

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA – CIÊNCIAS MÉDICAS

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE DOIS DIFERENTES MEIOS DE
TRANSFERÊNCIA EMBRIONÁRIA NAS TAXAS DE IMPLANTAÇÃO E GESTAÇÃO
EM PACIENTES COM IDADE AVANÇADA SUBMETIDAS À FERTILIZAÇÃO *in vitro*

Mariana Saikoski Faller

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Pandolfi Passos

Dissertação de Mestrado

2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

F194e Faller, Mariana Saikoski

Estudo comparativo entre dois diferentes meios de transferência embrionária nas taxas de implantação e gestação em pacientes com idade avançada submetidas à fertilização in vitro / Mariana Saikoski Faller ; orient. Eduardo Pandolfi Passos. – 2006.

89 f. ; il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2006.

1. Transferência embrionária 2. Gravidez 3. Fertilização in vitro 4.

Adulto 5. Meia-idade I. Passos, Eduardo Pandolfi II. Título.

NLM: WQ 208

Catalogação Biblioteca FAMED/HCPA

Aos meus pais, meu irmão, meu marido,
meu orientador, aos meus colegas de trabalho,
a todos meus amigos, com amor e carinho.
Obrigada pela paciência, incentivo,
dedicação, companheirismo e amor.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria Regina e Luiz André, por todo incentivo ao longo destes anos, por estarem sempre presentes ao meu lado, pela compreensão. A minha mãe, pelo entusiasmo, energia, alegria de vida e paixão incondicional. Ao meu pai, por toda ternura, sabedoria, companheirismo e amor. Ao meu irmão, quase um “filhote” pra mim, pelo carinho, amor, sinceridade e afeto. A toda minha família, pelo carinho e amor dedicados.

Ao meu marido, Eduardo Caberlon, pela paciência, pelo apoio, pelos puxões de orelha que me fizeram crescer ao longo destes anos, pelas conversas sempre positivas e incentivadoras, por não me deixar desistir, pelo companheirismo, amor e pelo exercício de viver o melhor de cada dia e de cada momento.

Ao meu orientador, Prof. Eduardo Passos, pelo incentivo e atenção dispensados.

Aos meus amigos, Ferdi, Andréa, Dani, Cris, Mel, Carlos, Karla, pelos momentos de desabafo, pelo apoio e paciência. Aos meus amigos e amigas que conheci na Faculdade, pela compreensão e amizade. Aos amigos do Laboratório de Biofísica da PUCRS, pelo carinho e amizade.

Aos meus colegas e amigos de trabalho da Clínica SEGIR, pela atenção e carinho, em especial a Isabel, pelo auxílio e tempo dedicado as correções e discussões.

A Tai, pelo pensamento positivo nos momentos difíceis, pela dedicação e amizade.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Citogenética do HCPA, pela oportunidade de conviver com pessoas especiais como vocês.

Ao Prof. Sharbel Weidner Maluf, pelos conhecimentos passados, pela amizade e incentivo.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Medicina Ciências Médicas, UFRGS, pela oportunidade pessoal de aprimoramento científico e desenvolvimento intelectual dentro dos mais elevados padrões exigidos pelo curso.

Finalmente a todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização desta dissertação.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
INTRODUÇÃO	12
REVISÃO DA LITERATURA	16
HISTÓRICO	16
ÁCIDO HIALURÔNICO	22
CAPACIDADE REPRODUTIVA E IDADE AVANÇADA	25
OBJETIVOS	28
OBJETIVO GERAL	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA	29
ARTIGO EM INGLÊS: "INFLUENCE OF THE HYALURONIC ACID IN THE EMBRYOS TRANFER MEDIUM ON THE IMPLANTATION RATE OF ADVANCED AGED PATIENTS"	34
ABSTRACT	34
INTRODUCTION	36
MATERIAL AND METHODS	37
OVARIAN STIMULATION	37
SELECTION OF PATIENTS	37
EVALUATION OF EMBRYOS QUALITY	38
EMBRYOS TRANSFER	38
STATISTICAL ANALYSIS	38
RESULTS	39
COMPARISON OF GROUPS WITH IMPLANTATION AND PREGNANCY RATES	39
CUMULATIVE EMBRYOS SCORE (CES)	39
MEAN SCORE OF TRANSFERRED EMBRYOS (MSTE)	40
DISCUSSION	41
REFERENCES	46
TABLES	49
FIGURES	50

ARTIGO EM PORTUGUÊS: “INFLUÊNCIA DO ÁCIDO HIALURÔNICO PRESENTE NO MEIO DE TRANSFERÊNCIA EMBRIONÁRIA NA TAXA DE IMPLANTAÇÃO EM PACIENTES COM IDADE AVANÇADA”	56
RESUMO	56
ABSTRACT	57
INTRODUÇÃO	58
MATERIAL E MÉTODOS	59
ESTIMULAÇÃO OVARIANA	59
SELEÇÃO DAS PACIENTES	59
AVALIAÇÃO DA QUALIDADE EMBRIONÁRIA	60
TRANSFERÊNCIA EMBRIONÁRIA	60
ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
RESULTADOS	61
COMPARAÇÃO DOS GRUPOS COM TAXA DE	61
IMPLANTAÇÃO E GESTAÇÃO	
ESCORE CUMULATIVO DOS EMBRIÕES (CES)	62
MÉDIA DE ESCORE DOS EMBRIÕES TRANSFERIDOS (MSTE)	62
DISCUSSÃO	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
TABELAS	72
FIGURAS	75
CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
ANEXOS	80
CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	80

LISTA DE ABREVIATURAS

AH – Ácido Hialurônico

GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofina

rAH – Albumina Humana Recombinante

HSA – Albumina Sérica Humana

FIV – Fertilização *in vitro*

ICSI – Injeção intracitoplasmática de espermatozóides

TE – Transferência Embrionária

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

LH – Hormônio Luteinizante

HCG – Gonadotrofina Coriônica Humana

SD - Standard Desviation

DP - Desvio Padrão

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados clínicos dos ciclos de transferência embrionária para os dois grupos em estudo.

Tabela 2. Resultados clínicos dos ciclos de transferência embrionária segregados em intervalos de idade para os dois grupos em estudo.

Tabela 3. Distribuição de ciclos entre os intervalos de CES para os grupos A e B.

Tabela 4. Distribuição de ciclos entre os intervalos de MSTE para os grupos A e B.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Taxa de implantação dos grupos A e B para os intervalos de CES. Grupo A (barras azuis), não demonstrou tendência linear ($P = 0,45$) e correlação ($\tau = 0,10$) entre a taxa de implantação e os intervalos de CES. O grupo B, (barras roxas), demonstrou uma tendência linear ($P < 0,02$) e correlação ($\tau = 0,17$) entre as variáveis em estudo.

Figura 2. Taxa de gestação dos grupos A e B para os intervalos de CES. Grupo A (barras azuis) e grupo B (barras roxas), ambos apresentaram tendência linear entre as variáveis em estudo, ($P < 0,01$ e $P < 0,02$, respectivamente) e correlação ($\tau = 0,39$ e $\tau = 0,36$, respectivamente).

Figura 3. Taxa de implantação dos grupos A e B para os intervalos de MSTE. Grupo A (barras azuis), não apresentou tendência linear ($P = 0,358$) e correlação ($\tau = 0,07$) entre a taxa de implantação e os intervalos de MSTE. O grupo B (barras roxas), apresentou uma tendência linear ($P < 0,004$) e correlação ($\tau = 0,26$) entre as variáveis em estudo.

Figura 4. Taxa de gestação dos grupos A e B para os intervalos de MSTE. Grupo A (barras azuis), não apresentou tendência linear ($P = 0,335$) e correlação ($\tau = 0,09$) entre a taxa de gestação e os intervalos de MSTE. O grupo B (barras roxas), apresentou uma tendência linear ($P < 0,001$) e correlação ($\tau = 0,46$) entre as variáveis em estudo.

INTRODUÇÃO

O marco inicial para o desenvolvimento das técnicas de reprodução assistida ocorreu no ano de 1978, com o nascimento do primeiro ser humano concebido através de fertilização *in vitro* (FIV), como relatado por Steptoe e Edwards (1978).

Entretanto, muitos estudos anteriores serviram de embasamento e ponto de partida para avanços e pesquisas experimentais nesta área na espécie humana (Chang, 1959; Pincus e Enzmann, 1959; Whittingham, 1968; Yanaginachi e Chang, 1963).

A partir do sucesso obtido por Steptoe e Edwards, houve uma grande expansão na utilização destas técnicas no mundo todo. Vários relatos de diferentes grupos de pesquisa em diversos centros passaram a ser publicados, muitos com alguma modificação, cujos objetivos visavam a facilitação, simplificação e diminuição de custos da técnica (Passos, 2004).

Muitos fatores contribuíram para o gradual aperfeiçoamento e conseqüente aumento nas taxas de sucesso obtidos com a aplicação das técnicas reprodução assistida. Alguns destes fatores incluem a introdução de fármacos no processo de estimulação ovariana, o desenvolvimento de diferentes métodos de aspiração folicular, o desenvolvimento de técnicas de micromanipulação de gametas e embriões, o aperfeiçoamento nas técnicas de transferência embrionária, entre outros. Ao longo deste período, a formulação química dos meios de cultura, os quais dão suporte para o crescimento embrionário *in vitro*, vêm sofrendo um contínuo desenvolvimento.

Os achados de estudos pioneiros das décadas de 40 e 50 sobre as necessidades fundamentais para o crescimento e desenvolvimento das células de mamíferos, como a possibilidade destas necessitarem de aminoácidos, vitaminas e concentrações balanceadas de sais para apresentarem um metabolismo normal, serviram de base para o desenvolvimento dos meios de cultura atuais. A melhoria nos

sistemas de cultivo é, cada vez mais, ponto crucial no desenvolvimento do processo, visando uma melhoria na qualidade e viabilidade embrionária.

Apesar do grande salto de desenvolvimento nas pesquisas na área nos últimos 25 anos, as taxas de gestação e implantação obtidas pelas pacientes com idade avançada ainda estão aquém das expectativas.

Uma problemática importante dentro das aplicações das técnicas de reprodução assistida está diretamente relacionada à postergação da gestação. Muitos casais preferem, atualmente, terem seus filhos após o estabelecimento de uma situação profissional e financeira estável. Muitas mulheres têm postergado o momento de concepção em prol da formação acadêmica e de uma carreira profissional estabelecida. Tais mudanças sócio-culturais acabam por provocar um certo impacto, aumentando a idade materna.

