Foram excluídas as que tinham prontuários com informações incompletas e cadastradas em outras técnicas que não fossem a fertilização *in vitro* e ausência de resultados de exames arquivados. Exames cadastrados mais de uma vez no sistema foram considerados o primeiro resultado.

De acordo com os aspectos éticos, a coleta de dados foi feita após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade União de Goyazes, sob o protocolo 076/2013-2. As pacientes investigadas não foram identificadas e sua identidade foi preservada, conforme a Resolução CNS 196/96.



**Figura 1 – Distribuição por faixa etária dos pacientes analisados.**

## Resultados

Foi avaliada uma amostra de 120 prontuários de mulheres que buscaram o serviço de fertilização por não conseguirem engravidar. A faixa etária variou entre 24 e 48, com média de 37. Do total de casos houve a seguinte distribuição por faixa etária: duas (2%) tinham entre 24 e 27 anos; 16 (13%) entre 28 e 31; 24 (20%) entre 32 e 35; 40 (33%) entre 36 e 39; 24 (20%) entre 40 e 43; e 14 (12%) entre 44 e 47 (fig. 1).

Dos resultados das sorologias IgM e IgG para *Chlamydia trachomatis* analisados, uma paciente (0,8%) tinha IgM positivo, com faixa etária entre 32 e 35. Na análise de resultados para IgG, 47 pacientes (39%) tinham IgG positivo e a ocorrência foi maior na faixa etária de 36 a 39. Na faixa etária entre 24 e 27, a ocorrência foi de duas pacientes (1,7%); entre 28 e 31, de cinco (4,2%); entre 32 e 35, de sete (5,8%); entre 36 e 39, de 17 (14,2%); entre 40 e 43, de dez (8,3%); e entre 44 e 47, de seis (5%) (tabela 1). Da amostra total de prontuários analisados, 47 (39%) tinham uma ou ambas as sorologias (IgM ou IgG) positivas.

## Discussão

A prioridade da análise foi relacionar a infecção por *Chlamydia trachomatis*, confirmada pela sorologia, às mulheres que procuram o serviço de reprodução assistida como uma forma de

engravidar, no qual 47 (39%) apresentaram positividade, seja para presença da doença ou contato anterior com o patógeno. A maior ocorrência de IgG positivo foi na faixa etária entre 36 e 39, com 17 casos (14,2%).

Outros estudos, que usaram outras técnicas, encontraram valores próximos, mas o setor de ginecologia do Instituto Fernandes Figueira obteve 33% de positividade no teste de imunofluorescência direta para *Chlamydia trachomatis*.<sup>2</sup> Em um hospital universitário de Manaus, entre 106 mulheres inférteis foi relatada prevalência de 52,8% com o uso da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e sítio de coleta endocervical.<sup>10</sup> Araújo et al.<sup>11</sup> obtiveram aproximadamente 20% de positividade para infecção por clamídia em adolescentes e mulheres jovens em Goiás com o uso do teste PCR em material de coleta endocervical.<sup>11</sup> Os dois primeiros estudos também foram feitos com mulheres inférteis.

Estudos têm mostrado resultados variáveis sobre as prevalências desse microrganismo no Brasil. Um estudo multicêntrico usou outra técnica, a da captura híbrida em amostra cérvico-vaginal, para avaliar 3.300 gestantes com média de 23,8 anos residentes em seis cidades brasileiras e descreveu prevalências menores do que 9,4%.<sup>12</sup> Em Salvador, a prevalência de infecção por *Chlamydia trachomatis* foi de 11,4% em clínica de planejamento familiar, de 17% em escola secundária e de 12,9% em mulheres procedentes de favelas, com o uso de PCR em amostra de urina.<sup>13</sup> Outro estudo que usou PCR também em amostra de urina, em Vitória, com 464 mulheres de 15 a 19 anos, verificou prevalência de 12,2%.<sup>14</sup>

Em unidades básicas de saúde da região metropolitana de São Paulo, entre 781 mulheres de 18 a 40 anos foi descrita infecção por *Chlamydia trachomatis* em 8,4%.<sup>15</sup> Outro estudo em uma clínica privada de Fortaleza feito com 214 mulheres diagnosticou infecção por *Chlamydia trachomatis* em 6%.<sup>16</sup>

A sorologia é recomendada para estudos epidemiológicos e infecções sistêmicas. Entretanto, não é recomendada para diagnóstico de infecções urogenitais por causa da frequência de exposição aos sorotipos da *Chlamydia trachomatis* e pela ocorrência de relações cruzadas com outras espécies, o que torna difícil valorizar determinações de anticorpo em uma amostra e aumenta o risco de falso-negativos. A sororreatividade em clínicas de doenças sexualmente transmissíveis é maior do que 60%. O teste de escolha para diagnóstico de *Chlamydia trachomatis* é o PCR.<sup>17-20</sup>

Os serviços de reprodução assistida têm feito, em geral, a investigação de casais inférteis candidatos à fertilização *in vitro* (FIV) por meio de testes sorológicos para *Chlamydia trachomatis*. Isso se deve à possibilidade de optarem pela doação no momento da assinatura do consentimento livre e esclarecido ou em algum momento posterior.<sup>1</sup> Não é conhecido se as taxas de sucesso da FIV podem ser comprometidas por causa da presença da infecção e os dados da literatura têm sido escassos e controversos.<sup>21,22</sup> Entretanto, para que resultados confiáveis da infecção ativa sejam obtidos e possam ser comparados, é aconselhável que sejam usados testes diretos para diagnóstico de infecções por *Chlamydia trachomatis*.<sup>1</sup>

Nenhuma outra DST tem mostrado frequência tão elevada quanto a infecção por *Chlamydia trachomatis*. A falta de sintomas em até 80% dos casos dos indivíduos infectados tem sido a grande dificuldade de se firmar o seu diagnóstico, o que dificulta a quebra da cadeia epidemiológica e o próprio manejo

**Tabela 1 – Distribuição dos pacientes de acordo com a faixa etária e a ocorrência de sorologia**

Idade	IgM +	IgM -	IgG +	IgG -
24-27	0	2	2	0
28-31	0	16	5	11
32-35	1	23	7	17
36-39	0	40	17	23
40-43	0	24	10	14
44-47	0	14	6	8
TOTAL	1	119	47	73

dessa infecção. A detecção de mulheres portadoras de danos tubários, por vezes irreversível, é frequente em ambulatórios de esterilidade.<sup>23,24</sup>

## Conclusão

A prevalência de sorologia positiva para *Chlamydia trachomatis* foi de 40%. O número de mulheres que tiveram contato com a *Chlamydia trachomatis* é alto, mesmo com o passar dos anos. É importante o desenvolvimento de ações assistenciais e educacionais contínuas para o cuidado com a saúde, principalmente o rastreamento em mulheres jovens para controle da disseminação e prevenção de sequelas das doenças sexualmente transmissíveis.

## Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## REFERÊNCIAS

- Ovalle A, Martínez MA, de la Fuente F, Falcon N, Feliú F, Fuentealba F, et al. Prevalencia de infecciones de transmisión sexual en mujeres embarazadas atendidas en un hospital público de Chile. *Rev Chilena Infectol*. 2012;29:517-20.
- Rodrigues EBB, Sá RAM, Rodrigues SSO, Passos MRL, Barreto NA, Pinheiro VMS. Análise da pesquisa de *Chlamydia trachomatis* no setor de ginecologia do Instituto Fernandes Figueira. *DST J Bras Doenças Sex Transm*. 2000;12:16-22.
- Pantoja M, Campos EA, Pitta DR, Gabiatti JE, Bahamondes MV, Fernandes AMS. Prevalência de infecção por *Chlamydia trachomatis* em mulheres candidatas à fertilização *in vitro* em serviço público de referência do Estado de São Paulo. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2012;34:425-31.
- Huneus A, Pumarino MG, Schilling A, Robledo P, Bofil M. Prevalencia de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* en adolescentes chilenas. *Rev Med Chil*. 2009;137:1569-74.
- Urbina MT, Medina R, Muñoz G, Sánchez LV, Benjamín I, Lerner J. Infección por *Chlamydia trachomatis*. *Rev Obstet Ginecol Venez*. 2010;70:90-6.
- Benzaken AS, Sales DN, Palheta-Junior JIL, Predrosa VL, García E. Prevalência da infecção por clamídia e gonococo em mulheres atendidas na clínica de DST da Fundação Alfredo da Matta, Manaus. *Amazonas DST J Bras Doenças Sex Transm*. 2010;22:129-34.
- Piazzetta RCPS, Carvalho NS, Andrade RP, Piazzetta G, Piazzetta SR, Carneiro R. Prevalência da infecção por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* em mulheres jovens sexualmente ativas em uma cidade do Sul do Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2011;33:328-33.
- Thomas K, Coughlin L, Mannion PT, Haddad NG. The value of *Chlamydia trachomatis* antibody testing as part of routine infertility investigations. *Hum Reprod*. 2000;15:1079-82.
- Moaiedmohseni S, Owje M. The value of *Chlamydia trachomatis* antibody testing in prediction of tubal factor infertility. *Journal of Family and Reproductive Health*. 2008;2:29-32.
- De Lima NSF, Borborema-Santos CM, Barroso NDS, Costa CMO, Dutra JRF, Astolfi-Filho S. High prevalence detection of *Chlamydia trachomatis* by polymerase chain reaction in endocervical samples of infertile women attending university hospital in Manaus, Amazonas. *Brazil Gynecol Obstet Invest*. 2011;72:220-6.
- Araújo RS, Guimarães EM, Alves MF, Sakurai E, Domingos LT, Fioravante FC, et al. Prevalence and risk factors for *Chlamydia trachomatis* infection in adolescent females and young women in central Brazil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2006;25:397-400.
- Jalil EM, Pinto VM, Benzaken AS, Ribeiro D, Oliveira EC, Garcia EG, et al. Prevalência de infecção por clamídia e gonococo em gestantes de seis cidades brasileiras. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2008;30:614-9.
- De Codes JS, Cohen DA, de Melo NA, Teixeira GG, Leal AS, Silva TJ, et al. Detecção de doenças sexualmente transmissíveis em ambientes clínicos e não clínicos na cidade de Salvador, Bahia. *Brasil Cad Saúde Pública*. 2006;22:325-34.
- Miranda AE, Szwarcwald CL, Peres RL, Page-Shafer K. Prevalence and risk behaviors for chlamydial infection in a population-based study of female adolescents in Brazil. *Sex Transm Dis*. 2004;31:542-6.
- Luppi CG, Oliveira RLS, Veras MA, Lippman SA, Jones H, Jesus CH, et al. Diagnóstico precoce e os fatores associados às infecções sexualmente transmissíveis em mulheres atendidas na região primária. *Rev Bras Epidemiol*. 2011;14:467-77.
- Eleuterio RMN, Eleutério-Junior J, Giraldo PC, Muniz AMV. Cervicite por *Chlamydia trachomatis* em mulheres sexualmente ativas atendidas em um serviço privado de ginecologia na cidade de Fortaleza. *Rev Bras Anal Clin*. 2007;39:287-90.
- Castelo JS. Prevalência de infecção em mulheres com diagnóstico de infertilidade no CGCB: qual o agente mais comum? [dissertação]. Covilhã: Curso de Medicina da Universidade da Beira Interior; 2012.
- Seadi CF, Oravec R, von Poser B, Cantarelli VV, Rossetti ML. Diagnóstico laboratorial da infecção pela *Chlamydia trachomatis*: vantagens e desvantagens das técnicas. *J Bra Patol Med Lab*. 2002;38:125-33.
- Michelete LA, Dias MMB, Silva ACF, Cabral CS, de Abreu LC, Drezett J. Infecção por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* em mulheres adolescentes e adultas vítimas de violência sexual. *Reprod Clim*. 2012;27:58-64.
- Drezett J, Vasconcellos RM, Pedroso D, Blake MT, Oliveira AG, de Abreu LC. Transmission of anogenital warts in children and association with sexual abuse. *J Hum Growth Developm*. 2012;22:34-40.
- Wilkowska-Trojniel M, Zdrodowska-Stefanow B, Ostaszewska-Puchalska I, Zbucka M, Wolczynski S, Grygoruk C, et al. *Chlamydia trachomatis* urogenital infection in women with infertility. *Adv Med Sci*. 2009;54:82-5.
- Pacchiarotti A, Sbracia M, Mohamed MA, Frega A, Pacchiarotti A, Espinola SM, et al. Autoimmune response to *Chlamydia trachomatis* infection and *in vitro* fertilization outcome. *Fertil Steril*. 2009;91:946-8.
- Marques CAS, Menezes MLB. Infecção genital por *Chlamydia trachomatis* e esterilidade. *DST J Bras Doenças Sex Transm*. 2005;17:66-70.
- Tavares CM, Kanikadan PYS, Alencar AP, Schor N. Beginning of sexual life of adolescents in Santiago Island, Cape Verde, West Africa. *J Hum Growth Developm*. 2011;21:771-9.



## Reprodução & Climatério

<http://www.sbrh.org.br/revista>



### Artigo de revisão

# O impacto da criopreservação na qualidade seminal<sup>☆</sup>

Vivian Taís Fernandes Cipriano<sup>a,\*</sup> e Gilberto da Costa Freitas<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil

<sup>b</sup> Departamento de Obstetrícia e Ginecologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

<sup>c</sup> Serviço de Reprodução Humana, Hospital Pérola Byington, São Paulo, SP, Brasil

#### INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

##### Histórico do artigo:

Recebido em 26 de setembro de 2013

Aceito em 25 de outubro de 2013

On-line em 3 de julho de 2014

##### Palavras-chave:

Técnicas reprodutivas

Fertilidade

Infertilidade masculina

Criopreservação

Análise de sêmen

#### R E S U M O

**Introdução:** as indicações iniciais para o uso da técnica de fertilização *in vitro* contemplavam boa parte dos diagnósticos de infertilidade feminina. Com o passar do tempo, tornou-se necessário o desenvolvimento de outras tecnologias que tratassem também os casos de infertilidade masculina. Dentre elas, destaca-se a criopreservação de gametas. Apesar das vantagens do uso da criopreservação, sabe-se que alguns processos de congelamento podem afetar o potencial de fertilidade em muitos aspectos.

**Objetivo:** por meio de uma revisão, verificar o impacto da criopreservação na qualidade do sêmen por meio da observação da taxa de gestação, taxa de aborto e das características seminais (morfologia, motilidade, concentração, fragmentação do DNA) no sêmen congelado e o no fresco, colhidos diretamente do epidídimo.

**Método:** foi feita uma estratégia de busca nas bases de dados Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (Lilacs), Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (Medline) e Biblioteca Cochrane por meio das seguintes palavras-chaves: *sêmen*, *criopreservação*, *frozen sêmen*, *thawed sêmen* e *sêmen quality*. As pesquisas foram feitas tanto nos artigos e nas revisões disponíveis em *full text* como nos resumos.

**Resultados:** de maneira geral, o que se observou foi que em alguns casos a criopreservação pode prejudicar a morfologia seminal. Porém, a quantidade de nascimentos e de abortos não varia significativamente quando comparado sêmen fresco com congelado obtidos diretamente do epidídimo.

**Conclusões:** por prolongar a fertilidade de muitos pacientes e ajudá-los na realização do sonho da paternidade, na maioria dos casos, a criopreservação é uma boa técnica que deve ser usada quando necessário.

© 2013 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Publicado por Elsevier Editora Ltda.

Todos os direitos reservados.

### The impact of the cryopreservation on seminal quality

#### A B S T R A C T

##### Keywords:

Reproductive techniques

**Introduction:** the initial indications to the use of *in vitro* fertilization technologie attended almost all the female infertility cases. Over the time, the development of others technologies

<sup>☆</sup> Trabalho realizado no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil.

\* Autor para correspondência.

E-mail: [viviancipriano@usp.br](mailto:viviancipriano@usp.br) (V.T.F. Cipriano).

Fertility  
Male infertility  
Cryopreservation  
Sperm analysis

that could treat the male infertility cases too became necessary. Among the technologies, it can be standed out the gametes cryopreservation. Despite the cryopreservation advantages, it is known that some freezing processes can affect fertility potential in many ways.

*Objective:* verify the impact of cryopreservation on semen quality by observing the pregnancy rate, abortion rate and seminal characteristics (morphology, motility, concentration and DNA) fragmentation between frozen semen and fresh semen harvested directly from the epididymis, through a review.

*Method:* for this, it was done a research in the databases Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (Lilacs), Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (Medline) and Cochrane using the following keywords semen cryopreservation, frozen semen, thawed semen and semen quality. The surveys were made both in articles and reviews available in *full text* as in the summaries.

*Results:* in general, the seminal cryopreservation may damage the morphology of semen. However, the number of births and abortions does not vary significantly when compared frozen semen with fresh semen obtained directly from the epididymis

*Conclusions:* thus, by extending the fertility of many patients, helping them in achieving the dream of paternity in most cases, cryopreservation is a good technique that can be used when necessary.

© 2013 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Published by Elsevier Editora Ltda.

All rights reserved.

## Introdução

O nascimento do primeiro bebê concebido por meio de técnicas de reprodução humana assistida (RHA) ocorreu em 1978.<sup>1</sup> Acontecimento de extrema importância para a medicina reprodutiva, que só foi reconhecido 30 anos depois por meio da premiação de Robert Edwards com o Nobel de Medicina e Fisiologia, em 2010.

A técnica de fertilização *in vitro* descrita inicialmente tem várias etapas: estimulação da ovulação, coleta dos oócitos e coleta de oócitos de suporte de fase lútea, seguidas pela fertilização *in vitro* e transferência dos embriões. As indicações iniciais dessa técnica contemplavam boa parte dos diagnósticos de infertilidade, principalmente para os casos de obstrução tubária. Entretanto, alguns diagnósticos, como o fator masculino grave, não eram solucionados por ela.<sup>2-4</sup> Com isso, várias outras tecnologias foram desenvolvidas paralelamente, com o objetivo de potencializar os resultados da técnica inicial e favorecer casos de infertilidade masculina. Dentre elas, destaca-se a criopreservação de gametas.<sup>5-7</sup> O interesse na criopreservação e no armazenamento de sêmen data de 1776, quando se observou que em temperaturas frias os espermatozoides humanos tornavam-se lentos e chegam ao estado de completa inativação. Esse quadro se revertia com o aumento da temperatura.<sup>8,9</sup>

Em 1866, com o objetivo de preservar amostras de homens mortos em batalhas, pesquisadores sugeriram a possibilidade de um banco de sêmen humano. Em 1938, 70 anos depois, foi observada a sobrevivência de espermatozoides humanos por longos períodos quando resfriados em CO<sub>2</sub> sólido, sob temperatura de -79° C. A partir de então, concluiu-se que espermatozoides sobreviveriam em temperaturas abaixo de 160° C negativos.<sup>9</sup>

Em 1949, foi relatado o primeiro uso do glicerol como crioprotetor e iniciou-se um rápido desenvolvimento das técnicas de criopreservação e de soluções crioprotetoras.<sup>10</sup> De 1962 a

1963, o vapor de nitrogênio líquido foi usado para criopreservar amostras de sêmen até que, em 1963, descobriu-se que o armazenamento do espermatozoide humano no nitrogênio líquido em temperatura de -196° C era mais eficiente do que sob -75° C.<sup>8</sup>

Para criopreservação, dois tipos de congelamento são usados: lento e rápido. O primeiro é um método no qual a amostra é gradualmente resfriada na fase de vapor por cerca de 40 minutos. Já no congelamento rápido, normalmente coloca-se o sêmen em suspensão em vapor de nitrogênio líquido para armazená-lo em temperatura de 196° C negativos.<sup>11</sup> As amostras podem ser descongeladas lentamente, sob temperatura ambiente por 30 a 60 minutos, ou rapidamente, sob 37° C por cinco a 10 minutos, antes de estarem prontas para remoção do crioprotetor.<sup>10</sup>

A coleta de espermatozoides a serem criopreservados pode ocorrer por masturbação ou por processos mais invasivos, quando necessário. Nos casos de azoospermia, para obtenção dos espermatozoides remanescentes no epidídimo ou no testículo são usadas várias técnicas, como a extração espermática por meio da retirada de pequenos fragmentos do epidídimo.<sup>12</sup> A desnecessária repetição de processos de coleta invasivos e dolorosos como esse é uma das vantagens da criopreservação, já que apenas uma coleta obtida diretamente do epidídimo é suficiente para ser criopreservada. Em longo prazo, pode-se dizer que a criopreservação pode diminuir custos e facilitar as técnicas de reprodução assistida.<sup>13</sup>

Outra vantagem que o processo oferece é em pacientes com doenças como câncer ou hepatite. Isso porque a fertilidade humana depende de uma maturação orquestrada das células espermáticas, bem como dos processos de meiose de maneira correta. Pacientes com essas doenças podem ter um desvio nessa maturação durante a formação dos gametas ou danificá-los após procedimentos como quimioterapia ou radioterapia.<sup>14</sup> Essas pessoas podem ter a fertilidade preservada por meio da criopreservação dos seus espermatozoides sadios no momento certo.

Apesar dessas e de outras vantagens do uso da criopreservação, sabe-se que alguns processos de congelamento podem afetar o potencial de fertilidade em muitos aspectos, como no decréscimo da motilidade,<sup>15</sup> na alteração na membrana celular,<sup>16</sup> na diminuição na integridade do acrossomo<sup>17</sup> e na indução da fragmentação de DNA.<sup>18</sup> Assim, até que ponto a criopreservação pode influenciar na qualidade do sêmen colhido diretamente do epidídimo? Afinal, o processo oferece mais vantagens ou desvantagens? O objetivo deste trabalho é revisar a literatura sobre o impacto da criopreservação na qualidade do sêmen.

## Método

Revisão da literatura sobre o impacto da criopreservação na qualidade do sêmen colhido diretamente do epidídimo por meio da observação dos seguintes parâmetros: taxa de gestação, taxa de aborto e características seminais, segundo Krüger et al. (1987):<sup>19</sup> morfologia, motilidade, concentração e fragmentação do DNA entre o sêmen congelado e o fresco. Para tanto, foi feita estratégia de busca nas bases de dados Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (Lilacs), Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (Medline) e Biblioteca Cochrane por meio das seguintes palavras-chaves: *sêmen*, *criopreservação*, *frozen sêmen*, *thawed sêmen* e *sêmen quality*. As pesquisas foram feitas tanto nos artigos e nas revisões disponíveis em *full text* como nos resumos.

## Discussão

Ao analisar as taxas de gestação e de fertilização após injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) para verificar a influência da criopreservação, Kalsi et al. (2011)<sup>20</sup> compararam 493 pacientes. Para isso, usaram sêmen testicular fresco em 112 ciclos, sêmen testicular congelado em 43 ciclos, sêmen fresco do epidídimo em 279 ciclos e sêmen congelado do epidídimo em 59 ciclos. Para cada grupo, a etiologia da azoospermia apresentada, a azoospermia obstrutiva (AO) e a azoospermia não obstrutiva (ANO) foram consideradas. Posteriormente, as taxas de fertilização e de gestação foram determinadas para cada grupo.

Os resultados mostraram que o uso de sêmen congelado obtido do epidídimo na ICSI é tão confiável e favorável quanto o uso de sêmen fresco do epidídimo ( $p = 0,35$ ). Porém, sugere-se que há uma maior taxa de gestação (39,5% versus 29,5%) e de nascimentos (55,8% versus 43%) para o sêmen testicular congelado do que fresco no caso de azoospermias obstrutivas ou não obstrutivas ( $p = 0,047$ ). Isso pode ser ocasionado pelo fato de que esses pacientes tinham sêmen de melhor qualidade quando esse foi congelado.<sup>20</sup>

O congelamento repetitivo do sêmen também tem influência na qualidade do gameta e a motilidade das amostras foi analisada para verificar essa influência.<sup>19</sup> Dong et al. (2009)<sup>21</sup> coletaram o sêmen diretamente do epidídimo de 16 indivíduos normais e oligospermicos e o congelaram em nitrogênio. Uma alíquota de cada amostra foi retirada para análise e o restante foi criopreservado novamente, sem remover o crioprotetor. Repetiu-se o processo várias vezes, até não haver mais espermatozoides móveis. A motilidade foi analisada após cada

congelamento e comparada entre os grupos. Observou-se que a motilidade dos espermatozoides foi mantida até o quinto congelamento para pacientes normospermicos e até o segundo congelamento para aqueles oligospermicos.<sup>21</sup>

Foi verificado também o efeito do congelamento/descongelamento do sêmen na fragmentação do DNA, na motilidade e na vitalidade. Thomson et al. (2010)<sup>22</sup> analisaram 20 homens que apresentavam infertilidade e tiveram seu sêmen colhido do epidídimo congelado e descongelado três vezes, com lavagem ou não das amostras em cada ciclo e adição de crioprotetor a elas. A porcentagem de fragmentação de DNA aumentou significativamente após cada ciclo. No entanto, as amostras que não foram lavadas e não receberam crioprotetor depois de cada descongelamento apresentaram-se significativamente melhores. Em ambas a motilidade e a vitalidade diminuíram de forma constante após cada ciclo, mas a sobrevivência celular foi significativamente maior nas amostras não lavadas.<sup>22</sup>

Com relação à influência isolada do tipo de congelamento e crioprotetor usados, Leibo et al. (2007)<sup>23</sup> demonstraram que o descongelamento rápido interfere negativamente bem menos do que o descongelamento lento e que o uso do crioprotetor glicerol na presença da gema de ovo é o método que mais favorece a motilidade do espermatozoide. Dessa forma, além da metodologia de criopreservação, a escolha do crioprotetor é determinante na viabilidade, qualidade e resistência seminal.<sup>23</sup>

Nesse sentido, por meio dos resultados obtidos para motilidade espermática, capacitação, reação acrossômica e potencial de membrana mitocondrial (MMP), pesquisadores já desenvolveram a vitrificação de espermatozoides sem crioprotetores.<sup>24</sup> Isachenko et al. (2012)<sup>24</sup> relataram o nascimento de dois bebês saudáveis após a ICSI com o uso de espermatozoides móveis vitrificados. Os espermatozoides, em um dos casos com oligoastenoteratozoospermia, foram colhidos do epidídimo e congelados em palhetas com fluido tubário humano suplementado com 0,5% de albumina de soro humano e 0,25 M de sacarose. A motilidade espermática, capacitação, reação acrossômica e o MMP foram comparados entre espermatozoides frescos e vitrificados. Oito oócitos maduros foram microinjetados com os dois tipos de amostra. Embora a motilidade dos espermatozoides vitrificados fosse significativamente menor do que a dos espermatozoides frescos (60% versus 90%), não houve diferenças na porcentagem de capacitação e da reação acrossomal entre os dois tipos de espermatozoides, vitrificado e fresco (10% versus 8% e 5% versus 8%, respectivamente). No entanto, o MMP em espermatozoides vitrificados foi aparentemente prejudicado no ejaculado usado para ICSI em comparação com espermatozoides frescos (63% versus 96%).

Esses resultados sugerem que a vitrificação livre de crioprotetor permeável pode ser aplicada com sucesso em vários procedimentos de reprodução assistida, em particular na ICSI com espermatozoides móveis vitrificados, no qual se consegue uma gravidez normal até o nascimento. Foram estudadas por Ozkavukcu et al. (2008)<sup>25</sup> amostras de sêmen de 15 homens com fertilidade normal, obtidas diretamente do epidídimo, e avaliadas sua morfologia, motilidade e viabilidade por microscopia eletrônica. Os voluntários tinham idade média de 24,5 anos. As amostras foram liquefeitas por 45 minutos a 45°C.

Uma alíquota era imediatamente misturada a agentes crioprotetores e congelada para investigações futuras, enquanto outra alíquota era processada e avaliada. Dessa forma, antes e depois da criopreservação obtinham-se as características seminais, as quais eram comparadas entre si. A vitalidade foi determinada pelo método eosina-negrosina, que revelou 83% dessa característica antes do congelamento e 38% pós-congelamento. Com relação à morfologia, não houve mudança significativa na cabeça, na peça intermediária e no acrossomo. Por outro lado, houve aumento nas anormalidades de cauda, o que comprovou o custo da toxicidade osmótica e química dos crioprotetores pelo benefício da preservação da fertilidade.<sup>25</sup>

Em outro estudo, a taxa de fertilização foi usada para verificar a influência do congelamento de pequeno número de espermatozoides ou do espermatozoide individual. A amostra colhida do epidídimo foi equilibrada em tampão crioprotetor e injetada com agulha de ICSI em uma gota de crioprotetor que continha a proporção 1:1 de plasma seminal e crioprotetor. Esse conteúdo foi armazenado em nitrogênio líquido. Os espermatozoides foram descongelados em banho de óleo a 37 °C, sem diluição e centrifugação. Para testar a capacidade de fertilização, os espermatozoides recuperados foram injetados por ICSI ou por FIV. Espermatozoides frescos a partir das mesmas amostras de sêmen serviram como controle. Após os ensaios, as taxas de fertilização para os espermatozoides frescos e congelados-descongelados foram de 67,6% (25/37) e 60,6% (40/66), respectivamente ( $p = 0,052$ ). As taxas médias de clivagem nos grupos frescos e congelados-descongelados foram de 88% (22/25) e 85% (34/40), respectivamente ( $p = 0,990$ ). Esse método de criopreservação para números pequenos ou individuais de espermatozoides humanos não apresentou influência na qualidade seminal entre amostras criopreservadas e frescas. Trata-se de técnica promissora para a aplicação em pacientes oligozoospermicos.<sup>26</sup>

Muitos homens portadores de determinados cânceres do aparelho reprodutor necessitam, muitas vezes, de tratamentos que podem ser gonadotóxicos, o que leva ao questionamento de que a criopreservação poderia ser uma solução para eles. Hagenas et al. (2010)<sup>27</sup> estudaram 86 pacientes com câncer os quais tiveram seu sêmen colhido do epidídimo congelado antes de serem submetidos aos tratamentos ou procedimentos que pudessem prejudicar sua fertilidade. Todas as amostras foram analisadas antes da criopreservação quanto a volume, morfologia, motilidade e concentração. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido, em palhetas de 0,5 ou 0,25 mL. Dos 86 pacientes, 71 tiveram sucesso na criopreservação do sêmen. Isso demonstra que, muitas vezes, esse pode ser o método de escolha para esses casos.<sup>27</sup>

Alguns estudos demonstraram que outro fator interferente na criopreservação do sêmen é o próprio sêmen. Alguns indivíduos produzem ejaculados mais aptos e resistentes à criopreservação do que outros. Isso porque a criopreservação pode ter um profundo efeito na viabilidade e função do espermatozoide, por causa tanto das mudanças fisiológicas ocorridas no processo pela formação de cristais de gelo como dos efeitos do crioprotetor na composição da membrana espermática.<sup>28</sup> Dessa forma, a depender da qualidade do sêmen, muitas vezes selecionam-se apenas alguns candidatos à criopreservação.<sup>29</sup>

Desde os anos 1960 os bancos de sêmen têm sido usados com muito sucesso na preservação da fertilidade masculina.<sup>13</sup> Apesar dos possíveis danos que essa prática pode causar na qualidade seminal, várias pesquisas mostram que similares taxas de fertilização e gestação podem ser obtidas após ICSI com o uso de sêmen congelado ou fresco pós-coleta do epidídimo.<sup>30</sup>

Em um futuro próximo, os efeitos tóxicos do congelamento tendem a ser contornados e restarão apenas os pontos positivos das técnicas, que ajudarão e atrairão ainda mais pacientes necessitados.

## Conclusões

Modernas tecnologias têm sido desenvolvidas e usadas na reprodução humana assistida. Na criopreservação, seu uso resultou em maiores taxa de gestação e de nascimentos nos casos de azoospermias obstrutivas ou não obstrutivas, mais do que o uso de sêmen fresco para esse tipo de paciente. Com relação à motilidade espermática, somente o congelamento repetitivo diminui essa característica. Já a fragmentação de DNA aumenta significativamente após a criopreservação. Em se tratando de morfologia, a metodologia parece não ocasionar mudanças significativas na cabeça, na peça intermediária e no acrossomo; apenas anormalidades na cauda do espermatozoide. Com relação à taxa de nascimentos e de aborto, a criopreservação não interfere significativamente quando comparados sêmen fresco com congelado. Tais dados levam a inferir que a criopreservação, apesar de influenciar negativamente alguns parâmetros seminais, é uma ótima metodologia para a prolongação da fertilidade.

## Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## REFERÊNCIAS

1. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*. 1978;2(8085):366.
2. Van den Boogaard NM. Reproduction in the year 2012: in vivo or in vitro? *Ned Tijdschr Geneesk*. 2012;156(36):A4438.
3. Cipriano VTF, Mioranza A, Freitas GC, Lobo RB. Evaluation of seminal parameters in the indication of in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection in the treatment of the male factor fertility problem. *Reprod Clim*. 2010;25(3): 104-9.
4. Mahadevan MM, Trounson AO, Leeton JF. The relationship of tubal blockage, infertility of unknown cause, suspected male infertility, and endometriosis to success of *in vitro* fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril*. 1983;40(6):755-62.
5. Guérin JF. Testicular tissue cryoconservation for prepubertal boy: indications and feasibility. *Gynecol Obstet Fertil*. 2005;33(10):804-8.
6. Anger JT, Gilbert BR, Goldstein M. Cryopreservation of sperm: indications, methods and results. *J Urol*. 2003;170 4 Pt 1:1079-84.
7. Tournaye H, Devroey P, Camus M, Valkenburg M, Bollen N. Van Steirteghem AC Zygote intrafallopian transfer or *in vitro* k

- fertilization and embryo transfer for the treatment of male-factor infertility: a prospective randomized trial. *Fertil Steril.* 1992;58(2):344–50.
8. Walters EM. The history of sperm cryopreservation. In: Pacey AA, Tomlinson MJ, editors. *Sperm banking; theory and practice.* Cambridge: Cambridge University Press; 2009.
  9. Zhmakin A. *Fundamentals of Cryobiology.* Berlin Heidelberg: Springer; 2009.
  10. Hossaim A, Nagaman M. Cryopreservation of male gametes. In: *Book infertility and assisted reproduction.* Cambridge: Cambridge University Press; 2008.
  11. Dohle GR, Dohle A, Jungwirth G, Colpi A, Giwercman T, Diemer TB, et al. *Guidelines on male infertility.* European Association of Urology; 2008.
  12. Esteves SC, Miyaoka R, Agarwal A. Sperm retrieval techniques for assisted reproduction. *International braz j urol.* 2011;37(5):570–83.
  13. Sherman JK. Low temperature research on spermatozoa and eggs. *Cryobiology.* 1964;1(2):103–29.
  14. Anderson RA. Fertility preservation techniques: laboratory and clinical progress and current issues. *Reproduction.* 2008;136(6):667–9.
  15. Centola GM, Raubertas RF, Mattox JH. Cryopreservation of human semen Comparison of cryopreservatives, sources of variability, and prediction of post-thaw survival. *J Androl.* 1992;13(3):283–8.
  16. Esteves SC, Sharma RK, Thomas-Jr AJ, Agarwal A. Evaluation of acrosomal status and sperm viability in fresh and cryopreserved specimens by the use of fluorescent peanut agglutinin lectin in conjunction with hypo-osmotic swelling test. *International Braz J Urol.* 2007;33(3):364–74.
  17. Cross NL, Hanks SE. Effects of cryopreservation on human sperm acrosomes. *Hum Reprod.* 1991;6(9):1279–83.
  18. De Paula TS, Bertolla RP, Spaine DM, Cunha MA, Schor N, Cedenho AP. Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia. *Fertil Steril.* 2006;86(3):597–600.
  19. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Veeck LL, et al. New method of evaluating sperm morphology with predictive value for human *in vitro* fertilization. *Urology.* 1987;30(3):248–51.
  20. Kalsi J, Thum MY, Muneer A, Pryor J, Abdullah H, Minhas S. Analysis of the outcome of intracytoplasmic sperm injection using fresh or frozen sperm. *BJU Int.* 2011;107(7):1124–8.
  21. Dong Q, Hill D. Van de Voort CA Interactions among pre-cooling, cryoprotectant, cooling, and thawing for sperm cryopreservation in rhesus monkeys. *Cryobiology.* 2009;59(3):268–74.
  22. Thomson LK, Fleming SD, Barone K, Zieschang JA, Clark AM. The effect of repeated freezing and thawing on human sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril.* 2010;93(4):1147–56.
  23. Leibo SP, Kubisch HM, Schramm RD, Harrison RM, VandeVoort CA. Male-to-male differences in post-thaw motility of rhesus spermatozoa after cryopreservation of replicate ejaculates. *J Med Primatol.* 2007;36(3):151–63.
  24. Isachenko V, Isachenko E, Petrunkina AM, Sanchez R. Human spermatozoa vitrified in the absence of permeable cryoprotectants: birth of two healthy babies. *Reprod Fertil Dev.* 2012;24(2):323–6.
  25. Ozkavukcu S, Erdemli E, Isik A, Oztuna D, Karahuseyinoglu S. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet.* 2008;25(8):403–11.
  26. Peng QP, Cao SF, Lyu QF, Xue SG, Jin W, Liu XY, et al. A novel method for cryopreservation of individual human spermatozoa. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2011;47(8):565–72.
  27. Hagenas I, Jorgensen N, Rechnitzer C, Sommer P, Holm M, Schmiegelow K, et al. Clinical and biochemical correlates of successful semen collection for cryopreservation from 12-18 year old patients: a single center study of 86 adolescents. *Human Reprod.* 2010;25(8):2031–8.
  28. Suarez SS. Interactions of spermatozoa with the female reproductive tract: inspiration for assisted reproduction. *Reprod Fertil Dev.* 2007;19(1):103–10.
  29. Morrell JM, Rodrigues-Martinez H. Practical applications of sperm selection techniques as a tool for improving reproductive efficiency. *Vet Med Int.* 2011, <http://dx.doi.org/10.4061/2011/894767>.
  30. Kuczynski W, Dhont M, Grygoruk C, Grochowski D, Wolczynski S, Szamatowicz M. The outcome of intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved ejaculated spermatozoa – A prospective randomized study. *Hum Reprod.* 2001;16(10):2109–13.



ELSEVIER

## Reprodução & Climatério

<http://www.sbrh.org.br/revista>


### Artigo de revisão

# Histerectomia total e subtotal: há diferença quanto ao impacto na sexualidade?



Lucian Pereira de Sousa<sup>a</sup>, Marcelo José Gonçalves<sup>a</sup>, Fabiene Valle<sup>a</sup> e Selmo Geber<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

<sup>b</sup> Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

#### INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 23 de abril de 2014

Aceito em 11 de maio de 2014

On-line em 25 de junho de 2014

Palavras-chave:

Histerectomia

Sexualidade

Efeitos adversos

#### R E S U M O

**Introdução:** a histerectomia é o procedimento cirúrgico ginecológico mais feito. A via de acesso depende de circunstâncias clínicas da paciente e conhecimento técnico do cirurgião. A preservação do colo uterino ainda é motivo de discussão, principalmente pelas possíveis consequências associadas à sua remoção. Uma das mais questionadas, e ainda sem consenso, é a interferência na sexualidade.

**Objetivo:** revisar a literatura para avaliar se existe ou não diferença com relação à sexualidade nas mulheres submetidas à histerectomia total ou subtotal.

**Método:** usamos os termos "total hysterectomy and subtotal hysterectomy" em base de dados do Pubmed, o que resultou em 250 artigos. Desses, 34 comparavam variáveis relacionadas ao tipo de histerectomia e dez abordavam a questão da sexualidade juntamente com variáveis de interesse para o artigo.

**Resultados:** um estudo descreveu uma diferença quanto à sexualidade entre os dois tipos de cirurgia, com uma mudança significativamente mais positiva na frequência de orgasmo e prazer sexual nas mulheres submetidas à histerectomia subtotal. Em seis estudos os autores não observaram diferença entre os dois tipos de cirurgia. Outro estudo apresentou resultados de pioria do prazer sexual, porém de forma semelhante nos dois tipos de cirurgia.

**Conclusão:** apesar de não haver ainda um consenso sobre os efeitos da histerectomia total sobre a sexualidade, parece não haver diferença entre os dois tipos de procedimento. Assim, a decisão deve ser tomada de forma individualizada e respeitadas a indicação, as condições clínicas de cada paciente e a experiência do cirurgião.

© 2014 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Publicado por Elsevier Editora Ltda.

Todos os direitos reservados.

### Total and subtotal hysterectomy: is there a difference as to the impact on sexuality?

#### A B S T R A C T

**Introduction:** hysterectomy is the most commonly performed gynecological surgical procedure. The preservation of the cervix is still under discussion, especially the possible

Keywords:

Hysterectomy

\* Autor para correspondência.

E-mail: [selmogeber@origen.com.br](mailto:selmogeber@origen.com.br) (S. Geber).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.recli.2014.05.001>

1413-2087/© 2014 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

Sexuality  
Adverse effects

consequences associated with their removal. One of the most questioned, and yet no consensus is interference in sexuality.

*Objective:* the aim of the study was to review the literature to assess whether there is difference with regard to sexuality, in women undergoing total or subtotal hysterectomy.

*Method:* an electronic search was performed with Pubmed database. We used the terms total hysterectomy and subtotal hysterectomy and our search retrieved 250 articles. Among these, 34 compared the type of hysterectomy and 10 addressed the issue of sexuality associated to relevant variants of interest to the article.

*Results:* among the original articles, only 10 addressed the issue of sexuality, along with other variables or as a central theme of the article. Only one study reported a difference in sexuality between the two types of surgery, with a significant positive change in frequency of orgasm and sexual pleasure in women undergoing subtotal hysterectomy. In six studies, the authors found no difference between the two types of surgery.

*Conclusion:* only one of the studies presented results from impair sexuality, but were similar in the two types of surgery. Although there is still no consensus on the effects of hysterectomy on sexuality, there seems to be no difference between the two types of procedure. Thus, the decision must be taken individually, respecting the indications, the clinical conditions of each patient and surgeon experience.

© 2014 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

## Introdução

A histerectomia é o procedimento cirúrgico ginecológico mais feito. Em 2010, mais de 430.000 internações ocorreram nos Estados Unidos.<sup>1</sup> De 1998 a 2010, a distribuição da abordagem cirúrgica foi: abdominal (65%), vaginal (20%), por via laparoscópica convencional (13%), robótica (0,9%) e radical (1,2%). As taxas de histerectomia parecem estar diminuindo, com um pico em 2002 de mais de 680 mil procedimentos, possivelmente por causa do advento de terapias menos invasivas para a gestão das condições previamente tratadas com histerectomia.<sup>1</sup>

No Brasil, a taxa bruta de histerectomia para cada 100 mil mulheres com 20 anos ou mais vem oscilando, mas em uma tendência crescente: 125,6 (1998); 133,8 (1999); 128,6 (2000); 131,9 (2001); 126,5 (2002); 130,5 (2003); 132,5 (2004); 135,9 (2005); 140,3 (2006); 133,2 (2007); 139,4 (2009); 143,0 (2010).<sup>2</sup>

A indicação da histerectomia, os riscos e benefícios do procedimento, as opções e as expectativas do resultado devem ser discutidos com a paciente com detalhes. Uma vez que uma série de indicações para histerectomia é baseada mais em opinião do que em evidências de estudos bem desenhados, o consentimento informado com a exploração completa das preferências da paciente e suas expectativas é particularmente importante.<sup>3</sup>

Uma vez que a decisão foi tomada, o médico e a paciente devem decidir se o procedimento será feito por via abdominal, vaginal ou com assistência laparoscópica ou robótica. A abordagem cirúrgica ideal é incerta, pois há poucos dados de grandes estudos randomizados e bem concebidos para basear uma recomendação. A via de acesso escolhida depende de circunstâncias clínicas da paciente e conhecimento técnico do cirurgião, além de a experiência pessoal do cirurgião desempenhar um papel importante. As principais indicações para a feitura da histerectomia são: leiomiomas uterinos; prolapso de

órgãos pélvicos; dor ou infecção pélvica; sangramento uterino anormal e doenças malignas e pré-malignas.<sup>3</sup>

Uma questão muitas vezes discutida com relação à histerectomia se refere às eventuais vantagens e desvantagens de se fazer esse procedimento de forma total (com retirada de todo o útero) ou subtotal (com preservação do colo uterino-supracervical), em curto e longo prazo. São bastante pesquisadas algumas variáveis, como incontinência urinária; prolapso de órgãos pélvicos; constipação intestinal; sangramento perioperatório; qualidade de vida; imagem corporal e sexualidade.

A única contraindicação absoluta para histerectomia subtotal é a presença de uma condição maligna ou pré-maligna do corpo ou do colo do útero. Endometriose extensa é uma contraindicação relativa, porque essas mulheres podem ter persistência de dispareunia se o colo do útero é mantido.

A maioria das pacientes submetidas à histerectomia por causa de patologias benignas sofre com significativos problemas sexuais, como dispareunia, dor pélvica crônica e alterações emocionais.<sup>4,5</sup> A interferência do tipo de histerectomia no alívio desses problemas sexuais tem sido controversa.<sup>6</sup> Nos casos em que a histerectomia é considerada o melhor tratamento, não existe consenso se histerectomia subtotal teria vantagem na sexualidade sobre a histerectomia total.<sup>7,8</sup> Neste artigo, discutimos se há ou não diferença com relação à sexualidade nas mulheres submetidas à histerectomia total ou subtotal.

## Método

Para a confecção deste artigo de revisão usamos os termos “total hysterectomy and subtotal hysterectomy” no site de pesquisa [www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov). Encontramos inicialmente 250 artigos. Desses, 34 comparavam algumas variáveis relacionadas ao tipo de histerectomia, total ou subtotal. Dos artigos

originais, apenas dez abordavam a questão da sexualidade no seu estudo, juntamente com outras variáveis ou como tema central do artigo.

## Resultados

Encontramos basicamente dois tipos de abordagem da sexualidade com relação ao tipo de histerectomia total ou subtotal: estudos que discutiam os efeitos do procedimento com relação a algumas variáveis, dentre elas a sexualidade; e os que analisaram apenas a sexualidade como variável.

Asfani et al. (2010) fizeram um estudo clínico randomizado que comparou algumas complicações clínicas e a função sexual após a histerectomia total e subtotal. Foram acompanhadas 150 mulheres (50 alocadas para histerectomia subtotal e 100 para histerectomia total) até seis meses de pós-operatório. O tempo de internação foi de 4,40 dias (DP  $\pm$  1,90) após histerectomia subtotal e 4,48 dias (DP  $\pm$  1,67) após histerectomia total. Os níveis de hemoglobina sérica, a presença de febre pós-operatória, os sintomas da dispareunia e a frequência de relações sexuais não foram significativamente diferentes entre os dois grupos. A histerectomia subtotal não mostrou benefícios significativos sobre a histerectomia total.<sup>9</sup>

Thakar et al. (2008) acompanharam entre sete e 11 anos (média de nove) de seguimento 279 mulheres que participaram de estudo duplo-cego randomizado e multicêntrico, publicado anteriormente, que comparou histerectomia total e histerectomia subtotal. Elas foram convidadas a preencher questionários usados no estudo anterior para avaliar a qualidade de vida e a função dos órgãos pélvicos. Completaram o estudo 65% das mulheres (90 histerectomia total e 91 histerectomia subtotal). Foram encontradas reduções significativas em parâmetros da função sexual. Contudo, em ambos os grupos de forma semelhante. Os autores concluíram que a deterioração da função sexual foi, provavelmente, causada pelo climatério.<sup>10</sup>

Gorlero et al. (2008) investigaram o impacto da histerectomia subtotal e total na satisfação das mulheres, avaliadas com questionário sobre a atividade sexual, a imagem corporal e o estado de saúde. Foi feito estudo prospectivo, randomizado, no período de três anos. Foram inscritas 105 mulheres, que completaram o questionário duas semanas antes e um ano após a cirurgia. Tanto a histerectomia total quanto a subtotal resultaram em melhorias na satisfação sexual das mulheres (um ano após a cirurgia), mas não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos.<sup>11</sup>

Hoffmann et al. (2006) abordaram todas as pacientes que sofreram histerectomia abdominal por indicações benignas de 2001 a 2003 e identificaram 120 (60 histerectomia abdominal total, 60 subtotal). Cada paciente e parceiro receberam um questionário postal que abordava a sexualidade em conexão com a operação. Dos 240 questionários, 111 foram devolvidos. Entre os parceiros das mulheres que sofreram histerectomia total, foi maior o número que identificou, durante a relação sexual, que o útero tinha sido removido (12%), em comparação com parceiros de mulheres que sofreram uma histerectomia subtotal (4%). Isso não foi significativo e todos esses parceiros avaliaram como positivo.<sup>12</sup>