O aumento da idade é sabidamente reconhecido como causa de declínio da capacidade reprodutiva feminina, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Vários mecanismos vêm sendo propostos buscando um melhor entendimento para o declínio de fertilidade com o aumento da idade, sabendo-se da progressiva depleção folicular, da diminuição das funções das células da granulosa, da baixa qualidade embrionária, aumento de alterações genéticas nos oócitos e embriões e da queda da vascularização e receptividade endometrial. Algumas causas parecem estar diretamente envolvidas ao processo de implantação, como alterações genéticas e falhas na receptividade uterina, entre outras.

Em procedimentos de reprodução assistida, as taxas de gestação e implantação decrescem a partir dos 35 anos. Os resultados da aplicação das técnicas de FIV em mulheres acima de 40 anos são extremamente pobres (Dew *et al.*, 1998).

Atualmente, podemos observar, uma estagnação nas taxas de implantação e gestação. Um dos fatores dá-se pela discrepância encontrada entre o número de embriões transferidos e de embriões implantados, onde muitos embriões simplesmente falham no processo de implantação. Possivelmente uma parte desta

ineficiência possa estar relacionada ao momento da transferência embrionária (TE) (Schoolcraft *et al.*, 2001).

A TE é um momento crucial sendo a última etapa do processo de reprodução assistida. Cerca de 80% das pacientes submetidas aos procedimentos fertilização *in vitro* chegam ao estágio de TE (Human Fertilisation and Embryology Authority, 1996), entretanto, apenas uma pequena porção destas atingem a gestação.

Os constantes aperfeiçoamentos nos sistemas de cultivos despertaram, recentemente, questionamentos sobre a necessidade do desenvolvimento de meios específicos para a transferência embrionária. Schoolcraft *et al.* (2001) sugerem que a utilização de um meio mais apropriado para os embriões no momento da transferência possa oferecer vantagens ao processo de implantação.

Um candidato prospectivo para aumentar a funcionalidade do meio de transferência e possivelmente aumentar as taxas de implantação é o ácido hialurônico (AH). O AH é um mucopolissacarídeo natural e o glicosaminoglicano em maior quantidade no fluido uterino. O AH parece estar relacionado ao processo de adesão célula-célula e célula-matriz (Turley and Moore 1984), podendo apresentar este funcionamento durante os estádios iniciais de aposição e nidação do blastocisto com o endométrio. A síntese de AH aumenta substancialmente no dia em que a implantação normalmente ocorre (Carson *et al.*, 1987).

Estudos prévios em camundongos apresentaram crescimento e desenvolvimento *in vitro* bem sucedido dos embriões de camundongos quando cultivados em meio contendo AH (Gardner *et al.*, 1999) (Gardner e Lane, 2000).

Recentes estudos demonstraram que a presença de AH no meio de transferência embrionária proporcionou um aumento nas taxas de gestação e implantação de embriões de camundongos (Gardner *et al.*, 1999), e de embriões humanos (Simon *et al.*, 2003; Ludwig *et al.*, 2004).

O mecanismo relacionado ao efeito promotor do AH na implantação embrionária ainda não é claro. Entretanto, existem muitas possíveis alternativas para explicar a interação e promoção da implantação através do AH.

Muitos estudos vêm buscando agregar conhecimento e otimizar as chances de sucesso nos procedimentos de fertilização *in vitro*. A tentativa de um aumento nas taxas de gestação e implantação é um fator de grande relevância dentro da reprodução assistida, e de extrema importância para os casais envolvidos, principalmente em grupos de pacientes em declínio reprodutivo.

A utilização de um meio mais adequado para os embriões durante a transferência embrionária pode agregar ao processo um aumento nas taxas de implantação e gestação. Visando esta possibilidade, o presente estudo avaliou o possível efeito promotor da suplementação do meio de transferência embrionária com AH, no processo de implantação, direcionado a pacientes com idade avançada.

REVISÃO DA LITERATURA

HISTÓRICO

A medicina reprodutiva a partir de 1978, com o sucesso obtido por Steptoe e Edwards (1978), após o nascimento do primeiro ser humano concebido através da aplicação da fertilização *in vitro* (FIV), teve sua incursão em uma nova era de grandes mudanças. A vasta ampliação das pesquisas e da utilização das técnicas de FIV por diversos pesquisadores em diferentes centros agregou muitas modificações ao processo em prol da diminuição de custos, simplificação e disponibilização da técnica (Passos, 2004).

Este resultado não foi obtido sem estudos anteriores. Um grande número de experimentos iniciaram por volta de 1880, os quais contribuíram de maneira significativa para o sucesso da técnica. Um fator importante apresentou-se pela possibilidade de cultivo oocitário, ao final do século 19. Porém, os primeiros trabalhos em animais foram relatados a partir do início da década de 30. A descoberta da capacitação espermática em 1951 foi um dos marcos para o desenvolvimento da tecnologia de fertilização *in vitro* para diversas espécies (Austin, 1951). Estes estudos, certamente, serviram de ponto de partida para pesquisas experimentais e como embasamento para futuros avanços nesta área, na espécie humana (Pincus e Enzmann, 1937; Chang, 1959; Yanaginachi e Chang, 1963; Whittingham, 1968).

Chang (1959) relatou o nascimento do primeiro mamífero (coelho) gerado a partir da FIV. A partir dos experimentos realizados em modelos animais, surgiram os primeiros relatos de observação de oócitos humanos em seus diferentes estádios de maturação *in vitro* (Edwards, 1965). Tais estudos levaram a questionamentos quanto à possibilidade, não somente de maturação, mas também da aplicação da fertilização *in vitro*, sendo publicadas as primeiras tentativas realizadas (Edwards *et al.*, 1966; Edwards *et al.*, 1969; Steptoe e Edwards, 1970).

Neste período, diversos estudos relatavam a possibilidade de captura e posterior cultivo destes oócitos fertilizados *in vitro* em várias espécies animais, tais como, hamster (Yanaginachi e Chang, 1963); camundongos (Whittingham, 1968) e em humanos (Edwards, 1965).

Os resultados positivos obtidos a partir da fertilização e conseqüente pronucleação formando zigotos e, posteriormente, embriões permitiram a transferência destes para o interior da cavidade uterina ou de seus anexos. Toyoda e Chang (1974) realizaram experimentos em ratas, onde, após a captação dos oócitos e preparação dos espermatozóides, estes foram incubados em meio de cultura, ocorrendo fertilização *in vitro*. Neste estudo obtiveram gestações em nove de 14 receptoras com obtenção de 43 fetos nascidos, gerados a partir da fertilização *in vitro* e transferência embrionária.

Stephoe e Edwards (1976) relataram caso de estimulação com obtenção de quatro oócitos em uma mulher de 35 anos com infertilidade de causa tubária. Após a incubação dos oócitos com os espermatozóides, apenas um oócito apresentou sinais de fertilização. O mesmo foi reintroduzido no útero, resultando, porém, em uma gestação ectópica, sendo removida com 13 semanas.

Lopata *et al.* (1978) observaram a penetração espermática em oócitos, obtidos por técnica cirúrgica, em 3 e 6 horas após a inseminação *in vitro*, sendo visualizada a penetração em três e a formação de pronúcleo em seis oócitos. No mesmo ano, Steptoe e Edwards (1978) relataram o nascimento do primeiro ser humano resultante de técnica de fertilização *in vitro* e transferência embrionária de um único embrião a 8 células.

A proposta de novas maneiras de execução da punção folicular (Wood *et al.*, 1981; Lenz *et al.*, 1981) foi também um passo importante para ampliação da aplicação das técnicas de reprodução assistida.

No decorrer dos anos, foram sendo descritos estudos ressaltando as qualidades da possibilidade de utilização da ultra-sonografia como método auxiliar

para punção folicular e, nestes casos, utilizando a via transvaginal, sendo esta a de maior facilidade, com mínimo desconforto e de menor custo (Seifer *et al.*, 1988)

Com a ampliação dos conhecimentos da dinâmica folicular e do ciclo ovulatório, muitas foram às pesquisas nas áreas dos fármacos visando o desenvolvimento de protocolos de estimulação ovariana buscando a multiovulação. Com possibilidade de obtenção de um maior número de oócitos e, conseqüentemente, um maior número de embriões, vislumbrou-se uma grande possibilidade de incremento nas chances de sucesso na aplicação das técnicas.

A aplicação de protocolos de indução, com uso de gonadotrofinas, influenciou sobremaneira os protocolos que estavam sendo estabelecidos. Reconhecidamente os protocolos longos tem sido descritos como mais efetivos. A utilização de análogos agonista de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) bem como o uso de gonadotrofinas trouxe avanços consideráveis no desenvolvimento de novos protocolos de estimulação ovariana.

Atualmente a utilização da supressão do pico endógeno de hormônio luteinizante (LH) passou a ser uma necessidade nos protocolos de indução em fertilização *in vitro* (Macnamee *et al.*, 1994)

Recentemente a introdução dos análogos antagonistas possibilitou o advento de novos protocolos de estímulo. O análogos antagonistas do GnRH ligam-se de maneira competitiva aos receptores hipotalâmicos do GnRH provocando bloqueio imediato na secreção de gonadotrofinas pela hipófise (Diedrich, 1994) não ocorrendo portanto estímulo inicial na secreção de gonadotrofinas provocado pelos análogos agonistas (Felberbaum *et al.*, 2000). Quando comparados aos análogos agonistas, os antagonistas apresentam como vantagens o início rápido de ação, com bloqueio imediato da secreção de LH, diminuição do número de ampolas de gonadotrofinas necessárias para estimulação ovariana e menor incidência de efeitos adversos como síndrome de hiperestimulação (Devroey, 2000; Bouchard e Fauser, 2000).

Filicore *et al.* (1999) enfatizaram bem a necessidade de LH para adequado desenvolvimento folicular, por isso, recentemente tem se discutido os protocolos de indução em que quando a supressão hipofisária é total deva-se adequar o uso de LH. Entretanto, poucas são as evidências em relação a este aspecto e muitos são os questionamentos, principalmente pela dificuldade de adequação de desenhos experimentais para verificação da influência do LH.