A satisfação sexual melhorou ou ficou inalterada para a maioria das mulheres e de seus parceiros, independentemente do tipo de operação. Os parceiros que relataram insatisfação antes da cirurgia eram significativamente mais propensos a relatar satisfação pobre após a operação. Uma elevada percentagem dos parceiros de ambos os grupos de histerectomia não discutiu sexualidade em relação à cirurgia, antes ou após a operação (subtotal: 44%, total: 24%; não significativo). Os autores concluíram que a maioria das mulheres e de seus parceiros não relatou impacto negativo sobre a satisfação sexual após a histerectomia abdominal, independentemente de se subtotal ou total. O único preditor da experiência sexual negativa dos parceiros após histerectomia foi a experiência sexual negativa antes de histerectomia.<sup>12</sup>

Flory et al. (2006) investigaram os efeitos psicossociais da histerectomia ao examinar os resultados sexuais, de dor e psicológicos de histerectomia total versus subtotal em um ensaio clínico controlado e randomizado, com o uso de entrevistas semiestruturadas, questionários padronizados e exames ginecológicos. As pacientes que sofriam de doenças ginecológicas benignas foram aleatoriamente designadas para um dos dois grupos: histerectomia total vaginal assistida por via laparoscópica (n = 32) ou histerectomia subtotal laparoscópica supracervical (n = 31).<sup>13</sup>

Ambos os grupos foram constituídos por mulheres na pré-menopausa e submetidas à histerectomia sem ooforectomia. Dois grupos controle de mulheres na pré-menopausa também foram testados: cirurgia ginecológica menor (n = 30) e os controles não cirúrgicos saudáveis (n = 40). Todos os grupos cirúrgicos foram avaliados duas a três semanas antes da cirurgia e seis a sete meses após. O grupo controle não cirúrgico foi avaliado no momento do recrutamento e seis a sete meses depois. Para o grupo de histerectomia total, o desejo sexual, a excitação e o comportamento sexual melhoraram significativamente no pós-operatório. Para o grupo de histerectomia subtotal, o comportamento sexual e o funcionamento sexual global melhoraram significativamente. Os autores concluíram que a histerectomia resultou em alguma melhoria na função sexual, porém sem diferença em relação ao tipo de abordagem, total ou subtotal.<sup>13</sup>

Wydra et al. (2004) interrogaram 539 mulheres de 1990 a 2000 após a histerectomia total e 65 após a supracervical. Os autores avaliaram os sintomas, as vantagens e as desvantagens após histerectomia. Não houve diferença estatística entre os grupos quanto a desejo sexual, dispareunia, frequência de relação sexual, orgasmo e secreção vaginal após a operação.<sup>14</sup>

Roovers et al. (2003) compararam os efeitos da histerectomia vaginal, histerectomia abdominal subtotal e histerectomia total abdominal no bem-estar sexual, por meio de estudo observacional e prospectivo, ao longo de seis meses. Participaram 413 mulheres que se submeteram a histerectomia por doença benigna que não prolapso sintomático do útero e da endometriose. O prazer sexual melhorou significativamente em todas as pacientes, independentemente do tipo de histerectomia. A prevalência de um ou mais problemas sexuais incômodos seis meses após histerectomia vaginal, histerectomia abdominal subtotal e histerectomia abdominal total foi de 43%, 41% e 39%, respectivamente (p = 0,88). A persistência e o desenvolvimento de problemas incômodos

durante a atividade sexual foram semelhantes para as três técnicas.<sup>15</sup>

Nenhum dos estudos acima descreveu diferenças na sexualidade para um dos tipos de histerectomia. Contudo, Ellström et al. (2010) fizeram ensaio clínico randomizado e prospectivo com 132 pacientes na pré-menopausa agendadas para histerectomia sem ooforectomia, planejada para doenças benignas e sem histórico de displasia cervical ou prolapso sintomático, randomizadas para histerectomia total (n = 66) ou subtotal (n = 66). O Questionário Feminino de Sexualidade McCoy foi usado para avaliar as mudanças na saúde sexual. Diferenças nos resultados antes e um ano após a histerectomia foram calculadas para cada indivíduo e as mudanças comparadas entre os grupos. As mulheres submetidas à histerectomia subtotal relataram mudança significativamente mais positiva na frequência de orgasmo e prazer sexual, em comparação com aquelas submetidas à histerectomia total.<sup>16</sup>

---

## Discussão

Os estudos incluídos nesta revisão compararam dois tipos de histerectomia, total e subtotal, com relação a alguns desfechos, como febre pós-operatória, dispareunia, secura vaginal, satisfação pessoal, imagem corporal e sexualidade. Em alguns deles, mais de uma variável foi analisada em conjunto, enquanto que em outros apenas a sexualidade foi avaliada. O número de estudos que compararam o tipo de histerectomia com enfoque nos efeitos na sexualidade ainda é limitado, especialmente aqueles prospectivos e randomizados.

As mulheres a serem submetidas à histerectomia podem apresentar comprometimento na sexualidade, reprodução e função sexual. Para elas, a histerectomia poderia ser o evento que, de fato, encerraria o período reprodutivo com grandes comprometimentos na sua sexualidade. Apesar de elas se sentirem aliviadas com a possibilidade do desaparecimento dos sintomas incômodos da doença, apresentam mitos e crenças com a retirada do útero, relacionados à sua identidade social e de gênero, à falta de conhecimento de seu corpo, dos órgãos e suas respectivas funções.<sup>17</sup>

É geralmente aceito que, durante a histerectomia, a manutenção do colo uterino permite um procedimento mais ágil e rápido do que a histerectomia total. Se a cérvix é mantida, o cirurgião necessita apenas ligar os ramos ascendentes dos vasos uterinos e conseqüentemente evitará a dissecação do tecido vascularizado paravaginal e próximo dos ureteres. A histerectomia subtotal também é associada a um menor índice de complicações, como os sangramentos da artéria uterina e dos ângulos vaginais, além de ser opção economicamente vantajosa, com custos similares à histerectomia total, mas com diminuição do tempo de recuperação pós-operatória e conseqüente menor tempo de internação hospitalar. Há ainda os ganhos ditos intangíveis, como o rápido retorno às atividades diárias e ao ritmo normal de trabalho.

Com relação à sexualidade, ainda não existe um consenso sobre a possível piora da qualidade da função sexual após a remoção da cérvix uterina com conseqüente ligadura dos ligamentos uterossacros e cardinais. Um estudo de Butler-Manuel et al. (2000) forneceu a base morfológica para essa preocupação. Os autores acharam, nesses ligamentos, uma

grande quantidade de fibras nervosas autônomas nos terços médio e lateral, no sítio em que eles entram posteriormente na cérvix, sendo que eles são deixados intactos na abordagem subtotal.<sup>18</sup> Contudo, estudos recentes, como os que usamos como base para este trabalho, não mostraram diferenças na satisfação sexual das pacientes submetidas tanto a um quanto ao outro tipo de histerectomia.

Somente um estudo de Ellström et al. (2010) observou diferença quanto à sexualidade entre os dois grupos. Houve uma mudança significativamente mais positiva na frequência de orgasmo e prazer sexual nas mulheres submetidas à histerectomia subtotal. Nos demais grupos, não houve impacto do tipo de cirurgia sobre a sexualidade.<sup>16</sup> Em três estudos, Gorlero et al. (2008), Flory et al. (2006) e Roovers et al. (2003) observaram melhoria do prazer sexual das mulheres em relação ao descrito antes da cirurgia. Esses resultados, entretanto, não apresentaram diferença estatisticamente significativa.<sup>11,13,15</sup>

Em outros três estudos, Asfani et al. (2010), Hoffmann et al. (2006) e Wydra et al. (2004) constataram que a função sexual não sofreu alteração após a cirurgia e não houve diferença entre os grupos.<sup>9,12,14</sup> Somente o estudo de Thakar et al. (2008) apresentou resultados de piora do prazer sexual, porém sem diferenças entre os grupos analisados.<sup>10</sup>

O mais importante é que a decisão de fazer a histerectomia total ou a subtotal deve ser individualizada, como qualquer outro procedimento médico. Não é admissível que se adote uma questão fechada a respeito. Lesões cervicais ou endometriais malignas não deixam dúvidas quanto ao procedimento a ser escolhido. Todavia, em relação às lesões benignas, trata-se de um intrincado quebra-cabeça, no qual vantagens e desvantagens deverão ser avaliadas durante o ato cirúrgico, pois ambos os procedimentos tendem a ter resultados iguais no seu seguimento. Contudo, todas as pacientes candidatas à histerectomia subtotal, laparoscópica ou não, devem ser orientadas quanto às possibilidades de sangramento vaginal cíclico residual, displasia cervical e da rara da necessidade de traquelectomia do coto remanescente.

Talvez a maior contribuição dos dados da literatura atual seja retirar da histerectomia subtotal o estigma de procedimento inadequado, destinado aos cirurgiões inexperientes. Trata-se de procedimento tão eficiente quanto a histerectomia total para a maior parte das condições ginecológicas benignas e pode ser recomendado e discutido com as pacientes. Constitui um tratamento preferível naqueles casos nos quais as condições operatórias ou clínicas não sejam favoráveis.

---

## Conclusão

Podemos concluir que, apesar de não haver ainda um consenso sobre os efeitos da histerectomia total sobre a sexualidade, parece não haver diferença entre os dois tipos de procedimento. Assim, a decisão deve ser feita de forma individualizada, respeitadas a indicação, as condições clínicas de cada paciente e a experiência do cirurgião.

---

## Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## REFERÊNCIAS

1. Wright JD, Herzog TJ, Tsui J, Ananth CV, Lewin SN, Lu YS, et al. Nationwide trends in the performance of inpatient hysterectomy in the United States. *Obstet Gynecol.* 2013;122(2Pt1):233-41.
2. Ministério da Saúde. Proadess [homepage na internet]. Taxa de internação para histerectomia em mulheres com 20 anos ou mais [acesso 16 fev 2014]. Disponível em: <http://www.proadess.icict.fiocruz.br/index.php?pag=fic&cod=G01&tab=1>
3. Broder MS, Kanouse DE, Mittman BS, Bernstein SJ. The appropriateness of recommendations for hysterectomy. *Obstet Gynecol.* 2000;95(2):199-205.
4. Steege JF. Indications for hysterectomy: have they changed? *Clin Obstet Gynecol.* 1997;40(4):878-85.
5. Katz A. Sexuality after hysterectomy: a review of the literature and discussion of nurses' role. *J Adv Nurs.* 2003;42(3):297-303.
6. Gutl P, Greimel ER, Roth R, Winter R. Women's sexual behavior, body image, and satisfaction with surgical outcomes after hysterectomy: a comparison of vaginal and abdominal surgery. *J Psychosom Obstet Gynaecol.* 2002;23(1):51-9.
7. Helstrom L, Lundberg PO, Sorbom D, Backstrom T. Sexuality after hysterectomy: a factor analysis of women's sexual lives before and after subtotal hysterectomy. *Obstet Gynecol.* 1993;81(3):357-62.
8. Virtanen H, Makinen J, Tenho T, Kiilholma P, Pitkanen Y, Hirvonen T. Effects of abdominal hysterectomy on urinary and sexual symptoms. *Br J Urol.* 1993;72(6):868-72.
9. Asnafi N, Basirat Z, Hajian-Tilaki KO. Outcomes of total versus subtotal abdominal hysterectomy. *East Mediterr Health J.* 2010;16(2):176-9.
10. Thakar R, Ayers S, Srivastava R, Manyonda I. Removing the cervix at hysterectomy: an unnecessary intervention? *Obstet Gynecol.* 2008;112(6):1262-9.
11. Gorlero F, Lijoi D, Biamonti M, Lorenzi P, Pullè A, Dellacasa I, et al. Hysterectomy and women satisfaction: total versus subtotal technique. *Arch Gynecol Obstet.* 2008;278(5):405-10.
12. Hoffmann LRA, Schei B, Eriksson NH. Sexual experience of partners after hysterectomy, comparing subtotal with total abdominal hysterectomy. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2006;85(11):1389-94.
13. Flory N, Bissonnette, Amsel RT, Binik YM. The psychosocial outcomes of total and subtotal hysterectomy: a randomized controlled trial. *J Sex Med.* 2006;3(3):483-91.
14. Wydra D, Ciach K, Sawicki S, Wilhelm J, Emerich J. Comparison of sexual behavior after total or subtotal hysterectomy. *Ginekol Pol.* 2004;75(4):274-80.
15. Roovers JP, van der Bom JG, van der Vaart CH, Heintz AP. Hysterectomy and sexual wellbeing: prospective observational study of vaginal hysterectomy, subtotal abdominal hysterectomy, and total abdominal hysterectomy. *BMJ.* 2003;327(7418):774-8.
16. Ellström EMA, Jerhamre K, Junsog K. A randomized trial comparing changes in sexual health and psychological well-being after subtotal and total hysterectomies. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2010;89(1):65-70.
17. Sbroggio AMR, Osis MJMD, Bedone AJ. O significado da retirada do útero para as mulheres: um estudo qualitativo. *Rev Assoc Med Bras.* 2005;51(5):270-4.
18. Butler-Manuel SA, BATTERY LD, A'Hern RP, Polak JM, Barton DP. Pelvic nerve plexus trauma at radical hysterectomy and simple hysterectomy: the nerve content of the uterine supporting ligaments. *Cancer.* 2000;89(4):834-41.



ELSEVIER

## Reprodução & Climatério

<http://www.sbrh.org.br/revista>


### Artigo de revisão

## Biópsia embrionária: qual a melhor escolha?☆



Aleister Crowley de Aquino<sup>a,\*</sup>, Ana Carolina Nogueira Martinhago<sup>b</sup>  
e Ciro Dresch Martinhago<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Complexo Médico Penal, Pinhais, Paraná, PR, Brasil

<sup>b</sup> Chromosome Medicina Genômica, São Paulo, SP, Brasil

#### INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

##### Histórico do artigo:

Recebido em 4 de março de 2014

Aceito em 15 de junho de 2014

On-line em 7 de julho de 2014

##### Palavras-chave:

Biópsia

Blastocisto

Fase de clivagem do zigoto

Óvulo

Técnicas reprodutivas

#### R E S U M O

**Introdução:** a biópsia embrionária tem como objetivo selecionar embriões geneticamente normais. Essa seleção ocorre por meio de testes genéticos pré-implantacionais. Espera-se, com isso, uma diminuição dos riscos de doenças genéticas e um aumento das taxas de implantação em fertilização *in vitro*.

**Objetivo:** verificar, por meio de revisão bibliográfica, qual técnica de biópsia embrionária é considerada mais apropriada para feitura de testes genéticos pré-implantacionais.

**Método:** pesquisa bibliográfica, na forma de revisão de publicações científicas, por meio das redes US National Library of Medicine (Pubmed), Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (Lilacs), Google Acadêmico e Biblioteca Virtual em Saúde (BVS).

**Resultados e conclusão:** existem três maneiras de efetuar a biópsia para reprodução humana assistida. A primeira consiste em retirar o primeiro e/ou o segundo corpúsculo polar estruído pelo oócito. Também se pode fazer a biópsia a partir de um blastômero do embrião em estágio de clivagem ou usar cinco a dez células do trofoectoderma de blastocisto. Normalmente as técnicas usadas para o diagnóstico são PCR, Fish, CGH array e SNP array, entre outras. Acredita-se que a biópsia de blastocistos é a melhor técnica para manter o potencial de implantação embrionária. Essa tendência se justifica por causa da maior quantidade de material genético disponível em fase avançada de desenvolvimento embrionário. Admite-se que nessa fase a incidência de mosaïcismo seja menor em relação à biópsia de blastômeros, com conseqüente aumento na eficácia dos testes genéticos. Outra questão importante é que na biópsia de blastocistos as células são retiradas do trofoectoderma, enquanto que na biópsia em estágio de clivagem a remoção de um blastômero pode prejudicar o desenvolvimento embrionário.

© 2014 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Publicado por Elsevier Editora Ltda.

Todos os direitos reservados.

☆ Trabalho desenvolvido no Instituto de Educação e Pesquisa Sapientiae, São Paulo, SP, Brasil.

\* Autor para correspondência.

E-mail: [aleister.aquino@gmail.com](mailto:aleister.aquino@gmail.com) (A.C. de Aquino).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.recli.2014.06.001>

1413-2087/© 2014 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

## Embryo biopsy: what is the best choice?

### A B S T R A C T

#### Keywords:

Biopsy  
Blastocyst  
Ovum cleavage stage  
Ovum  
Reproductive techniques

**Introduction:** the embryo biopsy aims to select genetically normal embryos. This selection occurs through pre-implantation genetic testing. It is expected the reduction of risk of genetic disorders and increase implantation rates in IVF.