Vários estudos com a utilização de FSH recombinante ou HMG não evidenciaram diferença nas taxas de gestação (Van Wely *et al.*, 2003; Gleicher *et al.*, 2003). O desenvolvimento de vários protocolos trouxe a possibilidade de multiovulação e aumento no número de oócitos, ampliando de maneira relevante os tratamentos, abrangendo principalmente problemas relacionados a fatores femininos.

Em 1992 Palermo *et al.* ampliaram as possibilidades terapêuticas do casal infértil. Com a introdução de uma nova técnica de micromanipulação de gametas o homem que era antes aliado do processo restando o uso de bancos de sêmen, passou a ser contemplado a partir deste momento. Anteriormente, não existiam alternativas para os casais na presença de problemas associados à quantidade e qualidade espermática onde a aplicação das técnicas conhecidas de fertilização *in vitro* não bastavam para proporcionar o desenvolvimento de embriões.

A possibilidade de utilização da técnica de injeção de um único espermatozóide no interior de um oócito (injeção intracitoplasmática de espermatozóide – ICSI) onde apenas alguns espermatozoides tornam-se necessários para a fertilização dos oócitos, trouxe uma ampliação na aplicação e indicações dos processos de reprodução.

Juntamente com a introdução das técnicas de micromanipulação, vislumbrou-se a possibilidade de retirada de um blastômero embrião desenvolvido *in vitro* para avaliação genética do mesmo. O diagnóstico genético pré-implantacional apresenta-se hoje como mais uma ferramenta na seleção de embriões viáveis. Entretanto, além de invasivo a aplicação do procedimento apresenta vários questionamentos éticos, entre

o tecnicamente viável e o moralmente aceito, em relação aos direitos de seleção embrionária por razões quaisquer.

Muitos fatores contribuíram para o gradual aumento nas taxas de sucesso das técnicas de reprodução assistida, ao longo dos últimos 25 anos. Durante este tempo, a formulação química dos meios de cultura, os quais dão suporte para o crescimento embrionário *in vitro*, vêm sofrendo um contínuo desenvolvimento.

A melhoria nos sistemas de cultivo passa a ser, cada vez mais, ponto crucial no desenvolvimento do processo, visando uma melhoria na qualidade e viabilidade embrionária.

Os primeiros esforços em relação a meios de culturas para suporte de embriões mamíferos foram publicados por volta de 1940 (Hammond, 1949). Neste tempo o meio de cultura era constituído basicamente por soro ou plasma sanguíneos. Estes fluidos proviam os embriões de suas necessidades físicas, químicas e nutricionais. Entretanto, o sucesso experimentado nestas condições apresentou-se reconhecidamente inferior ao esperado, principalmente sabendo-se que *in vivo* os embriões não encontram-se diretamente em contato com estes fluidos durante o trato reprodutivo.

Os achados de estudos pioneiros das décadas de 40 e 50 sobre as necessidades fundamentais para o crescimento e desenvolvimento das células de mamíferos, como a possibilidade destas necessitarem de aminoácidos, vitaminas e concentrações balanceadas de sais para apresentarem um metabolismo normal, serviram de base para o desenvolvimento dos meios de cultura atuais.

Juntamente aos aperfeiçoamentos das condições de cultivo embrionário podemos observar diversos estudos buscando melhores parâmetros para identificação de viabilidade e qualidade embrionária. A identificação e seleção de embriões com maior potencial de implantação é alvo de muitos estudos.

No processo de avaliação embrionária alguns critérios podem auxiliar na seleção dos embriões, podendo inclusive, sugerir um valor preditivo nas taxas de

gestação e implantação. Dentre os critérios de avaliação de qualidade, a morfologia do embrião parece possuir um valor preditivo para o processo de implantação (Ziebe *et al.*, 1997).

Vários sistemas de escores embrionários baseados na morfologia embrionária vêm sendo desenvolvidos buscando aprimorar e selecionar os embriões com maior viabilidade. Giorgette *et al.*, (1995) descreveram um sistema de escores para qualidade embrionária, onde obtiveram uma correlação significativa entre maiores escores e aumento nas taxas de implantação e gestação. Muitos esforços vêm sendo feitos para aprimorar estes sistemas e incluir, o maior número de parâmetros não invasivos e o mais relacionado possível com a competência embrionária.

Apesar do grande avanço tecnológico, os resultados obtidos a partir da utilização das técnicas de reprodução assistida vêm passando atualmente por um processo de estagnação. Um fator importante a ser considerado está relacionado à disparidade entre o desenvolvimento embrionário e as taxas de implantação e gestação. Muitos embriões simplesmente falham no processo de implantação, sendo o número de transferidos muito alto para compensar a baixa taxa de implantação por embrião (Edwards *et al.*, 1996).

William *et al.*, (2001), sugerem que uma parcela desta discrepância entre o sucesso do desenvolvimento embrionário *in vitro* e as baixas taxas de implantação e gestação possa estar relacionada ao momento da transferência embrionária.

A taxa de gestação após a transferência depende de diversos fatores como a qualidade embrionária, a receptividade endometrial, interação entre embrião-endométrio e a transferência propriamente dita.

A implantação embrionária do momento inicial até a nidação no tecido endometrial materno é um processo muito complexo. Este requer receptividade do endométrio, embriões funcionalmente normais até o estágio de blastocisto e com capacidade para estabelecer a comunicação entre os tecidos maternos e embrionários.

ÁCIDO HIALURÔNICO

Schoolcraft *et al.* (2001) sugerem que a utilização de um meio mais apropriado para os embriões no momento da TE pode oferecer vantagens no processo de implantação.

Estudos demonstraram que o ácido hialurônico, um mucopolissacarídeo natural, é um candidato prospectivo para aumentar a viscosidade do meio de cultura e possivelmente proporcionar o aumento das taxas de implantação.

O ácido hialurônico é um polissacarídeo extremamente longo, de alto peso molecular e de forma notavelmente viscosa. Este é um dentre o grupo de polissacarídeos, que contém hexosamina, do tecido conjuntivo, coletivamente chamados de glicosaminoglicanos (Laurent and Fraser, 1992). Os glicosaminoglicanos são heteropolissacarídeos complexos compostos por unidades repetidas de dissacarídeos, nos quais um açúcar é uma hexosamina e o outro, um açúcar neutro ou o ácido hexurônico (Meyer e Palmer, 1991) (figura 1). O ácido hialurônico diferencia-se dos outros por ser um polímero linear não sulfatado que ocorre como cadeias livres nos tecidos.

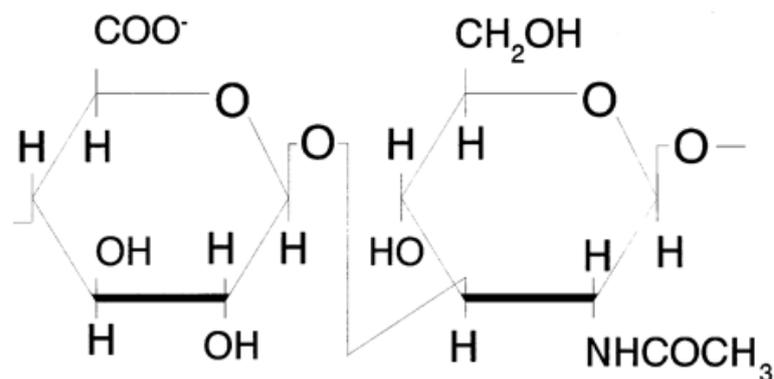


Figura 1: Estrutura química do ácido hialurônico.

O ácido hialurônico é encontrado na matriz extracelular, sendo ubiqüamente distribuído. Apresenta-se de maneira fisiológica no trato reprodutivo, sendo também o principal glicosaminoglicano presente nos fluidos foliculares, fluidos dos ovidutos e

fluidos uterinos (Lee and Ax 1984; Suchanek *et al.*, 1994; Rodriguez-Martinez *et al.*, 1998) estando presente no muco cervical, no plasma seminal, propiciando uma alta viscosidade a estes micro-ambientes. As células da granulosa e as células em expansão do complexo cumulus-oophorus secretam grandes quantidades de ácido hialurônico.

Os glicosaminoglicanos podem interagir especificamente com outros componentes da matriz extracelular, tais como colágeno, fatores de crescimento e citocinas (Iozzo, 1998). Estas interações são responsáveis pela organização estrutural da matriz extracelular, pela modulação do efeito de citocinas e regulação das interações célula-célula e célula-matriz. Tendo, portanto, um papel fundamental na matriz, podendo interferir no crescimento celular, migração, adesão, e diferenciação celular.

O ácido hialurônico também atua como um elemento estrutural e devido às suas características físico-químicas, ele tem uma participação importante na hidrodinâmica dos tecidos (Lee e Spicer, 2000). Este atua também como uma molécula sinalizadora (Lee e Spicer, 2000) na superfície celular aparentemente apresentando papel na modulação, tais como apresentação de fatores de crescimento a seus receptores primários (Woods, 2001; Relou *et al.*, 1998).

Durante o período pré-ovulatório as células do *cumulus*, as quais formam o complexo *cumulus-oophorus*, sintetizam uma grande quantidade de ácido hialurônico, o qual organiza-se entre as células formando uma matriz de muco-elástico (Salustri *et al.*, 1992)

A síntese de ácido hialurônico aumenta substancialmente no dia em que a implantação normalmente ocorre (Carson *et al.*, 1987). Em contraste com este aumento, a síntese da maioria dos outros glicosaminoglicanos permanece constante durante o estágio de peri-implantação (Zorn *et al.*, 1995). No útero de camundongos, as concentrações de AH apresentam-se aumentadas no momento da implantação.

O AH parece estar relacionado ao processo de adesão célula-célula e célula-matriz (Turley e Moore 1984), podendo apresentar este funcionamento durante os estádios iniciais de aposição e nidação do blastocisto com endométrio.

A presença do AH talvez facilite a difusão do meio de transferência na cavidade uterina. Os meios de TE contendo uma concentração apropriada do AH apresentam uma aumentada viscosidade em comparação com meios suplementados apenas com proteínas (Stojkovic *et al.*, 2002).

Receptores de AH, como CD44, podem ser encontrados tanto em embriões humanos (Campbell *et al.*, 1995) como em embriões bovinos (Valcarcel *et al.*, 1999). O receptor CD44 é expresso também em células humanas do endométrio e decídua (Behzad *et al.*, 1994), sendo expressos exclusivamente na metade da fase secretora, podendo indicar o envolvimento desta molécula no processo de implantação (Yaegashi *et al.*, 1995).