**Objective:** to verify, through bibliographical revision, which embryo biopsy technique is considered more suitable for pre-implantation genetic diagnosis.

**Method:** bibliographical research, in the form of literary review of scientific publications via networks, US National Library of Medicine (Pubmed), Latin-American Literature and Caribbean Health Sciences (Lilacs), Google Scholar and Virtual Health Library.

**Results and conclusion:** there are three ways to perform the biopsy on assisted human reproduction. The first one consists in removing the 1st and/or 2nd polar body (if there was fertilization). You can also perform the biopsy from the one blastomere of embryo cleavage stage or use 5-10 trophoctoderm cells blastocyst. Usually the techniques used for diagnostic purpose are PCR, Fish, CGH array, SNP array and others. Nowadays it is believed that blastocyst biopsy is the best technique in order to maintain the embryonic implantation. This tendency is justified by the larger amount of genetic material available in an advanced stage of embryonic development. It is assumed that in this stage the incidence of mosaicism is reduced with the consequent increase in the effectiveness of genetic testing. Another important question is that the blastocyst biopsy cells are removed from the trophoctoderm while inbiopsy incleavage stage, the removal of oneblastomerecan impairembryonic development.

© 2014 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Published by Elsevier Editora Ltda.

All rights reserved.

## Introdução

As técnicas de biópsia usadas em fertilização *in vitro* (FIV) visam a obter material para a feitura de testes genéticos pré-implantacionais. Para tanto, podem ser usados oócitos ou embriões humanos, os quais terão sua composição genética avaliada a fim de escolher um embrião ou oócito cromossomicamente normal.<sup>1</sup>

Em 1990, foi aplicado pela primeira vez em seres humanos, com sucesso, o diagnóstico genético pré-implantacional (PGD) para doença relacionada ao cromossomo X.<sup>2</sup> Desde então, essa técnica passou a ser usada para análise do conteúdo genético em embriões humanos obtidos por meio de FIV para selecionar aqueles que tivessem um melhor potencial para gerar uma prole saudável.<sup>3</sup>

O PGD é uma avaliação para selecionar embriões geneticamente normais de pais afetados. Já o screening genético pré-implantacional (PGS) é um teste de triagem para aneuploidias usado em embriões cujos pais têm cariótipos normais.<sup>1</sup> Seu principal objetivo é selecionar embriões cromossomicamente normais para transferência e, com isso, melhorar as taxas de implantação e gravidez clínica e reduzir taxas de abortos e evitar gestações aneuploides.<sup>4</sup>

A biópsia para testes genéticos pré-implantacionais pode ocorrer de três maneiras. A primeira acontece por meio da remoção do primeiro corpúsculo polar (CP) ou após a fertilização, com o uso do segundo CP ou ambos. A segunda é a partir da biópsia de um blastômero no estágio de clivagem. A terceira ocorre pela retirada de células do trofoectoderma (TE) de blastocistos no quinto dia de desenvolvimento. Assim,

conforme a biópsia de escolha haverá alteração do material biológico a ser usado para extração de DNA.<sup>5-8</sup>

Os blastômeros do terceiro dia de desenvolvimento de embriões humanos obtidos por meio de FIV são considerados células totipotentes, cada uma com potencial para se transformar em um novo embrião. Já no quarto dia de desenvolvimento, as células mais externas do embrião darão origem ao TE, enquanto que os blastômeros internos vão se diferenciar na massa celular interna (MCI), que são células consideradas pluripotentes.<sup>9</sup>

Para efetuar os procedimentos de biópsias é necessário o rompimento da zona pelúcida (ZP) do oócito ou embrião. Normalmente, usa-se um *laser* para causar esse enfraquecimento e, logo após, ocorre extração mecânica das células.<sup>1</sup> O diâmetro do pulso de *laser* parece não interferir no desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto<sup>10</sup> e, pela sua praticidade, ele é cada vez mais usado em todas as fases de biópsias embrionárias para testes genéticos pré-implantacionais.<sup>7</sup> Também pode ser usada a solução ácida de Tyrode ou feita mecanicamente a abertura da ZP.<sup>11</sup> Não foram verificadas diferenças nas taxas de gravidez com o uso do *laser* ou da solução ácida de Tyrode.<sup>12</sup>

A técnica de PGD é feita por meio de hibridização fluorescente *in situ* (Fish), que analisa entre cinco a dez cromossomos de uma célula biopsiada do embrião em estágio de clivagem.<sup>13</sup> É a técnica usada em 90% de todos os ciclos de PGD relatados.<sup>14</sup> Entretanto, são inegáveis as dificuldades operacionais de se fazer Fish além das limitadas informações que se conseguem por esse meio.<sup>5,13,15</sup> Para uma análise genética mais ampla, tem-se a hibridização genômica comparativa de arranjo (CGH array). Ela permite a análise dos 22 cromossomos autossomos

além dos dois sexuais e admite um melhor resultado em relação à Fish.<sup>5,13,15,16</sup>

O arranjo polimórfico de nucleotídeo único (SNP array) também é usado em testes genéticos pré-implantacionais e demonstra ser mais eficiente do que o CGH array.<sup>17-19</sup> Outro método opcional de análise cromossômica é a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real, multiplex (Real Time qPCR Multiplex). Essa tecnologia tem a vantagem de obtenção dos resultados em até quatro horas, o que possibilita a feita da biópsia de TE e a transferência no mesmo ciclo. A desvantagem é que não é possível fazer análises com apenas uma célula.<sup>20</sup>

A avaliação morfológica oocitária, muito usada como forma de escolher o melhor oócito a ser fertilizado, acaba por rejeitar aqueles com imaturidade nuclear, degenerações significativas ou anormalidades grosseiras e, assim, insemina a maioria dos oócitos em metáfase II (MII), apenas com base em seu aspecto morfológico.<sup>21</sup> Após a fertilização, a morfologia também contribui muito na escolha do embrião a ser transferido e melhora consideravelmente as taxas de implantação. Entretanto, não deve ser usada como único meio de seleção, pois mais de 70% dos embriões oriundos de FIV falham ao implantar.<sup>19</sup>

Acredita-se que a alta taxa de abortos espontâneos em reprodução humana assistida (RHA) ocorra por causa das aneuploidias. No entanto, foi observado que o desenvolvimento morfológico normal do embrião não tem necessariamente relação com a euploidia.<sup>22,23</sup>

A biópsia do embrião humano deve ser considerada como o equilíbrio entre a retirada de células para uma análise genética segura e eficiente somada à preservação do potencial de implantação do embrião.<sup>24</sup> É de fundamental importância o conhecimento das características das amostras para que as análises feitas sejam adequadas.<sup>25</sup> Independentemente dos testes genéticos pré-implantacionais usados, será necessário obter DNA por meio de algum método de biópsia.<sup>26</sup>

Uma das questões de grande interesse nos centros de RHA é qual o melhor momento de fazer a biópsia embrionária. Deve-se manter o embrião em cultivo até o quinto ou sexto dia de desenvolvimento para efetuar a biópsia de blastocistos? Sabe-se que hoje existe uma tendência de acreditar que a biópsia de blastocistos é mais eficiente e causa menos riscos à integridade e ao desenvolvimento embrionário subsequente.

Dessa forma, o objetivo deste estudo é verificar, por meio de revisão bibliográfica, qual técnica de biópsia embrionária é considerada mais apropriada para feita de testes genéticos pré-implantacionais. Para tanto, foram considerados os benefícios proporcionados e a viabilidade embrionária subsequente. Como objetivo específico, comparou-se a biópsia em estágio de clivagem com a biópsia em estágio de blastocistos.

## Método

Pesquisa bibliográfica, na forma de revisão de publicações científicas, por meio das redes US National Library of Medicine (Pubmed), Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (Lilacs), Google Acadêmico e Biblioteca Virtual em Saúde (BVS). Não houve limite de tempo nas pesquisas feitas, mas foram privilegiadas publicações dos últimos

cinco anos. Foram pesquisados artigos em língua inglesa e portuguesa. As palavras-chave pesquisadas foram: biópsia; corpúsculos polares; blastômeros e trofoectoderma.

### Biópsia de corpúsculos polares

Quando se fala em biópsia de corpúsculos polares (CP), tem-se uma possibilidade importante para não afetar a integridade embrionária.<sup>27</sup> O uso da biópsia de CP pode ser uma opção interessante para países que não permitem a biópsia embrionária, como, por exemplo, a Alemanha e a Suíça.<sup>6,28</sup> Por meio dessa técnica é possível prever o genótipo materno dos embriões, de maneira indireta, já que os CP são subprodutos da meiose feminina.<sup>6,29</sup>

Quando ocorre a indução da ovulação, os oócitos recuperados, em sua maioria, estão em M II, o que é caracterizado pela presença do primeiro CP, quando ocorre a primeira divisão meiótica. Logo após a fertilização, haverá a extrusão do segundo CP e o número de cromossomos será reduzido pela metade, ou seja, 23.<sup>11</sup>

Para a feita da biópsia de CP é necessário o acesso ao espaço perivitelínico do oócito através de uma abertura na ZP, que pode ser feita de forma química, mecânica ou a laser. A retirada do primeiro e do segundo CP pode ocorrer de maneira sequencial ou simultânea.<sup>7</sup> O primeiro CP pode ser removido de 36 a 42 horas após a administração do hormônio coriônico gonadotrófico (hCG). Já a remoção simultânea deve acontecer entre nove e 22 horas após a inseminação. Porém, no limite desse intervalo o primeiro CP pode ter degenerado.<sup>28</sup> Nesse caso, pode haver dificuldade de distinguir o primeiro CP do segundo, o que torna preferível a feita sequencial da biópsia.<sup>26</sup> Não é aconselhável o uso de solução de ácido Tyrode ou laser para a remoção do primeiro CP antes da fertilização, pois pode haver efeitos negativos ao fuso meiótico.<sup>28</sup>

A análise dos resultados é um fator crucial para a biópsia de CP. Existem dois tipos fundamentais de erros que ocorrem na meiose I materna: não disjunção e separação prematura das cromátides irmãs (PSSC). Significa que para cada par de cromossomos existem cinco resultados únicos que podem ocorrer durante a meiose I: normal, não disjunção com perda ou ganho e PSSC com perda ou ganho. Assumindo-se que não há outros erros na meiose II, existem sete resultados possíveis no momento em que a meiose materna é completa. Isso se reflete na existência de dois resultados possíveis na meiose II após PSSC na meiose I.<sup>26</sup>

Note-se que a não disjunção na meiose I resulta em erros recíprocos, no primeiro e no segundo CP. No entanto, com PSSC, erros recíprocos indicam que o erro na meiose I foi corrigido na meiose II. Assim, os erros recíprocos idênticos encontrados na análise do primeiro e do segundo CP não são interpretáveis, porque não é possível prever se eles refletem não disjunção (que resulta em aneuploidia) ou PSSC com correção (que resulta em euploidia).<sup>26</sup>

Um estudo de 2012 de Levin et al.<sup>30</sup> sugeriu que a biópsia de CP pode ser prejudicial ao desenvolvimento embrionário por causa do aumento das taxas de fragmentação e diminuição da velocidade de clivagem. Essas alterações, segundo os autores, ocasionaram número de blastômeros reduzidos em relação aos embriões usados como controle. Porém, este estudo não avaliou taxas de implantação e ainda acredita-se que a

remoção dos CP, a partir de oócitos MII e oócitos fertilizados, causa poucos efeitos negativos sobre o desenvolvimento embrionário.<sup>1,25,26,29,30</sup>

Geraedts et al.<sup>31</sup> demonstraram em 2011, em estudo-piloto, que a análise de ambos CP pode ser feita em até 12 horas para PGS, por meio de CGH array.<sup>31</sup> No entanto, sabe-se que a biópsia de ambos os CP consegue detectar aproximadamente 75% de possíveis erros cromossômicos. Essa limitação se deve a que tais erros podem ocorrer em diversos estágios do desenvolvimento embrionário.<sup>26</sup>

Apesar de a biópsia de CP ser considerada menos invasiva, não é possível detectar defeitos derivados paternos.<sup>5,27</sup> Por causa desses fatores, é importante que estejam disponíveis técnicas de biópsia de blastômeros e biópsia de TE, para que sejam evitadas transferências de embriões afetados em casos mais complexos.<sup>29</sup> No entanto, acredita-se que até 90% das aneuploidias têm origem materna e em países em que não são permitidas análises em embriões a biópsia de CP é eticamente aceita.<sup>5,31</sup>

Kuliev e Rechitsky<sup>29</sup> publicaram em 2001 estudo em que foram feitos 938 ciclos de PGD para 146 tipos de doenças monogênicas mendelianas, por meio de 9.036 oócitos biopsiados e analisados por PCR multiplex. Desses, 1.578 geraram embriões saudáveis e foram transferidos em 790 ciclos. Essas transferências resultaram em 329 gravidezes e 345 nascimentos. Apesar de ter usado biópsia de blastômeros ou de blastocistos em 701 dos embriões transferidos, os autores concluem que o PGD de CP pode ser seguro e confiável.<sup>29</sup>

Geraedts et al.<sup>31</sup> fizeram em 2011 estudo de prova de princípio em dois centros de RHA para determinar a confiabilidade de biópsia de CP com o uso de CGH microarray para análises de CPI e CPII, em um tempo máximo de 12 horas. Os CP foram analisados separadamente para todos os cromossomos e aqueles diagnosticados aneuploides tiveram seus respectivos embriões biopsiados para análise de concordância. As biópsias foram feitas entre seis e nove horas após a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). A remoção dos CP ocorreu de forma simultânea e as análises foram feitas separadamente.<sup>31</sup>

Participaram deste estudo 41 pacientes de FIV com idade média de 40 anos. Dos 226 zigotos, 225 obtiveram sucesso na biópsia de ambos os CP. Quase 80% dos ciclos foram concluídos em até 12 horas. Os demais necessitaram de uma hora a mais de análise. Dos 195 casos, a taxa de aneuploidia diagnosticada foi de 72% (140) e de euploidia de 28% (55). Foram feitos 43 ciclos e em 19 não houve embriões euploides para transferência. A taxa de implantação por embriões transferidos foi de 26% (10/39), gravidez clínica de 19% (8/42) por ciclo e 33% (8/24) por transferência e taxa de gravidez em curso de 17% (7/42) por ciclo e 29% (7/24) por transferência.<sup>31</sup>

Ficaram disponíveis para a análise de concordância 177 zigotos que não foram transferidos. Porém, por causa de fatores como contaminação e falha de processo, obtiveram-se resultados em 138 pares de CP e, desses, 130 (94%) foram concordantes e oito (6%) discordantes. Dos oito casos, sete tinham diagnósticos aneuploides e o zigoto euploide, enquanto que em um os CP eram euploides e o zigoto era aneuploide. Os autores concluem que biópsia de CP para análise por CGH microarray pode obter resultados confiáveis em tempo oportuno para transferência no mesmo ciclo de FIV.<sup>31</sup>

### Biópsia de blastômeros

Desde o início do PGD, a biópsia de blastômeros no terceiro dia de desenvolvimento é a abordagem mais usada.<sup>5,6,11,32,33</sup> Ela ocorre por meio da extração de um único blastômero<sup>11,33</sup> e pode ser usada para doenças monogênicas, doenças ligadas ao sexo, translocações cromossômicas balanceadas e tipagens de antígeno leucocitário humano (HLA).<sup>6,7</sup> Podem ser analisadas tanto alterações cromossômicas paternas quanto maternas e os resultados são alcançados ainda em tempo para transferência no quinto ou sexto dia de desenvolvimento, sem que haja necessidade de criopreservação do embrião.<sup>7,26</sup>

Para a retirada do blastômero, o rompimento da ZP normalmente ocorre no terceiro dia de desenvolvimento. Porém, isso pode variar conforme a clínica e também de acordo com cada caso. Normalmente, o meio de cultivo usado para a biópsia é livre de cálcio e magnésio e a extração do blastômero ocorre por aspiração.<sup>28</sup>

A técnica de Fish associada à biópsia de blastômeros foi, até recentemente, considerada como a melhor opção para PGS. Muitos trabalhos com fracas evidências de melhorias nos resultados de RHA foram publicados.<sup>31</sup> No entanto, nos últimos tempos, diversos ensaios clínicos demonstraram que não houve avanços nos resultados com essa técnica e em alguns casos foi constatado declínio.<sup>34-36</sup>

Masterbroek et al.<sup>33</sup> fizeram em 2007 estudo randomizado, multicêntrico, duplo cego controlado, para comparar ciclos de FIV com PGS com uso de biópsia de blastômeros e sem PGS (grupo controle), em mulheres de 35 a 41 anos. Participaram 206 mulheres no grupo que fez PGS e 202 do grupo controle. Foram feitos 836 ciclos de FIV. No grupo controle, os embriões foram escolhidos por meio do seu aspecto morfológico e no grupo de PGS a escolha foi baseada tanto nos resultados das análises genéticas quanto na morfologia. Foram transferidos apenas os embriões considerados euploides para os cromossomos testados. A biópsia foi feita no terceiro dia de desenvolvimento e oito cromossomos foram analisados mediante Fish. Os embriões que continham quatro ou mais blastômeros foram biopsiados. Cada ciclo teve dois embriões transferidos.<sup>33</sup>

O grupo que fez o rastreamento genético pré-implantacional teve uma taxa de gravidez em curso significativamente menor do que o grupo controle (25% × 37%, respectivamente) e taxa de nascidos vivos inferior (24% × 35%, respectivamente). Os autores sugerem que a redução nas taxas de nascidos vivos e de gravidezes em curso no grupo de mulheres que foram submetidas ao PGS pode ter sido causada pela biópsia de blastômeros, o que afetaria o potencial de implantação desses embriões.<sup>33</sup>

Deve-se também levar em consideração a incidência relativamente alta da separação cromossômica anômala por causa de falhas na clivagem. Essas falhas muitas vezes resultam em mosaicismos cromossômicos, de modo que a retirada de um blastômero, por meio de biópsia, pode não ser representativa para todo o embrião.<sup>4,5,33</sup> Acredita-se que 40% a 60% dos embriões no estágio de clivagem sejam mosaicos<sup>28</sup> e que, nessa fase, o mosaicismos é maior em relação aos embriões do quinto dia de desenvolvimento.<sup>6,18</sup>

Outro fator importante é a possibilidade de autocorreção do embrião, que parece acontecer de maneira mais intensa

no estágio de clivagem. Essa autocorreção pode causar o descarte de embriões considerados aneuploides no terceiro dia de desenvolvimento, mas eles poderiam, por algum mecanismo de correção, se tornar euploides já na fase de blastocistos.<sup>37,38</sup>

Mertzaniidou et al.<sup>3</sup> em 20012 analisaram 14 embriões criopreservados de nove pacientes de FIV por meio de ICSI que obtiveram partos saudáveis e verificaram taxa de aneuploidias e incidência de mosaicismos em embriões de boa qualidade. Os embriões foram criopreservados no segundo dia de desenvolvimento e, após o descongelamento, ficaram incubados durante aproximadamente 12 horas. Logo após foram retirados da incubadora por 24 horas. Em seguida, removeu-se a ZP e os blastômeros foram desagregados. Obtiveram-se 91 blastômeros para estudo, os quais foram analisados por arranjo de hibridização genômica comparativa (CGH array).<sup>3</sup>

O PGS mostrou que em dez dos 14 embriões biopsiados (71,4%) foram diagnosticados mosaicos com alta taxa de aneuploidias, ainda que nenhum dos embriões apresentasse o mesmo padrão de aneuploidia em todas as células. Já quatro de 14 (28,6%) eram uniformemente diploides. Foram analisados 70 blastômeros, dos quais 39 eram diploides (55,7%). Desses blastômeros, cinco tinham aberrações estruturais (7,1%) e 31 traziam anormalidades numéricas (44,3%). Esses resultados demonstraram uma elevada taxa de aneuploidias em embriões de boa qualidade no estágio de clivagem. Os autores sugerem que alguns dos embriões mosaicos podem ter potencial de implante e que, por meio de mecanismos de autocorreção, possa haver a diminuição das células aneuploides nos estágios de clivagem, mórula ou blastocisto.<sup>3</sup>

### **Biópsia de blastocistos**

Nos últimos anos, a biópsia de blastocistos tem sido amplamente usada porque, assim como a de blastômeros, permite fazer análises genéticas maternas e paternas.<sup>5</sup> Essa técnica só foi viável após a melhoria no processo de cultivo de embriões *in vitro*. Ela tem uma clara vantagem em relação às outras técnicas, pois fornece maior quantidade de células para a análise genética, além de os estudos sugerirem um menor dano ao embrião.<sup>7,39</sup>

Para que ocorra a retirada das células do TE é necessário que seja feita uma abertura na ZP do embrião, que pode ser no terceiro dia de desenvolvimento ou na mesma manhã em que for feita a biópsia, conforme protocolo de cada clínica. Após as células trofoectodérmicas herniarem pela abertura da ZP, sua remoção pode ser feita por uso do laser nos pontos de contato celular ou excisão mecânica.<sup>28</sup>

Com o aumento na tendência de aneuploidia embrionária, por causa da idade materna avançada, somado aos decepcionantes resultados clínicos com biópsia em estágio de clivagem e Fish para PGD e à limitada capacidade de análise cromossômica que Fish tem, a biópsia de TE, associada às novas tecnologias de análises genéticas (CGH array, SNP array), está se tornando uma realidade em RHA. O aperfeiçoamento dos processos de vitrificação de blastocistos também foi fundamental para o sucesso da biópsia de TE, pois muitas clínicas não têm laboratórios de genética anexos, o que pode tornar fundamental a criopreservação para transferências em ciclos posteriores.

Schoolcraft et al.<sup>36</sup> por meio de estudo clínico feito em 2009, avaliaram análise cromossômica completa por meio de biópsia de TE e CGH. Foram submetidos à biópsia de TE 45 pacientes inférteis com idade superior a 35 anos. Para controle, usaram-se 113 pacientes clinicamente semelhantes que fizeram transferência embrionária de blastocistos. Dasquelas pacientes que fizeram PGS, foram biopsiados 287 embriões e 269 foram diagnosticados (93,7%). A taxa de aneuploidia foi de 51,3%. Em ciclo subsequente, 90 embriões biopsiados e diagnosticados euploides foram descongelados e transferidos. Desse grupo, a taxa de implantação foi de 72,2% (65/90) e de batimento cardíaco fetal de 68,9% (62/90) e no grupo controle, de 46,5% (139/299) e 44,8% (134/299), respectivamente. Os autores sugerem que a biópsia de blastocistos e CGH pode ser muito promissora para melhorar as taxas de sucesso em FIV.<sup>36</sup>

Schoolcraft et al.,<sup>19</sup> em outro estudo feito em 2011, combinaram biópsia de TE, vitrificação de blastocistos e SNP microarray em mulheres com idade materna avançada, abortos de repetição e falhas recorrentes de implantação. Foram feitas 100 transferências de 130 ciclos feitos por 127 pacientes. A taxa de nascidos vivos foi de 71% para uma média de 1,78 embrião transferido por ciclo. A porcentagem de embriões diagnosticados euploides foi de 47,4% (356/751). Esses resultados sugerem que essas técnicas associadas podem contribuir muito para PGS em pacientes com as características mencionadas no estudo.<sup>19</sup>

Yang et al.,<sup>18</sup> em estudo piloto randomizado feito em 2012, associaram a técnica de biópsia de blastocistos para feita de CGH array com transferência única de embriões. Para isso, usaram uma população de pacientes com bom prognóstico de FIV: idade inferior a 35 anos, cariótipo normal e sem histórico de abortos recorrentes. As pacientes foram separadas em dois grupos. No grupo A (n=55) os embriões foram escolhidos por meio da morfologia e PGS por CGH array. No grupo B (n=48) foi usada apenas a morfologia para a escolha do melhor embrião a ser transferido. Todas as pacientes receberam apenas um blastocisto cada e os embriões foram transferidos no sexto dia de desenvolvimento. A taxa de gravidez clínica foi significativamente maior no grupo em que foi usada a biópsia de blastocistos e morfologia em comparação com o grupo que usou apenas a morfologia (70,9% e 45,8%, respectivamente). Além desses dados, foi observada taxa de 44,9% de aneuploidias no grupo dos blastocistos analisados por CGH array.<sup>18</sup>

### **Biópsia de blastocistos x biópsia de blastômeros**

Um estudo piloto com 20 casais portadores de betatalassemia, publicado por Kokkali et al. em 2007,<sup>40</sup> comparou a biópsia de blastômeros (grupo A) do terceiro dia de desenvolvimento (um blastômero biopsiado) e transferência no quinto dia com a biópsia de TE (grupo B) no quinto dia de desenvolvimento (quatro a cinco células) e transferência no sexto dia, para detecção de betatalassemia por meio de PCR multiplex em tempo real. Esse estudo incluiu 10 ciclos para cada grupo.<sup>40</sup>

No grupo A foram fertilizados 131 oócitos e conseguiram-se 101 embriões adequados para retirada de um blastômero, dos quais foi possível analisar 76 (75,2%) e 30 blastocistos não afetados foram transferidos. Esse grupo obteve como resultado

seis gravidezes e oito batimentos cardíacos fetais, com taxa de implantação de 26,7%. Já o grupo B obteve 128 oócitos fertilizados. Desses, 53 alcançaram o estágio de blastocistos, dos quais 50 foram analisados (94,3%) e 21 blastocistos não afetados foram transferidos, e geraram seis gravidezes e dez batimentos cardíacos fetais, com taxa de implantação de 47,6%. No entanto, as taxas de desenvolvimento embrionário foram semelhantes tanto para biópsia de blastômeros (50,4%) quanto para a de blastocistos (46,9%).<sup>40</sup>

Em trabalho publicado em 2009 por Zhang et al.,<sup>41</sup> embriões criopreservados de oócitos anormalmente fertilizados foram aleatoriamente alocados para biópsia e grupo controle. Após o descongelamento, os embriões que foram biopsiados em estágio de clivagem e criopreservados tiveram uma taxa de sobrevivência significativamente menor do que a do grupo controle de clivagem (não biopsiados), 64% e 92%, respectivamente. Na fase de mórula, não houve diferenças entre aqueles que sofreram biópsias e o grupo controle. Já os embriões descongelados, que estavam na fase de blastocisto e foram biopsiados, tiveram uma taxa de sobrevivência de 95,6% contra 81,3% do grupo controle ( $p=0,035$ ).<sup>41</sup>

Os autores sugerem que a vitrificação em estágio de desenvolvimento embrionário mais avançado pode ser benéfica por causa da maior exposição ao crioprotetor da blastocela expandida.<sup>41</sup> Entretanto, em 2013 foi relatado por Scott et al.<sup>26</sup> que a biópsia de blastômeros pode causar efeitos prejudiciais aos embriões e, portanto, pode ajudar a explicar os resultados inferiores que se obtiveram com a criopreservação e o consequente descongelamento dos embriões biopsiados no estágio de clivagem.<sup>26</sup>

Um ensaio clínico emparelhado randomizado, feito em 2013 por Scott et al.,<sup>32</sup> teve como objetivo verificar se a biópsia no estágio de clivagem ou a biópsia de blastocistos afeta a competência reprodutiva embrionária. Foram selecionados casais inférteis com idade da mulher inferior a 35 anos. Em cada ciclo de FIV, foram selecionados dois embriões para transferência e entre os dois selecionados um foi submetido à biópsia e o outro usado como controle, de forma aleatória. A decisão de manter os embriões até o quinto dia de desenvolvimento e fazer a biópsia de TE ou a de blastômeros foi tomada conforme protocolos da clínica. Os resultados das biópsias não foram revelados antes da transferência embrionária. A partir da biópsia e da técnica de SNP array, foi possível comparar o DNA do conceito com o DNA das biópsias feitas. Em caso de ocorrer gravidez gemelar ou falha no ciclo, os resultados entre os embriões biopsiados e controles foram considerados semelhantes e quando houve gravidez única, foi possível saber se o embrião que gera o conceito foi o que sofreu a biópsia ou o embrião controle.<sup>32</sup>

Participaram desse estudo 116 pacientes, 46 foram submetidas à transferência com embrião em estágio de clivagem e 70 no estágio de blastocistos e três não completaram o estudo. Na biópsia de blastômeros e na referente interpretação das análises, obteve-se êxito nas 46 pacientes. Já na biópsia de blastocistos aconteceu uma falha de amplificação e duas pacientes descontinuaram o tratamento, com total de 67 pacientes. A morfologia de ambos os grupos não apresentou diferenças significativas. Dos resultados, 12 das pacientes que receberam os embriões no estágio de clivagem obtiveram gravidez gemelar, para 21 pacientes não houve sucesso na

implantação e em 13 pacientes ocorreu gravidez única. Dessas 13 pacientes, apenas uma gravidez foi oriunda de embrião biopsiado. As outras 12 resultaram dos embriões controles.<sup>32</sup>

No total, 14 embriões biopsiados no terceiro dia de desenvolvimento implantaram (30,4%), contra 23 embriões não biopsiados implantados (50%). Essa diminuição significativa nas taxas de implantação (19,6%) ou a redução relativa de 39,1% nas probabilidades de implantação embrionária, segundo os autores, representa o risco de se fazer a biópsia de embriões no estágio de clivagem. Já no grupo da biópsia de blastocistos, dos 67 pares de embriões, 27 pacientes obtiveram gravidez múltipla, 24 não engravidaram e 16 conseguiram gestação única. Sete foram de embriões que passaram por biópsia de TE e nove daqueles embriões não biopsiados (controle).<sup>32</sup>

Quando levados em consideração todos os embriões transferidos, 34 biopsiados (51%) e 36 não biopsiados (54%) resultaram em nascimentos. Essa diferença de 3% não foi considerada significativa. Os autores concluem que os resultados encontrados são forte indicativo de que a biópsia de terceiro dia é prejudicial e diminui as taxas de implantação e que a biópsia de blastocistos não demonstra efeito adverso ao embrião, ao menos até a concepção.

---

## Discussão

Os diferentes tipos de biópsia usados em RHA são imprescindíveis para o uso das diversas tecnologias de testes genéticos pré-implantacionais. No entanto, torna-se necessário compreender as diferenças de cada uma para fazer a melhor escolha. A biópsia de CP tem grande vantagem em países onde não é possível biopsiar embriões por causa dos regulamentos vigentes.<sup>6,28</sup> Ela também é considerada menos invasiva do que as demais, por não necessitar de células de embriões e permitir tempo hábil para transferência de embriões no mesmo ciclo.<sup>26</sup>

A biópsia de CP parece não ser prejudicial ao desenvolvimento embrionário,<sup>1,7,26,29</sup> mas não há consenso sobre sua segurança para o embrião. Seu valor preditivo das aneuploidias está abaixo das demais biópsias para RHA, o que, em alguns casos, torna necessária a confirmação do diagnóstico por testes adicionais.<sup>29</sup> Também não se consegue verificar erros genéticos derivados do gameta masculino<sup>5,27</sup> nem possíveis falhas nas primeiras clivagens.<sup>31</sup> Outro fator desfavorável é a escassez de material disponível. Segundo Capalbo et al.,<sup>8</sup> uma em cada dez biópsias de CP permanece inconclusiva por falha de diagnóstico em ao menos um dos CP. Além do mais, nem todos os oócitos biopsiados têm potencial para chegar ao estágio embrionário, o que ocasiona gastos desnecessários aos pacientes.

A biópsia de blastômeros ainda é a técnica mais usada por muitos centros de RHA e certamente aumentou as possibilidades de casais afetados por alguma doença monogênica virem a ter filhos normais.<sup>32</sup> Uma das grandes discussões acerca do assunto é se a biópsia de blastômeros no terceiro dia de desenvolvimento pode ser prejudicial ao embrião. Diversos ensaios clínicos randomizados não demonstraram melhoria nas taxas de nascidos vivos em relação aos grupos controles e possíveis danos ao desenvolvimento subsequente.<sup>34-36</sup> Esse

quadro pode ser explicado, em parte, por erro de técnica, o que pode ocasionar o descarte de embriões viáveis por diagnósticos inconclusivos ou errôneos. Ou pela falta de experiência de fazer a biópsia, o que afeta seu potencial de implantação e as limitações inerentes à própria técnica de Fish, que não analisa todos os cromossomos.<sup>20</sup> Além dessas possíveis adversidades, o trabalho de Scott et al.<sup>32</sup> demonstrou que a retirada de um blastômero realmente prejudica o potencial de implantação do embrião. Nesse mesmo trabalho, a biópsia de TE não evidenciou tais efeitos. Os resultados obtidos vão ao encontro da tendência atual de optar pela biópsia de blastocistos.<sup>32</sup>

Outro aspecto de grande relevância é a alta taxa de mosaïcismo cromossômico no estágio de clivagem, que pode causar um aumento de resultados falso-positivos e falso-negativos, o que parece ser menor em blastocistos,<sup>28</sup> pois, apesar de não estar bem esclarecido, acredita-se que um embrião diagnosticado com mosaïcismo ou aneuploidia na fase de clivagem possa autocorrigir e gerar um blastocisto cromossomicamente normal.<sup>36</sup> Deve-se considerar a necessidade de criopreservação de blastocistos biopsiados para transferência em ciclo posterior, situação normalmente ocasionada pela dificuldade dos laboratórios de genética de entregar os resultados das análises em tempo hábil. Entretanto, foi demonstrado que a criopreservação de embriões em estágio de blastocistos não diminui as taxas de sucesso em FIV.<sup>19,36</sup>

Apesar das vantagens da biópsia de blastocistos, vale salientar que em casos de idade materna avançada pode haver um menor número de oócitos em relação às demais pacientes e, conseqüentemente, menos embriões disponíveis. Esse fato pode favorecer a transferência no terceiro dia de desenvolvimento e evitar prolongar o cultivo embrionário e não ter embriões para transferência, já que nem todos os embriões que chegam ao terceiro dia atingirão a fase de blastocistos em laboratório.