Outro receptor de AH, o RHAMM/IHABP, é também expressado pelos embriões no estágio pré-implantacional, chegando aos níveis mais elevados no estágio de blastocisto expandido (Stojkovic *et al.*, 2003).

Estudos recentes demonstraram que embriões de camundongo apresentaram crescimento e desenvolvimento *in vitro* bem sucedidos quando cultivados e transferidos em meio contendo ácido hialurônico (Gardner *et al.*, 1999) (Gardner e Lane, 2000). Estudos prévios em camundongos e humanos demonstraram que altas concentrações de AH no meio de TE aumentaram as taxas de gestação e implantação (Ludwig *et al.*, 2004; Simon *et al.*, 2003)

Hazlett *et al.* (2005) demonstraram que a utilização de AH na suplementação do meio de TE pode beneficiar pacientes com resposta ovariana normal. Estes resultados foram demonstrados para TE no terceiro e no quinto dia após a fertilização, mas sem diferenças estatisticamente significativas.

Schoolcraft *et al.* (2002) apresentaram taxas de implantação superiores nos grupos suplementados com 0,5mg/ml de AH quando comparados aos suplementados

apenas com 0,125mg/ml de AH. As taxas de gestação apresentaram um aumento, mas sem diferenças estatisticamente significativas.

O mecanismo relacionado ao efeito promotor do ácido hialurônico na implantação embrionária ainda não é claro. Entretanto, existem muitas possíveis alternativas sugeridas para explicar a interação e promoção da implantação através do ácido hialurônico.

CAPACIDADE REPRODUTIVA E IDADE AVANÇADA

A capacidade reprodutiva feminina decresce ao longo dos anos, existindo uma associação direta entre a idade avançada e a redução da fertilidade tanto *in vivo* quanto *in vitro*. O declínio gradual pode ser observado pela redução nas taxas de concepção e aumento nas taxas de abortos espontâneos. O decréscimo reprodutivo é particularmente notado a partir dos 30 anos, e mais acelerado entre os 35 e 40 anos sendo a capacidade de concepção muito reduzida a partir dos 45 anos de idade (Menken e Larsen, 1986).

Alguns estudos baseados em um grupos de pacientes que utilizaram banco de sêmen doados para inseminação artificial, demonstraram uma associação entre o declínio da fertilidade e idade materna (Schwartz e Mayaux, 1982; Ferrara *et al.*, 2002). Um estudo retrospectivo analisando 6139 ciclos de inseminação artificial, com sêmen doado, derivados de 1001 mulheres em um período de 18 anos, demonstrou que a idade é o fator determinante de maior importância na taxas de sucesso (Botchan *et al.*, 2001). Em procedimentos de fertilização *in vitro*, as taxas de gestação e implantação decrescem a partir dos 35 anos (Kenny, 1994). Os resultados da aplicação destas técnicas em mulheres acima de 40 anos são extremamente pobres (Dew *et al.*, 1998).

Jiao *et al.* (2002), dividiram 128 pacientes, entre 36 a 45 anos, em 5 grupos de acordo com a idade (36 anos, n=78; 37 anos, n=49; 38 anos, n=50; 39 anos, n=18; 40 a 45 anos, n=13), apresentando taxas de implantação (15,6%; 11,2%; 10,5%; 6,5% e

2,2%, respectivamente), gestação (24,1%; 20,55; 13,2%, 11,1% e 9,8%, respectivamente) e aborto (23,0%; 27,2%; 33,4%; 41,2% e 43,3%, respectivamente), demonstrando significativas diminuições nas taxas de implantação e gestação, com aumento significativo na taxa de aborto de acordo com a elevação da idade

Em um estudo retrospectivo recente, Wang *et al.* (2005), segregaram 1301 ciclos de fertilização *in vitro* em 5 grupos de diferentes faixas etárias (\leq 25 anos; 26 – 29 anos; 30 – 34 anos; 35 – 39 anos; \geq 40 anos), onde demonstraram que de acordo com o aumento da idade as taxas de implantação (40,8%; 39,7%; 33,7%; 29,6% e 13,9% respectivamente, $P < 0,05$) e gestação (58,2%; 60,0%; 52,3%; 45,7% e 29,4% respectivamente, $P < 0,05$) diminuem, enquanto a taxa de abortos (5,3%; 6,8%; 9,7%; 11,6% e 26,7% respectivamente) aumenta, especialmente acima dos 40 anos.

As taxas de abortos espontâneos aumentam conforma a idade e diversos grupos de pesquisa demonstraram taxas de abortos extremamente altas para pacientes com idade superior a 40 anos. Com o aumento da idade aumentam também as aneuploidias nos oócitos derivados destas pacientes (Armstrong, 2000).

O número e a qualidade dos oócitos decresce com o avanço da idade. Um dos fatores de maior influência para o desenvolvimento de maneira competente do oócito é a idade da paciente. O aumento da idade está relacionado com alterações nos oócitos, as quais podem incluir problemas na finalização da meiose e na maturação, tornando os oócitos inaptos para fertilização, alterações genéticas, deficiências citoplasmáticas podendo estas serem expressadas em diferentes estádios de desenvolvimento antes ou depois da fertilização (Armstrong, 2000).

As perdas gestacionais aparecem aumentadas para pacientes com idade avançada após a implantação até mesmo para os ciclos de pacientes participantes dos programas de doação de oócitos, onde estes são derivados de pacientes mais jovens. Isto está acompanhado de um atraso na síntese de esteróide e sugere que os mecanismos responsáveis pela formação e funcionamento da placenta no útero sejam

também afetados pela idade. A idade uterina é também um fator que pode influenciar no reduzido sucesso reprodutivo em mulheres com idade avançada (Cano *et al*,1995).

Muitas são as possíveis explicações para este decréscimo, causas como a diminuição da reserva ovariana, o aumento de alterações genéticas presentes em oócitos e embriões e falhas na receptividade uterina.

Dew *et al.* (1998) demonstraram que as taxas de gestação, fertilização e a resposta ovariana apresentaram-se diminuídas com o aumento da idade. O grupo apresentou uma taxa de abortos espontâneos de 63% para o grupo de pacientes com 40 anos ou mais e não obteve recém nascidos vivos de pacientes acima de 42 anos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Avaliar possível efeito promotor de um meio de transferência embrionária suplementado com ácido hialurônico no processo de implantação embrionária em pacientes com idade avançada.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar e comparar as taxas de implantação e gestação obtidas com meio de transferência suplementado com ácido hialurônico às taxas obtidas com meio suplementado com albumina sérica humana, em pacientes com idade avançada.
- Comparar as taxas de implantação obtidas com meio de transferência suplementado com ácido hialurônico e com meio suplementado com albumina sérica humana, considerando diferentes qualidades embrionárias, em pacientes com idade avançada.
- Comparar as taxas de gestação obtidas com meio de transferência suplementado com ácido hialurônico e com meio suplementado com albumina sérica humana, considerando diferentes qualidades embrionárias, em pacientes com idade avançada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Armstrong DT. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology* 2001; **55**: 1303-1322.
2. Austin CR. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res (B)* 1951; **4** (4): 581-596.
3. Behzad F, Seif MW, Campbell S, Aplin JD. Expression of two isoforms of CD44 in human endometrium. *Biol Reprod* 1994; **51** (4): 739-747.
4. Blake D, Svalander P, Jin M, Silversand C, Hamberger L. Protein supplementation of human IVF culture media. *J Assist Reprod Genet* 2002; **19** (3): 137-143. .
5. Botchan A, Hauser R, Gamzu R, Yogev L, Paz G, Yavetz H. Results of 6139 artificial insemination cycles with donor spermatozoa. *Hum Reprod* 2001; **16** (11): 2298-2304.
6. Bouchard P, Fauser BC. Gonadotropin-releasing hormone antagonist: new tools vs. old habits. *Fertil Steril* 2000; **73** (1): 18-20.
7. Campbell S, Swann HR, Aplin JD, Seif MW, Kimber SJ, Elstein M. CD44 is expressed throughout pre-implantation human embryo development. *Hum Reprod* 1995; **10** (2): 425-430.
8. Cano F, Simon C, Remohi J, Pellicer A. Effect of aging on the female reproductive system: evidence for a role of uterine senescence in the decline in female fecundity. *Fertil Steril* 1995; **64** (3): 584-589
9. Carson DD, Dutt A, Tang JP. Glycoconjugate synthesis during early pregnancy: hyaluronate synthesis and function. *Dev Biol* 1987; **120** (1): 228-235.
10. Chang MC. Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature* 1959; 466-467.
11. Devroey P. GnRH antagonists. *Fertil Steril* 2000; **73** (1): 15-17.
12. Dew JE, Don RA, Hughes GJ, Johnson TC, Steigrad SJ. The influence of advanced age on the outcome of assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet* 1998; **15**: 210-214.
13. Diedrich K, Diedrich C, Santos E, *et al.* Suppression of the endogenous luteinizing hormone surge by the gonadotrophin-releasing hormone antagonist Cetrorelix during ovarian stimulation. *Hum Reprod* 1994; **9**: 788-791.
14. Edwards RG, Lobo R, Bouchard P. Time to revolutionize ovarian stimulation. *Hum Reprod* 1996; **11**(5): 917-919.
15. Edwards RG. Maturation in vitro of human ovarian oocytes. *Lancet* 1965; ii: 926-929.
16. Edwards RG, Bavister BD, Steptoe PC. Early stages of fertilization of human oocytes matured in vitro. *Nature* 1969; **22**: 632-635.