## Conclusão

Os dados levantados neste estudo sugerem que com a evolução dos testes genéticos pré-implantacionais e a necessidade de melhores resultados em RHA, a biópsia de blastocistos é a melhor escolha do momento. Com essa técnica aplicada à PGD/PGS é possível uma ampla análise genética do embrião. Ela também não demonstra ter efeitos negativos no potencial de implantação, como ocorre com a biópsia de blastômeros, que oferece maior quantidade de DNA e aperfeiçoa as análises.

## Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## REFERÊNCIAS

- Brezina PR, Brezina DS, Kearns WG. Preimplantation genetic testing. *BMJ*. 2012;18:e5908, 345.
- Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*. 1990;344:768-70.
- Mertzaniidou A, Wilton L, Cheng J, Spits C, Vanneste E, Moreau Y, et al. Microarray analysis reveals abnormal chromosomal complements in over 70% of 14 normally developing human embryos. *Hum Reprod*. 2013;28:256-64.
- Christopikou D, Tsorva E, Economou K. Polar body analysis by array comparative genomic hybridization accurately predicts aneuploidies of maternal meiotic origin in cleavagel stage embryos of women of advanced maternal age. *Hum Reprod*. 2013;28:1426-34.
- Chang LJ, Chen SU, Tsai YY, Hung CC, Fang MY, Su YN, et al. An update of preimplantation genetic diagnosis in gene diseases, chromosomal translocation, and aneuploidy screening. *Clin Exp Reprod Med*. 2011;38:126-34.
- Ly KD, Agarwal A, Nagy ZP. Preimplantation genetic screening: does it help or hinder IVF treatment and what is the role of the embryo? *J Assist Reprod Genet*. 2011;28:833-49.
- Xu K, Montag M. New perspectives on embryo biopsy: not how, but when and why? *Semin Reprod Med*. 2012;30:259-66.
- Capalbo A, Bono S, Spizzichino L, Biricik A, Baldi M, Colamaria S, et al. Sequential comprehensive chromosome analysis on polar bodies, blastomeres, and trophoblast: insights into female meiotic errors and chromosomal segregation in the preimplantation window of embryo development. *Hum Reprod*. 2013;28:509-18.
- Galan A, Diaz-Gimeno P, Poo ME, Valbuena D, Sanchez E, Ruiz V, et al. Defining the genomic signature of totipotency and pluripotency during early human development. *PLoS One*. 2013;8:e62135.
- Taylor TH, Gilchrist JW, Hollowell SV, Hanshew KK, Orris JJ, Glassner MJ, et al. The effects of different laser pulse lengths on the embryo biopsy procedure and embryo development to the blastocyst stage. *J Assist Reprod Genet*. 2010;27:66377.
- Wolff P, Martinhago CD, Ueno J. Diagnóstico genético pré-implantacional: uma ferramenta importante para a rotina de fertilização in vitro? *Femina*. 2009;37:297-303.
- Joris H, De Vos A, Janssens R, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Comparison of the results of human embryo biopsy and outcome of PGD after zona drilling using acid Tyrode medium or a laser. *Hum Reprod*. 2003;18:1896-902.
- Lee MJ, Lee RK, Lin MH, Hwu YM. Cleavage speed and implantation potential of early-cleavage embryos in IVF or ICSI cycles. *J Assist Reprod Genet*. 2012;29:745-50.
- Harper JC, Coonen E, De Rycke M, Harton G, Moutou C, Pehlivan T, et al. ESHRE PGD Consortium data collection X: cycles from January to December 2007 with pregnancy follow-up to October 2008. *Hum Reprod*. 2010;25:2685-707.
- Fiorentino F, Spizzichino L, Bono S, Biricik A, Kokkali G, Rienzi L, et al. PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization. *Hum Reprod*. 2011;26:1925-35.
- Tao X, Su J, Pepe R, Northrop LE, Ferry KM, Treff NR. PGD for monogenic disease by direct mutation analysis alone in 2 or more cells is more reliable than multiple marker analysis in single cells. *Fertil Steril*. 2011;96:S21.
- Treff NR, Su J, Tao X, Levy B, Scott RT. Accurate single cell 24 chromosome aneuploidy screening using whole genome amplification and single nucleotide polymorphism microarrays. *Fertil Steril*. 2010;94:2017-21.
- Yang Z, Liu J, Collins GS, Salem SA, Liu X, Lyle SS, et al. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Mol Cytogenet*. 2012;5:24.
- Schoolcraft WB, Treff NR, Stevens JM, Ferry K, Katz-Jaffe M, Scott RT. Live birth outcome with trophoctoderm biopsy, blastocyst vitrification, and single-nucleotide polymorphism

- microarray-based comprehensive chromosome screening in infertile patients. *Fertil Steril*. 2011;96:638–40.
20. Handyside AH. 24-chromosome copy number analysis: a comparison of available technologies. *fertil steril*. 2013;100:595–602.
  21. Gianaroli L, Racowsky C, Geraedts J, Cedars M, Makrigiannakis A, Lobo RA. Best practices of ASRM and ESHRE: a journey through reproductive medicine. *Fertil Steril*. 2012;98:1380–94.
  22. Fragouli E, Lenzi M, Ross R, Katz-Jaffe M, Schoolcraft WB, Wells D. Comprehensive molecular cytogenetic analysis of the human blastocyst stage. *Hum Reprod*. 2008;23:2596–608.
  23. Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Stevens J, Gutiérrez-Mateo C, Schoolcraft WB, et al. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertil Steril*. 2011;95:520–4.
  24. De Vos A, Staessen C, De Rycke M, Verpoest W, Haentjens P, Devroey P, et al. Impact of cleavage-stage embryo biopsy in view of PGD on human blastocyst implantation: a prospective cohort of single embryo transfers. *Hum Reprod*. 2009;24:2988–96.
  25. Xu K, Montag M. New perspectives on embryo biopsy: not how, but when and why? *Semin Reprod Med*. 2012;30:259666.
  26. Scott KL, Hong KH, Scott RT. Selecting the optimal time to perform biopsy for preimplantation genetic testing. *Fertil Steril*. 2013;100:608–14.
  27. Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Toschi M, Esposito F, Fasolino MC. The combination of polar body and embryo biopsy does not affect embryo viability. *Hum Reprod*. 2004;19:1163–9.
  28. Harton GL, Magli MC, Lundin K, Montag M, Lemmen J, Harper JC, ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group. Best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS). *Hum Reprod*. 2011;26:41–6.
  29. Kuliev A, Rechitsky S. Polar body-based preimplantation genetic diagnosis for Mendelian disorders. *Mol Hum Reprod*. 2011;17:275–85.
  30. Levin I, Almog B, Shwartz T, Gold V, Ben-Yosef D, Shaubi M, et al. Effects of laser polar-body biopsy on embryo quality. *Fertil Steril*. 2012;97:1085–8.
  31. Geraedts J, Montag M, Magli MC, Repping S, Handyside A, Staessen C, et al. Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part I: clinical results *Hum Reprod*. 2011;26:3173–80.
  32. Scott RT, Upham KM, Forman EJ, Zhao T, Treff NR. Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertil Steril*. 2013;100:624–30.
  33. Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR, et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med*. 2007;357:9–17.
  34. Debrock S, Melotte C, Spiessens C, Peeraer K, Vanneste E, Meeuwis L, et al. Preimplantation genetic screening for aneuploidy of embryos after in vitro fertilization in women aged at least 35 years: a prospective randomized trial. *Fertil Steril*. 2010;93:364–73.
  35. Hardarson T, Hanson C, Lundin K, Hillensjö T, Nilsson L, Stevic J, et al. Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: a randomized controlled trial. *Hum Reprod*. 2008;23:2806–12.
  36. Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG, Stevens J, Rawlins M, Munne S. Preimplantation aneuploidy testing for infertile patients of advanced maternal age: a randomized prospective trial. *Fertil Steril*. 2009;92:157–62.
  37. Scott RT, Treff NR, Stevens J, Forman EJ, Hong KH, Katz-Jaffe MG, et al. Delivery of a chromosomally normal child from an oocyte with reciprocal aneuploid polar bodies. *J Assist Reprod Genet*. 2012;29:533–7.
  38. Barbash-Hazan S, Frumkin T, Malcov M, Yaron Y, Cohen T, Azem F, et al. Preimplantation aneuploid embryos undergo self-correction in correlation with their developmental potential. *Fertil Steril*. 2009;92:890–6.
  39. Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Comprehensive chromosome screening of trophectoderm with vitrification facilitates elective single-embryo transfer for infertile women with advanced maternal age. *Fertil Steril*. 2013;100:615–9.
  40. Kokkali G, Traeger-Synodinos J, Vrettou C, Stavrou D, Jones GM, Cram DS, et al. Blastocyst biopsy versus cleavage stage biopsy and blastocyst transfer for preimplantation genetic diagnosis of beta-thalassaemia: a pilot study. *Hum Reprod*. 2007;22:1443–9.
  41. Zhang X, Trokoudes KM, Pavlides C. Vitrification of biopsied embryos at cleavage, morula, and blastocyst stage. *Reprod Biomed Online*. 2009;19:526–31.



## Reprodução & Climatério

<http://www.sbrh.org.br/revista>



### Relato de caso

# Gestação gemelar com mola hidatiforme completa e feto vivo após ovodoação e fertilização *in vitro*: relato de caso<sup>☆</sup>

Sofia Andrade de Oliveira<sup>a,\*</sup>, Lídia Lima Aragão Sampaio<sup>a</sup>,  
Tulia Kleveston<sup>a</sup> e Vamberto Oliveira de Azevedo Maia Filho<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

<sup>b</sup> Departamento de Ginecologia Endócrina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

#### INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

##### Histórico do artigo:

Recebido em 17 de outubro de 2013

Aceito em 30 de outubro de 2013

On-line em 4 de dezembro de 2013

##### Palavras-chave:

Mola hidatiforme  
Fertilização *in vitro*  
Doenças em gêmeos  
Gestação gemelar

##### Keywords:

Hydatiform mole  
Fertilization *in vitro*  
Diseases in twins  
Twin pregnancy

#### R E S U M O

**Introdução:** a gestação gemelar com mola hidatiforme completa e feto vivo é um evento raro e tem, na maior parte dos casos, evolução para aborto ou interrupção médica por causa dos riscos para a mãe e para o feto. Quando associada à reprodução assistida, a decisão de finalização é mais difícil por causa do desejo do casal em manter a gestação.

**Método:** este artigo apresenta um caso de gestação gemelar dizigótica com mola hidatiforme completa em coexistência com feto diploide e placenta normal em uma paciente de 45 anos após fertilização *in vitro* por ovodoação.

**Resultados:** paciente optou por manter a gestação e o parto ocorreu com 29 semanas, sem complicações maternas. Recém-nascido evoluiu com bom desenvolvimento neuropsicomotor, sem sequelas.

**Conclusão:** este relato de caso ilustra a possibilidade de conduta expectante, porém não podemos ignorar o fato de que existe um alto risco de permanência da doença trofoblástica gestacional. Infelizmente, a raridade do caso torna o manejo clínico ainda controverso.

© 2013 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Publicado por Elsevier Editora Ltda.

Todos os direitos reservados.

### Twin pregnancy with a complete hydatiform mole and a live fetus following egg donation and *in-vitro* fertilization: case report

#### A B S T R A C T

**Introduction:** twin pregnancy with complete hydatiform mole and live fetus is a rare event with the most cases resulting in abortion or medical interruption due to maternal and fetal risks. When associated with assisted reproduction, the decision of pregnancy interruption is more difficult due to the desire of the couple to maintain the pregnancy.

**Method:** this study will present a case of twin dizygotic pregnancy with complete hydatiform mole coexisting with fetus diploid and normal placenta in a patient 45 years old, after *in-vitro* fertilization by egg donation.

<sup>☆</sup> Trabalho realizado no Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

\* Autor para correspondência.

E-mail: [sofia.gineco@gmail.com](mailto:sofia.gineco@gmail.com) (S.A. de Oliveira).

*Results:* patient chose to keep the pregnancy and the delivery occurred at 29 weeks without major maternal complications. Newborn evolved with good psychomotor development without sequelae.

*Conclusion:* this case report illustrates the possibility of expectant management, but we cannot ignore the fact that there is a high risk of persistent gestational trophoblastic disease. Unfortunately, the rarity of the case makes the clinical management still controversial.

© 2013 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Published by Elsevier Editora Ltda.

All rights reserved.

## Introdução

As técnicas de reprodução assistida como fertilização *in vitro* (FIV) e injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) são métodos eficazes de tratamento da infertilidade conjugal. Atualmente, cerca de 1-3% dos nascimentos são decorrentes de tais técnicas.<sup>1</sup> Infelizmente, a incidência de aborto espontâneo em gestações conduzidas por FIV é alta. Um estudo observacional retrospectivo com 2.705 mulheres com 40 anos ou mais submetidas à FIV evidenciou média de 32,6% de abortos nesses casos.<sup>2</sup>

Tal situação é atribuída ao fato de que a reprodução assistida traz um risco importante de fertilização por meio de óvulos anormais. Do mesmo modo, com a introdução da técnica de reprodução assistida também houve um aumento significativo na incidência de gestação múltipla, que, por sua vez, está associada a uma maior taxa de complicações maternas e fetais.<sup>1</sup>

A doença trofoblástica gestacional (DTG) representa um dos espectros de concepção anormal com potencial de malignidade. Alguns fatores de risco para esse tipo de patologia são conhecidos: idade materna avançada ou precoce, menarca tardia, uso prévio de anticoncepcional oral.<sup>3</sup> A reprodução assistida, por sua vez, também aumenta o risco de tal concepção.<sup>4</sup> A FIV pode causar uma fertilização multiespermática e aumentar o risco de DTG proveniente de gestação dispérmica. Em contrapartida, a ICSI pode evitar a fertilização multiespérmica. Essa técnica, associada ao diagnóstico genético pré-implantacional, vem sendo usada como estratégia de prevenção de gestações molares de repetição.<sup>1</sup>

A mola hidatiforme, derivada do vilos trofoblástico, representa a forma benigna de DTG com prognóstico favorável e pode ser classificada de duas formas com relação às diferenças citogenéticas, histopatológicas e morfológicas. A mola completa, com cariótipo diploide, tem origem exclusivamente paterna, pois nesse caso o óvulo fecundado não tem cromossomos e o cariótipo paterno está duplicado. Em 90% das vezes o cariótipo é 46XX, fruto da fertilização por espermatozoide que duplicou sua carga genética, e em 10% dos casos 46 XY, cuja fertilização ocorre por meio de dois espermatozoides.<sup>3</sup> Nessa condição, não há embrião, hemácias ou vasculatura embrionárias, membranas ou cordão umbilical e, histologicamente, ocorrem alterações uniformes, dilatações hidrópicas de todas as vilosidades placentárias e hiperplasia difusa do cito e sinciciotrofoblasto.