17. Edwards RG, Donahue RP, Baranki TA, Jones HW. Preliminary attempts to fertilize oocytes matured in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 1966; **96**: 192-200.
18. Felberbaum RE, Albano C, Ludwig M, Riethmuller-Winzen H, Grigat M, Devroey P, Diedrich K. Ovarian stimulation for assisted reproduction with HMG and concomitant midcycle administration of the GnRH antagonist cetrorelix according to the multiple dose protocol: a prospective uncontrolled phase III study. *Hum Reprod* 2000; **15** (5): 1015-1020.
19. Ferrara I, Balet R, Grudzinskas JG. Intrauterine insemination with frozen donor sperm. Pregnancy outcome in relation to age and ovarian stimulation regime. *Hum Reprod* 2002; **17** (9): 2320-2324.
20. Filicori M, Cognigni GE, Taraborelli S, Spettoli D, Ciampaglia W, Tabrelli De Fattis C, Pocognoli P. Luteinizing hormone activity supplementation enhances follicle-stimulating hormone efficacy and improves ovulation outcome. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; **84**: 2659-2663.
21. Gardner DK, Rodriegez-Martinez H, Lane M. Fetal development after transfer is increased by replacing p rotein with the glicosaminoglycan hyaluronan for mouse embryo culture and transfer. *Hum. Reprod* 1999; **14**: 2575-2580.
22. Gardner DK, Lane M. Recombinant human serum albumin and hyaluronan can replace blood-derived albumin in embryo culture media. *Fertil Steril* 2000; **74** (Suppl.1): S31.
23. Giorgetti C, Terriou P, Auquier P, Hans E, Spach JL, Salzmann J, Roulier R. Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Hum Reprod* 1995; **10**(9):2427-31.
24. Gleicher N, Vietzke M, Vidali A. Bye-bye urinary gonadotrophins?: Recombinant FSH: A real progress in ovulation induction and IVF? *Hum. Reprod* 2003; **18**: 476-482.
25. Hammond J. Recovery and culture of tubal mouse ova. *Nature* 1949; **163**: 28-29.
26. Hazlett WD, Meyer L, Nasta T, Mangan P, Karande VC. EmbryoGlue® and its Impact on Pregnancy and Implantation Rates in Normal and Low Responding IVF Patients. *Fertility and Sterility* 2005; **84** (1): 375-376.
27. Human Fertilisation and Embryology Authority. Fifth Annual Report. Human Fertilisation and Embryology Authority. 1996, London.
28. Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 1998; **67**: 609-652.
29. Jiao Z, Zuhuang G, Xu Y, Liang X, Li L, Deng M. Influence of advanced age on the outcome of in vitro fertilization and embryo transfer. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2002; **37**(4): 223-6.[abstract]
30. Kenny DT. The impact of maternal age on clinical pregnancy and spontaneous abortion in women undergoing in vitro fertilization and gamete intra-fallopian transfer. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1994; **34** (4): 443-448.

31. Laurent TC, Fraser JR. Hyaluronan. *FASEB J* 1992; **6** (7): 2397-2404.
32. Lee CN, Ax RL. Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. *J Dairy Sci* 1984; **67** (9): 2006-2009.
33. Lee JY, Spicer AP. Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr Opin Cell Biol* 2000; **12** (5): 581-586. .
34. Lenz S, Lauritsen JG, Kjellow M. Collection of human oocyte for in vitro fertilization by ultrasonically guided follicular puncture. *Lancet* 1981; ii: 1163-1164.
35. Lopata A, McMaster R, McBain J, Johnston WI. In vitro fertilization of preovulatory human eggs. *J Reprod Fert* 1978; **52**: 339-342.
36. Ludwig M, Nitz B. Optimisation of possible success in an IVF program. *Zentralbl Gynakol* 2004; **126** (6): 368-372.
37. Macnamee MC, Howles CM, Edwards RG, *et al.* Short term luteinizing hormone-releasing agonist treatment: prospective trial of a novel ovarian stimulation regimen for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1994; **52**: 264-269.
38. Mansour RT, Aboulghar MA. Optimizing the embryo transfer technique. *Hum Reprod* 2002; **17** (5): 1149-53. .
39. Marcus SF, Brinsden PR. In-vitro fertilization and embryo transfer in women aged 40 years and over. *Hum Reprod Update* 1996; **2** (6): 459-468. .
40. Menken J, Trussell J, Larsen U. Age and infertility. *Science* 1986; **233** (4771): 1389-1394. Erratum in: *Science* 1986; **234** (5775): 413.
41. Meyer K, Palmer JW. Polysaccharide of vitreous humor. *J. Biol. Chem* 1934; **107**: 629-634.
42. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirtegehm AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into oocyte. *Lancet* 1992; **340**: 17-18.
43. Passos EP. History of assisted reproduction: lessons learnt and future challenges. s in *Gynaecological Practice* 2004; **4**: 199-202.
44. Pincus G, Enzmann EV. The growth, maturation and atresia of ovarian eggs in the rabbit. *Journal Morph* 1937: 351-383.
45. Relou IA, Damen CA, Van Der Schaft DW, Groenewegen G, Griffioen AW. Effect of culture conditions on endothelial cell growth and responsiveness. *Tissue Cell* 1998; **30** (5): 525-530.
46. Rodriguez-Martinez H, Iborra A, Martinez P, Calvete JJ. Immunoelectronmicroscopic imaging of spermadhesin AWN epitopes on boar spermatozoa bound in vivo to the zona pellucida. *Reprod Fertil* 1998; **10** (6): 491-497.

47. Salustri A, Yanagishita M, Underhill CB, Laurent TC, Hascall VC. Localization and synthesis of hyaluronic acid in the cumulus cells and mural granulosa cells of the preovulatory follicle. *Dev Biol* 1992; **151** (2): 541-51.
48. Schoolcraft WB, Gardner DK. Blastocyst culture and transfer increases the efficiency of oocyte donation. *Fertil Steril* 2000; **74** (3): 482-486.
49. Schoolcraft WB, Surrey ES, Gardner DK. Embryo transfer: techniques and variables affecting success. *Fertil Steril* 2001; **76** (5): 863-70. .
50. Schwartz D, Mayaux MJ. Female fecundity as a function of age: results of artificial insemination in 2193 nulliparous women with azoospermic husbands. *Federation CECOS. N Engl J Med* 1982; **306** (7): 404-406.
51. Seifer DB, Collins RL, Paushter DM, George CR, Quigley MM. Follicular aspiration: a comparison of an ultrasonic endovaginal transducer with fixed needle guide and other retrieval methods. *Fertil Steril* 1988; **49**: 462-467.
52. Simon A, Safran A, Revel A, Aizenman E, Reubinoff B, Porat-Katz A, Lewin A, Laufer N. Hyaluronic acid can successfully replace albumin as the sole macromolecule in a human embryo transfer medium. *Fertil Steril* 2003; **79** (6): 1434-1438.
53. Steptoe PC, Edwards RG. Laparoscopic recovery of preovulatory human oocyte after priming of ovaries with gonadotrophins. *Lancet* 1970; i: 683-689.
54. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after reimplantation of human embryo. *Lancet* 1978; i: 366.
55. Steptoe PC, Edwards RG. Reimplantation of a human embryo with subsequent tubal pregnancy. *Lancet* 1976; i: 880-882.
56. Stojkovic M, Kollé S, Peinl S, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Thompson JG, Wenigerkind H, Reichenbach HD, Sinowatz F, Wolf E. Effects of high concentrations of hyaluronan in culture medium on development and survival rates of fresh and frozen-thawed bovine embryos produced in vitro. *Reproduction* 2002; **124** (1): 141-153.
57. Stojkovic M, Krebs O, Kollé S, Prella K, Assmann V, Zakhartchenko V, Sinowatz F, Wolf E. Developmental regulation of hyaluronan-binding protein (RHAMM/IHABP) expression in early bovine embryos. *Biol Reprod* 2003; **68** (1): 60-66.
58. Suchanek E, Simunic V, Juretic D, Grizelj V. Follicular fluid contents of hyaluronic acid, follicle-stimulating hormone and steroids relative to the success of in vitro fertilization of human oocytes. *Fertil Steril* 1994; **62** (2): 347-352.
59. Toyoda Y, Chang MC. Fertilization of rat eggs in vitro by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. *J Reprod Fert* 1974; **36**: 9-22.
60. Turley E, Moore D. Hyaluronate binding proteins also bind to fibronectin, laminin and collagen. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; **121** (3): 808-814.

61. Valcarcel A, de Matos DG, Furnus CC. The hyaluronic acid receptor (CD44) expressed in bovine oocytes and preimplantational stage embryos. *Theriogenology* 1999; **51**: 193.
62. Van Wely M, Westergaard LG, Bossuyt PMM, Van der Veen F. Human menopausal gonadotropin versus recombinant follicle stimulation hormone for ovarian stimulation in assisted reproductive cycles (Cochrane). In: *The Cochrane Library*, Issue 1 2003.
63. Wang JX, Sun HX, Hu YL, Wang B, Zhang NY, Chen H. Influence of female age on the pregnancy and obstetric outcome in vitro fertilization and embryo transfer. *Zonghua Nan Ke Xue* 2005; **11**(12):900-3 [abstract]
64. Whittingham DG. Fertilization of mouse eggs in vitro. *Nature* 1968; **220**: 592-593.
65. Wood C, Leeton J, Talbot J, Mc Trounson AO. Technique for collecting mature human oocyte for in vitro fertilization. *Br J Obstet Gynecol* 1981; **88**: 756-760.
66. Woods A. Syndecans: transmembrane modulators of adhesion and matrix assembly. *J Clin Invest* 2001; **107** (8): 935-941.
67. Yaegashi N, Fujita N, Yajima A, Nakamura M. Menstrual cycle dependent expression of CD44 in normal human endometrium. *Hum Pathol* 1995; **26** (8): 862-865.
68. Yanaginachi R, Chang MC. Fertilization of hamster eggs in vitro. *Nature* 1963; **200**: 281-282.
69. Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1997; **12**(7):1545-9.
70. Zorn TM, Pinhal MA, Nader HB, Carvalho JJ, Abrahamsohn PA, Dietrich CP. Biosynthesis of glycosaminoglycans in the endometrium during the initial stages of pregnancy of the mouse. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1995; **41** (1): 97-106.

INFLUENCE OF THE HYALURONIC ACID IN THE EMBRYOS TRANSFER MEDIUM ON THE IMPLANTATION RATE OF ADVANCED AGED PATIENTS

Mariana Saikoski Faller, Taísa Mattiazzi Ferreira, Isabel Cristina Amaral de Almeida,
Paulo Augusto Peres Fagundes, Eduardo Pandolfi Passos.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effect of using an embryos transfer (ET) medium supplemented with hyaluronic acid (HA) on the implantation and pregnancy rates, as well as to compare embryo quality parameters to those rates in advanced aged patients under *in vitro* fertilization treatment.

Design: Case-control prospective non-randomized study.

Methods: This study included 128 patients were age ≥ 35 years who were under *in vitro* fertilization and ET treatment from January 2004 and June 2005. Group A had 69 cycles with ET medium supplemented with HA and Group B had 59 cycles with medium containing human serum albumin (HSA), the transferred embryos were equilibrated for 10 minutes in respective medium.

Results: There was no significant statistic difference between groups A and B concerning patients' age (38.6 ± 2.87 years vs. 38.5 ± 2.6 years), number of embryos transferred (161 vs. 157) and number of embryos transferred for each patient (2.33 ± 1.28 vs. 2.66 ± 1.17). Implantation and pregnancy rates in group A, being 19.3% and 36.2%, respectively, in group B, which had implantation rate of 14.6% and pregnancy rate of 32.2%. Comparing implantation rate and parameters of embryo quality, group B presented linear tendency for CES ($P 0.02$) and MSTE ($P 0.04$) intervals, showing a statistically significant decrease on implantation from the higher to the lower scores evaluated.

Conclusion: The medium supplemented with HA presented increase on implantation and pregnancy rates, although with no statistically significant differences. The implantation rate of the ET medium with HA presented no linear tendency related the

embryo quality; implantation was independent of embryo quality. The supplementation of HA in the ET medium presented positive effect on the implantation process for advanced aged patients.

Key Words: Hyaluronic acid, implantation, pregnancy, advanced age.

INTRODUCTION

The reproductive capability of women decreases along life and advanced age is associated to decline of fertility both *in vivo* and *in vitro*. Assisted reproduction procedures record decrease on pregnancy and implantation rates from age 35 years. The results of assisted reproduction techniques in women older than 40 years are very poor [1].

Recently, the constant improvements of the culture systems have raised questions about the need of specific means for embryos transfer. Schoolcraft *et al.* [2] suggest that the use of a more appropriate mean for embryos transfer may offer advantages to the implantation process.

Studies pointed out the hyaluronic acid (HA) as a prospective candidate to increase the performance of the transfer medium and possibly increase the implantation rates. The HA is an extremely long glycosaminoglycan with high molecular weight that is abundant in the extracellular matrix. It is also found on physiological form in the reproductive duct, being present in the cervical mucus, cumulus-oophorus complex, follicular fluid and seminal plasma [3, 4]. It is the most abundant glycosaminoglycan in the uterine fluid and seems to be related to the process of cell-cell and cell-matrix adhesion.

This study aims to evaluate the effect of using an ET medium supplemented with hyaluronic acid and recombinant human albumin on the implantation and pregnancy rates, as well as to compare embryo quality parameters to those rates in advanced aged patients.

MATERIAL AND METHODS

OVARIAN STIMULATION

The ovarian stimulation, used in patients who were at least 35 years old, started with Stradiol 4mg/day in the 20th day of the previous cycle until the second day of the cycle under consideration. From the 3rd day, recombinant follicle stimulating hormone (r-FSH) was started, followed by seriate transvaginal ultrasound control. When the follicles reached $\cong 14$ mm, analogous antagonist gonadotropin-releasing hormone (GnRH-antagonist) was administered.

When two or more follicles reached 16mm, 5000UI of human chorionic Gonadotropin (hCG) was subcutaneously administered. Transvaginal oocyte retrieval was performed 34 - 36 hours after hCH administration under ultrasound guidance. The retrieved oocytes were used for conventional *in vitro* fertilization and for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) according to previously defined criteria of sperm quality and fertilization failures. Fertilized oocytes were cultured in IVF medium (Vitrolife, Sweden) until the second day (day 2) after fertilization, when the ET were then performed.

SELECTION OF PATIENTS

This study included 128 patients who were under *in vitro* fertilization and ET treatment on the Clinic SEGIR – Serviço de Ecografia, Genética e Reprodução Humana from January 2004 and June 2005. Inclusion criteria of patients in this study were age ≥ 35 years and one or more available embryos eligible for transfer on day 2 after fertilization. Group A had 69 cycles from the first period study - September 2004 to June 2005 and group B, data from 59 cycles with ET were recorded from the second period - January 2004 to August 2004.

EVALUATION OF EMBRYOS QUALITY

Criteria for evaluation of embryos quality followed the patterns described by Terriou *et al.* [5]. The evaluation parameters were the cumulative embryo score (CES) and the mean score of transferred embryos (MSTE). Scores were based on 4 points according to embryos quality criteria, cleaved embryos were given 1 point, and 1 additional point was given for each of the following characteristics: absence of fragmentation (or fragmentation including less than 20% of the embryo), absence of abnormalities on size and form of blastocysts and embryos in 4 cells stage [5]. Maximum score for each embryo varied from 1 to 4 points. The maximum number of embryos of each patient in each transfer was 4 embryos. The CES was obtained by adding up the individual scores of transferred embryos and the MSTE was obtained by dividing the CES by the number of transferred embryos. The CES varied from 1 to 16 points and the MSTE from 1 to 4 points. In order to compare them to the implantation and pregnancy rates, the scores were separated into four intervals. Intervals of CES were 1 to 4, 5 to 8, 9 to 12 and 13 to 16 points, MSTE were $1 > 1.5$, $1.5 > 2.5$, $2.5 > 3.5$ and $3.5 \geq 4.0$ points.

EMBRYOS TRANSFER

Embryos of group A and group B were washed and equilibrated for 10 minutes in medium enriched with HA 0.5mg/ml and rHA (EmbryoGlue-Vitrolife, Sweden) before intrauterine ET. Embryos of group B were transferred with IVF medium supplemented with HSA 10% (Vitrolife, Sweden), washed and equilibrated for some minutes before the embryos transfer. The same operator carried out all laboratorial stages during the different periods. All embryos were transferred with abdominal ultrasound guidance and Wallace 1816N catheter (Smiths Medical International, United Kingdom).

Support was natural micronized progesterone via vaginal on 600mg daily dosage starting after the follicles retrieval.

Dosage of β -hCG was performed 14 days after the ET and clinical pregnancy was defined as the presence of a gestational sac on transvaginal ultrasound.

STATISTICAL ANALYSIS

The results of implantation and pregnancy rates recorded from embryos transfer in the prospective group were compared to those recorded in the retrospective

control group. The CES and MSTE were compared to the implantation and pregnancy rates in both groups. The linear tendency was evaluated for groups A and B concerning CES and MSTE related to implantation and pregnancy rates. Data are presented as mean \pm standard deviation. The results were analyzed using χ^2 test and/or *Student's T* test, or Fisher, as appropriate. Statistical significance was considered $p < 0.05$. Analyses were performed using software SPSS 11.0.

RESULTS

COMPARISON OF GROUPS WITH IMPLANTATION AND PREGNANCY RATES

Mean age in groups A and B was 38.6 years (± 2.87) and 38.5 years, respectively. Age varied from 35 to 46 years in group A and from 35 to 45 years in group B. All parameters of age, infertility cause, induction protocols and use of conventional *in vitro* fertilization (IVF) or sperm injection (ICSI) presented similar means in both groups, with no statistically significant differences. The number of transferred embryos was similar in both groups (table 1). In group A 161 embryos were transferred, in 69 cycles, resulting 25 clinical pregnancies with pregnancy rate of 36.2% and implantation rate of 19.3%. In group B 157 embryos were transferred, in 59 cycles, resulting 19 clinical pregnancies with pregnancy and implantation rates of 32.8% and 14.7%, respectively.

The implantation rate of group A was higher (31/161 gestational sacs/transferred embryos) when compared to group B (23/157 gestational sacs/transferred embryos). An increase on spontaneous abortions was also recorded in group A in comparison to group B (table 1), with no statistically significant differences.

CUMULATIVE EMBRYOS SCORE (CES)

Groups A and B had a similar distribution of CES in the intervals considered (table 2). Figure 1 evidences a linear association between the implantation rate and the

CES for group B (P 0.02), with a linear decrease on the implantation rate from the higher to the lower CES interval (P 0.02). Conversely, in group A the CES intervals show no linear tendency, evidencing maintenance of the implantation rate (figure 1). Figure 2 evidences a linear tendency between the pregnancy rate and the CES, with better rates for higher CES intervals in both groups A and B (P 0.01 and P 0.02, respectively).

MEAN SCORE OF TRANSFERRED EMBRYOS (MSTE)

Groups A and B presented a comparable distribution of MSTE in the evaluated intervals (table 3). Group A presented similar implantation (figure 3) and pregnancy (figure 4) rates in the four MSTE intervals, which means to say high implantation and pregnancy rates for all MSTE intervals and evidences the maintenance of implantation independently of embryos quality. Group B presented linear increase alongside higher MSTE values for implantation (P 0.004) and pregnancy (P <0.001) rates, with a linear decrease from higher to lower MSTE (P <0.001) in relation to the implantation rate (figure 3) as well as to pregnancy rate (figure 4).

DISCUSSION

The decrease on the reproductive capability of women along the years may be verified through the decline of fertility, both *in vivo* and *in vitro*, of advanced aged women. Studies such as Kenny's [6] and Segal and Casper's [7] with patients under *in vitro* fertilization treatment, found a close correlation with decrease of fertility from age 35 years, and Piette *et al* [8] found it from age 37 years.

This study evaluated the effect of using a medium enriched with HA and rHA 0.5mg/ml for ET in advanced aged patients. Implantation and pregnancy rates were high in the group that used HA in comparison to the group that used HSA, although there were no statistically significant differences. However, the number of gestational losses in group A was higher than in group B (no statistically significant differences), which may be due to factors related to advanced age.

The rate of children born alive from women over 40 years old under assisted reproduction techniques is very reduced, consequence of the low gestation rate and increased spontaneous abortion rate [9, 10]. Ron-El *et al* [11] found that chances of success are extremely low in patients with 41 years of age or older.

The spontaneous abortion rates increase with age and several research groups pointed out extremely high abortion rates in patients older than 40 years. Advanced aged women present low implantation and pregnancy rates and high spontaneous abortions rates, which may reach about 60% [12].

Among advanced aged patients under *in vitro* fertilization treatment, many that reach the follicular aspiration phase recruit a small number of oocytes. Together with the decline of ovarian reserve, there is an increase on the incidence of oocytes aneuploidy, which is a significant factor to the high spontaneous abortions rates found in this group of patients [13]. Age increase is directly related to the decrease on embryos quality [14, 15]. Some studies found that not only the oocytes and embryos quality but also several factors of uterine receptivity are involved on the decline of the

implantation rate and increase on the gestational losses rate recorded along with age increase [16].