Na mola incompleta ou parcial o cariótipo 90% das vezes é triploide (fecundação de um óvulo por dois espermatozoides) e 10% tetraploide. Na mola parcial pode ser identificado

feto com inúmeras malformações. Microscopicamente se evidencia hiperplasia focal, que, em geral, está limitada ao sinciciotrofoblasto. Existem vilosidades normais e também alteradas e há inclusão de trofoblasto dentro do estroma.<sup>5</sup> A mola parcial costuma ter crescimento mais lento e menor risco de malignização dos vilos trofoblásticos que geram o coriocarcinoma.<sup>3</sup>

A gestação gemelar com mola hidatiforme completa que coexiste com feto vivo é um evento raro, com incidência entre 1:22.000 a 1:100.000 gestações, mas estudos têm mostrado que tal incidência vem aumentando com o uso de técnicas de reprodução assistida.<sup>3,6</sup> Tal condição ainda é um dilema com relação ao diagnóstico. Ultrassonografias de alta resolução podem não perceber alterações molares placentárias em até 40% dos casos e, muitas vezes, esse diagnóstico é feito em idade gestacional mais tardia do que em casos de mola hidatiforme isolada, quando são encontradas múltiplas imagens características e de aspecto cístico, em “flocos de neve”.<sup>5</sup>

A incidência de malformações e complicações fetais é maior em gestações com mola hidatiforme parcial. Porém, o risco de complicações maternas como pré-eclâmpsia, embolização trofoblástica, hiperêmese gravídica, sangramento vaginal, hipertireoidismo, tireotoxicose e progressão para doença trofoblástica maligna é significativamente maior na mola completa. Malhotra et al. (2001)<sup>7</sup> referem que o risco de malignização da mola completa que coexiste com feto normal é de 56% a 62% e da mola parcial com feto viável é de 4%.

O parto de um recém-nascido viável nesses casos é raro, pois a maioria resulta em aborto ou parto pré-termo extremo.<sup>5</sup> A opção de finalizar a gestação é a escolha feita na maioria das vezes por causa do risco de evolução para doença trofoblástica maligna, porém a mola hidatiforme completa, em muitos casos, está associada à idade materna avançada ou às técnicas de reprodução assistida, o que torna a decisão de finalização ainda mais difícil por causa do desejo do casal de manter a gestação.<sup>8</sup>

Existem quatro possíveis tipos de gestação que resultam na coexistência de feto vivo e gestação molar: 1) gêmeos dizigóticos com mola hidatiforme completa e feto normal (diploide com placenta normal); 2) gêmeos dizigóticos com mola hidatiforme parcial e feto normal; 3) gestação única com feto triploide e placenta molar hidatiforme parcial; e 4) gestação gemelar na qual um feto é normal diploide com placenta normal e o outro é triploide com placenta molar hidatiforme parcial.<sup>7,9</sup>

O caso relatado ilustra uma situação bastante incomum de gestação gemelar dizigótica com mola hidatiforme completa que coexiste com feto diploide e placenta normal em

uma paciente após FIV por ovodação. Trata-se de caso relevante por exemplificar o sucesso de uma conduta expectante em uma situação com alto risco de complicações. O objetivo deste relato é, portanto, evidenciar a possibilidade de conduta expectante nesses casos, por meio de um acompanhamento criterioso e diagnóstico precoce das possíveis complicações.

### Descrição do caso

Paciente de 45 anos, primigesta, na perimenopausa com dosagem de hormônio folículo estimulante (FSH) 24,5 UI/L e ciclos espaniomenorreicos, que engravidou por meio de ovodação e FIV. Durante o primeiro trimestre de gestação apresentou sangramento vaginal diário de pouca quantidade, sem alterações ultrassonográficas de comprometimento fetal. Com idade gestacional de 12 semanas foi diagnosticada gestação gemelar, com um feto morfologicamente normal, com placenta sem alterações e presença de outra placenta de aspecto molar, e não foi visualizado o segundo feto.

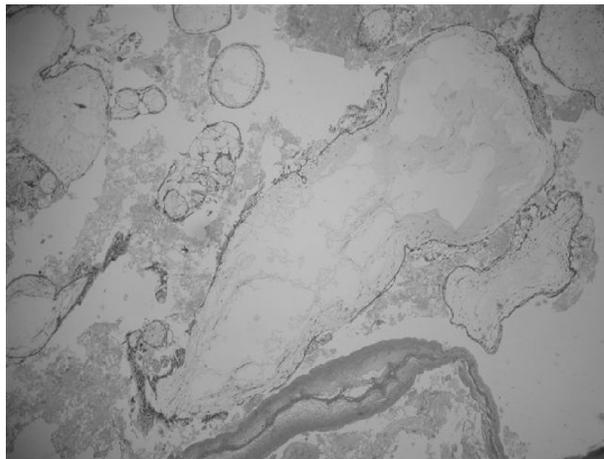
Conversou-se com os pais sobre o alto risco gestacional, tanto materno quanto fetal, e optou-se pela manutenção da gestação. O acompanhamento era feito quinzenalmente, com exames laboratoriais e ultrassonográficos que não evidenciaram alterações em morfologia, estimativa de peso, dopplerfluxometria fetal, índice de líquido amniótico ou maturidade placentária. Ao ultrassom, placenta molar sem caracterização de invasão, assim como radiografia de tórax e ultrassonografia de abdome total.

No segundo trimestre houve aumento de níveis pressóricos, posteriormente caracterizado como hipertensão gestacional transitória. Houve redução significativa dos níveis de hormônio tireoestimulante (TSH), mas os níveis de tiroxina livre não foram alterados durante toda a gestação. Feitos amniocentese e cariótipo fetal, com resultado 46XX.

Com 29 semanas a paciente entrou em trabalho de parto espontâneo e de evolução rápida. A fase ativa e expulsiva teve cerca de duas horas de duração e não houve tempo hábil para a administração de corticoterapia. A gestação foi finalizada por parto normal pélvico, com recém-nascido de sexo feminino sem malformações e peso de 1,220 Kg. Placenta de aspecto molar (fig. 1) foi enviada para estudo anatomopatológico, que



**Figura 1 – Macroscopia da placenta molar com vesículas hidrópicas.**



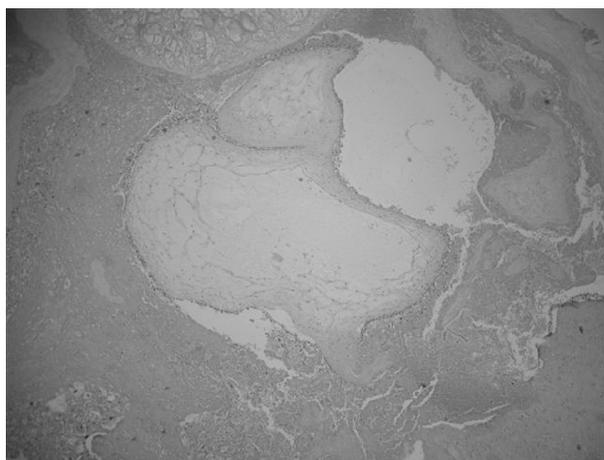
**Figura 2 – Mola hidatiforme completa que evidencia as dilatações hidrópicas das vilosidades placentárias.**

teve como laudo mola hidatiforme completa (figs. 2 e 3). Placenta de aspecto normal não evidenciou alterações molares em vilosidades (fig. 4).

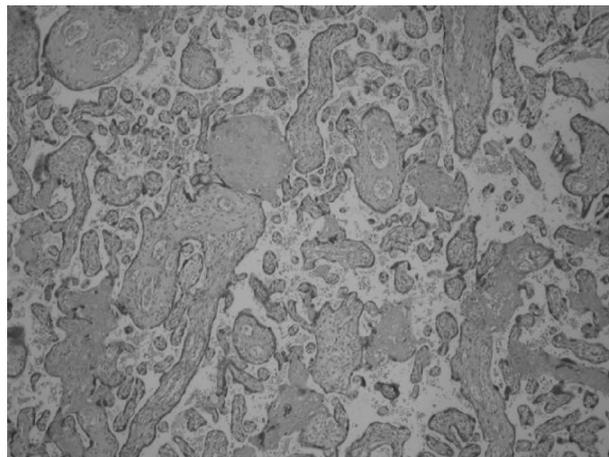
O recém-nascido necessitou de internação em unidade de cuidados intensivos por 42 dias e, após alta, teve acompanhamento fisioterápico e apresentou excelente evolução clínica. A puérpera fez dosagem seriada de  $\beta$ -HCG e, apesar de queda gradual dos seus níveis, foi submetida a curetagem uterina um mês após o parto, por causa de imagem ultrassonográfica de conteúdo endometrial sugestivo de mola residual, confirmado após novo estudo anatomopatológico. Após tal evento, exames ultrassonográficos não evidenciaram mais alterações e houve negatização dos níveis séricos de  $\beta$ -HCG.

### Discussão

A associação de mola hidatiforme completa e gestação gemelar é rara. Existem cerca de 200 casos descritos na literatura.<sup>6</sup> Desse modo, o manejo de casos como este permanece incerto, pois há o conflito entre o desejo de permanência da gestação



**Figura 3 – Mola hidatiforme completa. Intensa hiperplasia trofoblástica, dilatações vilositárias e ausência de capilares fetais.**



**Figura 4 – Placenta não molar. No terceiro trimestre da gestação com infartos vilositários, focos de calcificação distrófica e deposição intervillosa de fibrina.**

e a possibilidade de sobrevivência do feto, de 41,4% segundo Vejerslev (1991),<sup>10</sup> e o alto risco de complicações para a mãe. Assim, a maioria dos casos evolui para interrupção da gestação.<sup>3</sup>

No entanto, alguns autores defendem a manutenção da gestação com base em alguns preceitos. Há uma série de casos de 77 gestações gemelares com mola hidatiforme que evidenciam uma porcentagem de 40% de recém-nascidos normais sem aumentar risco de complicações maternas. Além disso, a maioria das complicações pode ser diagnosticada e tratada precocemente e o risco de malignização da mola hidatiforme parece não aumentar com o avançar da idade gestacional.<sup>11</sup>

No caso em questão, a decisão da paciente de continuar a gestação foi aceita, não apenas pela ultrassonografia sem alterações morfológicas, cariótipo 46XX e bom desenvolvimento fetal, mas também pela ausência de sintomas e sinais maternos significantes. Apesar de termos demonstrado um caso de gestação gemelar com mola em que a conduta expectante permitiu um bom desenvolvimento fetal, não podemos ignorar o fato de que existe um alto risco de permanência da doença trofoblástica gestacional, principalmente nos casos em que os sinais e sintomas são mais exuberantes.<sup>5</sup>

O diagnóstico de gestação gemelar nesses casos muitas vezes é tardio, pois no exame ultrassonográfico fica difícil individualizar as duas zonas placentárias distintas e a gestação gemelar com mola completa acaba sendo confundida com gestação única de mola parcial. Porém, alguns sinais e sintomas clínicos podem sugerir gestação molar, como hiperêmese, sangramento vaginal diário, eliminação de vesículas, aumento da pressão arterial, sinais de hipertireoidismo ou tireotoxicose, variação diária da altura uterina (“útero em sanfona”), níveis séricos de  $\beta$ -HCG e altura uterina maiores do que o esperado para a idade gestacional.<sup>3,4</sup>

Uma vez optado pela manutenção da gestação, amniocentese e ultrassonografia morfológica devem ser feitas para afastar a possibilidade de feto triploide ou com múltiplas malformações, situação cuja interrupção da gestação seria a opção adequada.<sup>9</sup>

Após o parto, é de fundamental importância o acompanhamento seriado do  $\beta$ -HCG por pelo menos seis meses após o esvaziamento uterino. A negatização dos níveis de  $\beta$ -HCG nos primeiros 56 dias após o procedimento caracteriza doença de baixo risco de malignização. Caso a normalização só ocorra após os primeiros 56 dias, o seguimento deve ser feito por seis meses após a negatização dos níveis de  $\beta$ -HCG. Dessa forma, há maior sucesso na prevenção secundária de malignização da DTG.<sup>12</sup>

Após o fim do acompanhamento é importante dosar o  $\beta$ -HCG seis semanas e dez semanas após cada nova gestação para descartar presença de reativação da doença trofoblástica prévia.<sup>13</sup> Também é importante a feitura de estudo anatomopatológico das placentas (molar e normal), para excluir presença de lesão neoplásica maligna já instalada,<sup>6</sup> e de radiografia de tórax, para excluir metástase pulmonar.<sup>14</sup>

Segundo Seckl et al. (2010),<sup>3</sup> as indicações de quimioterapia nos casos de DTG seriam: 1) diagnóstico histopatológico de coriocarcinoma; 2) estabilização ou aumento dos níveis de  $\beta$ -HCG após seis meses de acompanhamento; 3) sangramento vaginal intenso; 4)  $\beta$ -HCG > 20.000 UI/L quatro semanas após esvaziamento uterino; 5) evidência de metástase cerebral, hepática, gastrointestinal; ou 6) metástase pulmonar ou vaginal > 2 cm de diâmetro. Felizmente, 95% das pacientes com mola hidatiforme que desenvolvem neoplasia têm baixo risco de resistência à quimioterapia.<sup>3</sup>

Atualmente, temos apenas informações limitadas sobre as causas de maior ou menor agressividade da mola nesses casos e diversos questionamentos, principalmente em gestações oriundas de FIV. Desse modo, faz-se necessário um maior estudo sobre o tema para facilitar o manejo clínico de tais casos.

### Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

### REFERÊNCIAS

1. Yamada T, Matsuda T, Kudo M, Yamada T, Moriaki M, Nishi S, et al. Complete hydatidiform mole with coexisting dichorionic diamniotic twins following testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *J Obstet Gynaecol Res.* 2008;34(1):121-4. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1447-0756.2007.00714.x>.
2. Klipstein S, Regan M, Ryley DA, Goldman MB, Alper MM, Reindollar RH. One last chance for pregnancy: a review of 2,705 in-vitro fertilization cycles initiated in women age 40 years and above. *Fertil Steril.* 2005;84(2):435-45.
3. Seckl MJ, Sebire NJ, Berkowitz RS. Gestational trophoblastic disease. *Lancet.* 2010;376(9742):717-29. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60280-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60280-2).
4. Grenmam SE, Salmi T, Meurman L. Post-molar trophoblastic disease following coexisting molar pregnancy and living fetus subsequent to clomiphene citrate therapy. *Int J Gynecol Obstet.* 1990;32(4):381-5.
5. Chen FP. Molar pregnancy and living normal fetus coexisting until term: prenatal biochemical and sonographic diagnosis. *Hum Reprod.* 1997;12(4):853-6. <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/12.4.853>.

6. Chesnais AL, Breton F, Shisheboran MD, Huissoud C, Massardier J, Quilichini B, et al. Twin pregnancy with both complete hydatiform mole and coexistent alive fetus: report of a non-antenatal diagnosed case. *Annales de pathologie*. 2011;31(4):299-302.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.anmpat.2011.01.003>.
7. Malhotra N, Deka D, Takkar D, Kochar, Goel S, Sharma MC. Hydatiform mole with coexisting live fetus in dichorionic twin gestation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2001;94(2):301-3.
8. Vandenhove M, Amant F, Shoubroek DV, Cannie M, Dymarkowski, Hanssens M. Complete hydatiform mole with coexisting healthy fetus: a case report. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2008;21(5):341-4.  
<http://dx.doi.org/10.1080/14767050801925156>.
9. Shazly SA, Ali MK, Abdel Badee AY, Alsokkary AB, Khodary MM, Mostafa NA. Twin pregnancy with complete hydatiform mole and coexisting fetus following ovulation induction with a non-prescribed clomiphene citrate regimen: a case report. *J Med Case Rep*. 2012;6:95.  
<http://dx.doi.org/10.1186/1752-1947-6-95>.
10. Vejerslev LO. Clinical management and diagnostic possibilities in hydatiform mole with coexistent fetus. *Obstet Gynecol Surv*. 1991;46(9):577-88.
11. Sebire NJ, Foskett M, Paradina FJ, Fisher RA, Francis RJ. Outcome of twin pregnancies with complete hydatiform mole and healthy co-twin. *Lancet*. 2002;359(9324):2165-6.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09085-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09085-2).
12. Sebire NJ, Foskett M, Short D, Savage P, Stewart W, Thomson M, et al. Shortened duration of human chorionic gonadotrophin surveillance following complete or partial hydatidiform mole: evidence for revised protocol of a UK regional trophoblastic disease unit. *BJOG*. 2007;114(6):760-2.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-0528.2007.01320.x>.
13. Fisher RA, Savage PM, MacDermott C, Hook J, Sebire NJ, Lindsay I, et al. The impact of molecular genetic diagnosis on the management of women with hCG-producing malignancies. *Gynecol Oncol*. 2007;107(3):413-9.
14. Berkowitz RS, Goldstein DP. Current management of gestational trophoblastic diseases. *Gynecol Oncol*. 2009;112(3):654-62.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2008.09.005>.