The increase on the number of implanted embryos in the group supplemented with HA suggests a possible promoter effect of HA on the implantation process. The increase on the number of gestational losses in this group reflects other factors associated to age advance, being the implantation not enough to supplant these factors related to the reproductive decline.

During a randomized prospective study with patients of different ages divided into two groups, one using ET medium supplemented with HA 0.5mg/ml and other with ET medium containing HA 0.125mg/ml, the pregnancy and implantation rates for the first group were 26.6% and 11.5% and for the second group were 30.4% and 25.5% [17]. In Ravhon's study [17], the higher supplementation of HA did not increase the pregnancy and implantation rates, which were similar in both groups.

In contrast, Hazlett *et al* [18], evaluating the effect of supplementing the ET medium with HA in patients with normal ovarian response divided into groups with ET on the third and fifth day, recorded better pregnancy and implantation rates in groups supplemented with HA. The pregnancy and implantation rates were increased with presence of HA in the ET medium for both ET moments, although there were no statistically significant differences.

Gardner *et al*'s [19] study with mouse demonstrated increase on implantation and fetal development of embryos with presence of HA in the TE medium, which suggests regulation of HA on the interaction process between embryo and endometrium.

Simon *et al* [20] demonstrated that HA might substitute albumin in the TE medium used for human embryos, providing comparatively increased pregnancy and implantation rates.

This study demonstrated that the presence of HA in the TE medium provided similar implantation rates for embryos with different embryo quality when compared to

the medium with HSA. In the group supplemented with HA the implantation was independent of the embryo quality in comparison to the TE medium with HSA, which presented a linear association between the parameters evaluating quality and implantation rate. These data suggest a promoter effect of HA on the embryo implantation process, providing to embryos better implantation rates regardless the embryos quality, which improves conditions of the implantation process. The group with medium containing HSA presented low implantation rates to low quality embryos and increase on implantation rates along with the embryos quality increase.

Terriou *et al.*'s [5] study found a strong correlation for CES and MSTE with the pregnancy rate. In this study, a linear tendency may be observed between the CES and the pregnancy rate in both groups; however, the MSTE did not follow a linear tendency together with the embryos quality for the group supplemented with HA, presenting maintenance of pregnancy rate for the different intervals evaluated.

Terriou *et al* [5] demonstrated decrease on the pregnancy rate in patients older than 38 years for all the intervals of MSTE evaluated in comparison to patients aged 37 years or younger. They observed a MSTE distribution in the group of at least 38 years old patients similar to that found in groups of younger patients, which shows that embryos quality is independent of the patient's age. They suggest that the decrease on the pregnancy rates of advanced aged patients is not related to the embryos quality, but to the decline on uterine receptivity.

There are many possible mechanisms through which the HA may present a promoter effect on the implantation process. The HA is free in the extracellular matrix and involved on the matrix formation, cell-cell and cell-matrix adhesion process and cell proliferation and migration, besides presenting co-receptors for growth factors [21, 22, 20]; it may also be somehow related to the initial process of interaction, aposition, adhesion and invasion of the blastocyst in endometrium.

The HA is the main glycosaminoglycan in the follicular and uterine fluids, as well as in the oviduct fluids [23, 24, 25], providing high viscosity to these microenvironments. The presence of HA may possibly facilitate the fast diffusion of content in the transfer medium inside the uterine cavity. A medium containing a given concentration of HA presents higher viscosity than ET mediums containing only proteins [26]

The synthesis of hyaluronic acid largely increases on the day when implantation normally happens [27]. In contrast to this increase, the synthesis of most other glycosaminoglycans remains constant during the peri-implantation stage [28].

The expression of receptors for HA in endometrium cells and human and mammals in general embryos [29, 30, 31] suggests a possible function of the HA in the embryos implantation process. The expression of CD44, a HA receptor, in embryos and endometrium and decidual cells [32], indicates a possible involvement of this molecule on the implantation process [33]. The HA may also take part on the synthesis of other glycosaminoglycans or on the communication with growth factors [22].

Other kind of HA receptor, RHAMM/IHABP, is expressed by the embryo during the peri-implantation stage, and presents higher levels in the expanded blastocyst stage [34].

The mechanism involved on the embryo implantation related to the hyaluronic acid is not clear yet. The mechanism through which the HA, when transferred together with embryos on initial development stages, may be still present to promote or help on the implantation process during the blastocyst hatching [35] is still unknown.

The presence of HA in the transfer medium is possibly more important in more advanced stages of embryo development, when the expression of specific receptors for the HA is increased and the signaling between blastocyst and endometrium is most crucial.

This study demonstrated that the supplementation of the ET medium with HA provided increase on the implantation and pregnancy rates of advanced aged patients, although there were no statistically significant differences. On evaluating the parameters of transferred embryos quality and implantation rate, the ET medium supplemented with HA kept rates independently of embryos quality, suggesting better embryo-endometrium interaction.

The presence of HA in the ET medium improving the conditions of the embryo implantation process may optimize the chances of embryos implantation. This possibility may help to reduce the number of transferred embryos without decrease of pregnancy and implantation rates and, parallelly, avoid multiple pregnancies, mainly in groups of younger patients.

Randomized prospective studies, designed to specific groups, with supplementation of the ET medium with HA for embryos in more advanced stages of embryo development may reveal optimization of pregnancy and implantation results.

REFERENCES

1. Dew JE, Don RA, Hughes GJ, Johnson TC, Steigrad SJ. The influence of advanced age on the outcome of assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet* 1998;15:210–4.
2. Schoolcraft WB, Surrey ES, Gardner DK. Embryo transfer: techniques and variables affecting success. *Fertil Steril* 2001;76(5):863-70.
3. Eppig JJ. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature*. 1979 Oct 11;281(5731):483-4.
4. Binette JP, Ohishi H, Burgi W, Kimura A, Suyemitsu T, Seno N, Schmid K. The content and distribution of glycosaminoglycans in the ejaculates of normal and vasectomized men. *Andrologia*. 1996 May-Jun;28(3):145-9.
5. Terriou P, Sapin C, Giorgetti C, Hans E, Spach JL, Roulier R. Embryo score is a better predictor of pregnancy than the number of transferred embryos or female age. *Fertil Steril* 2001;75(3):525-31.
6. Kenny DT. The impact of maternal age on clinical pregnancy and spontaneous abortion in women undergoing in vitro fertilization and gamete intra-fallopian transfer. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1994 ;34(4):443-8.
7. Segal S, Casper RF. The response to ovarian hyperstimulation and in-vitro fertilization in women older than 35 years. *Hum Reprod* 1990;5(3):255-7.
8. Piette C, de Mouzon J, Bachelot A, Spira A. In-vitro fertilization: influence of women's age on pregnancy rates. *Hum Reprod* 1990;5(1):56-9.
9. Wood C, Calderon I, Crombie A. Related Articles, Links Age and fertility: results of assisted reproductive technology in women over 40 years. *J Assist Reprod Genet* 1992;9(5):482-4.
10. Abdalla HI, Burton G, Kirkland A, Johnson MR, Leonard T, Brooks AA, Studd JW. Age, pregnancy and miscarriage: uterine versus ovarian factors. *Hum Reprod* 1993;8(9):1512-7.
11. Ron-El R, Raziel A, Strassburger D, Schachter M, Kasterstein E, Friedler S. Outcome of assisted reproductive technology in women over the age of 41. *Fertil Steril* 2000;74(3):471-5.
12. Marcus SF, Brinsden PR. In-vitro fertilization and embryo transfer in women aged 40 years and over. *Hum Reprod Update* 1996;2(6):459-68.
13. Richardson SJ, Nelson JF. Follicular depletion during the menopausal transition. *Ann. N.Y. Acad Sci* 1990; 592:13–20.

14. Chetkowski RJ, Rode RA, Burruel V, *et al.* The effect of pituitary suppression and the woman's age on embryo viability and uterine receptivity. *Fertil Steril* 1991;56:1095–1103.
15. Hull MG, Fleming C, Hughes A, *et al.* The age related decline in female fecundity: a quantitative controlled study of implanting capacity and survival of individual embryos after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1996;65:783–790.
16. Navot D, Bergh PA, Williams MA, *et al.* Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fecundity. *Lancet* 1991;337:1375–1377.
17. Ravhon A, Nahum H, Weissman A, Biran G, Umansky N, Levrán D. Embryo Transfer in Hyaluronan Enriched Transfer Medium Does Not Improve Pregnancy Rate in IVF Program. *Fertil Steril* 2005;84(Suppl 1):P-619.
18. Hazlett WD, Meyer L, Nasta T, Mangan P, Karande VC. EmbryoGlue® and its Impact on Pregnancy and Implantation Rates in Normal and Low Responding IVF Patients. *Fertil Steril* 2005;84 (Suppl 1):S375-S376
19. Gardner DK, Rodrigez-Martinez H, Lane M. Fetal development after transfer is increased by replacing p rotein with the glicosaminoglycan hyaluronan for mouse embryo culture and transfer. *Hum. Reprod* 1999; 14: 2575-80.
20. Simon A, Safran A, Revel A, Aizenman E, Reubinoff B, Porat-Katz A, Lewin A, Laufer N. Hyaluronic acid can successfully replace albumin as the sole macromolecule in a human embryo transfer medium. *Fertil Steril* 2003; 79(6):1434-8.
21. Turley E, Moore D. Hyaluronate binding proteins also bind to fibronectin, laminin and collagen. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984;29;121(3):808-14.
22. Sato E, Tanaka T, Takeya T, Miyamoto H, Koide SS Ovarian glycosaminoglycans potentiate angiogenic activity of epidermal growth factor in mice. *Endocrinology.* 1991;128(5):2402-6.
23. Lee CN, Ax RL. Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. *J Dairy Sci.* 1984 Sep;67(9):2006-9.
24. Suchanek E, Simunic V, Juretic D, Grizelj V. Follicular fluid contents of hyaluronic acid, follicle-stimulating hormone and steroids relative to the success of in vitro fertilization of human oocytes. *Fertil Steril.* 1994 Aug;62(2):347-52.
25. Rodriguez-Martinez H, Iborra A, Martinez P, Calvete JJ. Immunoelectronmicroscopic imaging of spermadhesin AWN epitopes on boar spermatozoa bound in vivo to the zona pellucida. *Reprod Fertil Dev.* 1998;10(6):491-7.

26. Stojkovic M, Kolle S, Peinl S, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Thompson JG, Wenigerkind H, Reichenbach HD, Sinowatz F, Wolf E. Effects of high concentrations of hyaluronan in culture medium on development and survival rates of fresh and frozen-thawed bovine embryos produced in vitro. *Reproduction*. 2002;124(1):141-53.
27. Carson DD, Dutt A, Tang JP. Glycoconjugate synthesis during early pregnancy: hyaluronate synthesis and function. *Dev Biol* 1987;120(1):228-35.
28. Zorn TM, Pinhal MA, Nader HB, Carvalho JJ, Abrahamsohn PA, Dietrich CP. Biosynthesis of glycosaminoglycans in the endometrium during the initial stages of pregnancy of the mouse. *Cell Mol Biol* 1995 Feb;41(1):97-106.
29. Furnus CC, Valcarcel A, Dulout FN, Errecalde AL. The hyaluronic acid receptor (CD44) is expressed in bovine oocytes and early stage embryos. *Theriogenology* 2003;60(9):1633-44.
30. Campbell S, Swann HR, Aplin JD, Seif MW, Kimber SJ, Elstein M. CD44 is expressed throughout pre-implantation human embryo development. *Hum Reprod*. 1995 Feb;10(2):425-30.
31. Valcarcel A, de Matos DG, Furnus CC. The hyaluronic acid receptor (CD44) expressed in bovine oocytes and preimplantational stage embryos. *Theriogenology* 1999 51:193 (abstract)
32. Behzad F, Seif MW, Campbell S, Aplin JD. Expression of two isoforms of CD44 in human endometrium. *Biol Reprod*. 1994 Oct;51(4):739-47.
33. Yaegashi N, Fujita N, Yajima A, Nakamura M. Menstrual cycle dependent expression of CD44 in normal human endometrium. *Hum Pathol* 1995;26(8):862-5.
34. Stojkovic M, Krebs O, Kolle S, Prella K, Assmann V, Zakhartchenko V, Sinowatz F, Wolf E. Developmental regulation of hyaluronan-binding protein (RHAMM/IHABP) expression in early bovine embryos. *Biol Reprod* 2003;68(1):60-6.
35. Correa-Perez, JR. Embryo transfer medium-hyaluronic acid in place of albumin? [letter]. *Fertil Steril* 2004;81(4):1157.

TABLES

Table 1. Clinical outcome of embryo transfers in study groups A and B.

	Group A (n = 69)	Group B (n = 59)	P
Patient's Age	38,6 ± 2,87	38,5 ± 2,6	0,842
Embryos Transferred	161	157	-
Embryos/Transfers	2,33 ± 1,28	2,66 ± 1,17	0,135
Clinical Pregnancies	25	19	0,837
Singleton	20	16	
Twin	5	3	
Miscarriage	14	9	0,611
Clinical Pregnancy Rate (%)	25/69 (36,2%)	19/57 (32,2%)	0,771
Implantation Rate (%)	31/161 (19,3%)	23/157 (14,6%)	0,345

Note: Values are mean ± SD.

Group A = Hyaluronic acid

Group B = Human Serum Albumin

Table 2. Distribution of embryo transfers groups A and B in the CES intervals.

CES	Group A	Group B
1 a 4	32 (46,4%)	21 (35,6%)
5 a 8	17 (24,6%)	14 (23,7%)
9 a 12	12 (17,4%)	15 (25,4%)
13 a 16	8 (11,6%)	9 (15,3%)
Cycles	69 (100%)	59(100%)

P 0,532

Group A = Hyaluronic acid;

Group B = Human Serum Albumin.

Table 3. Distribution of embryo transfers groups A and B in the MSTE intervals.

MSTE	Grupo A	Grupo B
	AH	IVF
1 >1,5	9 (13,0%)	6 (10,2%)
1,5 > 2,5	15 (21,7%)	16 (27,1%)
2,5 > 3,5	25 (36,2%)	21 (35,6%)
3,5 ≥ 4,0	20 (29,0%)	16 (27,1%)
Cycles	69 (100%)	59(100%)

P 0,886

Group A = Hyaluronic acid;

Group B = Human Serum Albumin.

FIGURES

Figure 1. Implantation rate in group A and B for CES intervals. Group A (blue bars) the CES intervals show no linear association ($P = 0,45$) and correlation ($\tau = 0,10$) with the implantation rate. Group B (purple bars) evidences a linear association ($P < 0.02$) and correlation ($\tau = 0,17$) between the implantation rate and the CES.

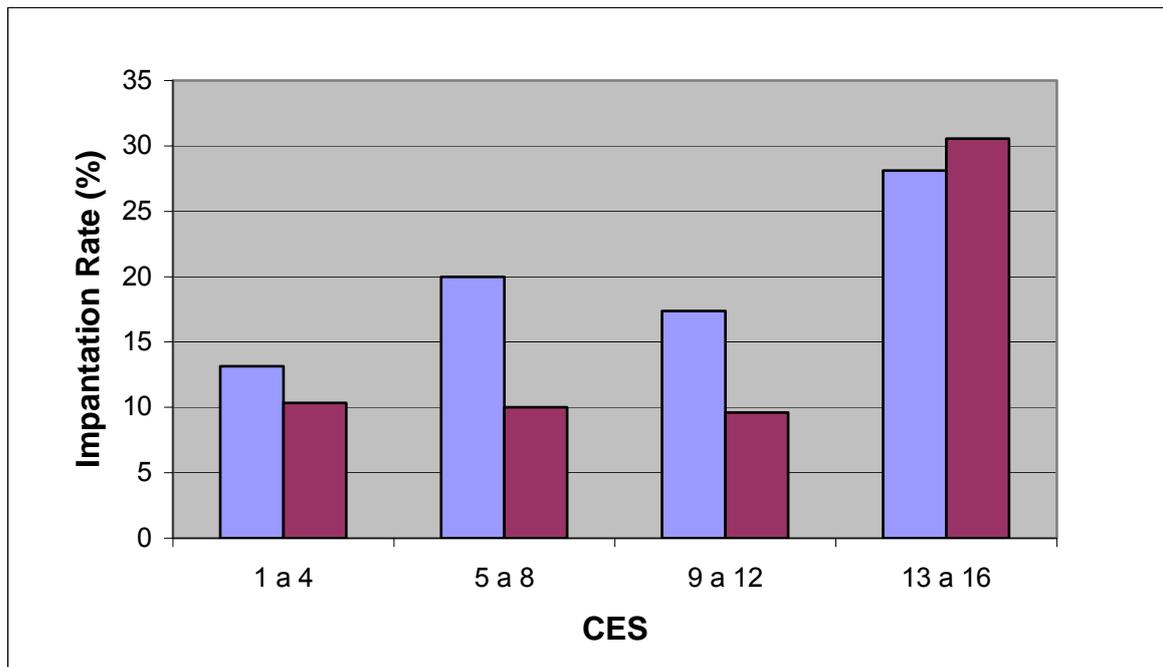


Figure 2. Pregnancy rate in group A and B for CES intervals. Group A (blue bars) and group B (purple bars) evidences a linear association between the implantation rate and the CES ($P < 0.01$ e $P < 0.02$, respectively) and correlation ($\tau = 0,39$ e $\tau = 0,36$, respectively).

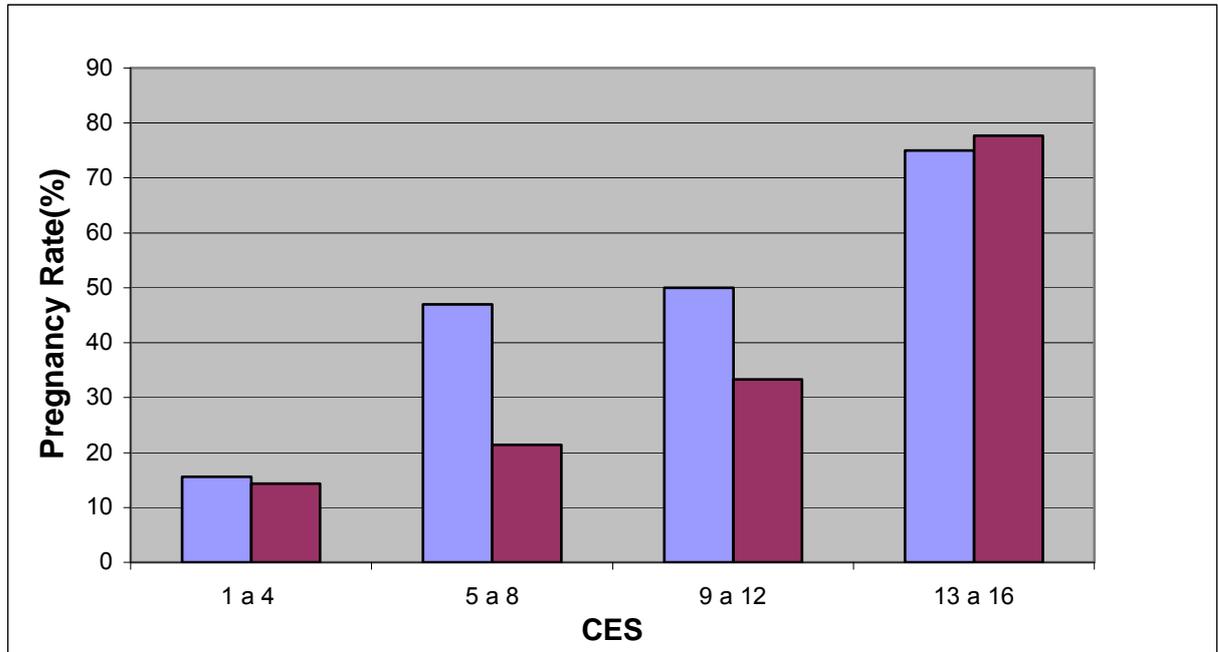


Figure 3. Implantation rate in group A and B for MSTE intervals. Group A (blue bars) show no linear association ($P = 0,358$) and correlation ($\tau = 0,07$) with the MSTE intervals and implantation rate. Group B (purple bars) evidences a linear association ($P < 0,004$) and correlation ($\tau = 0,26$) between the implantation rate and the MSTE.

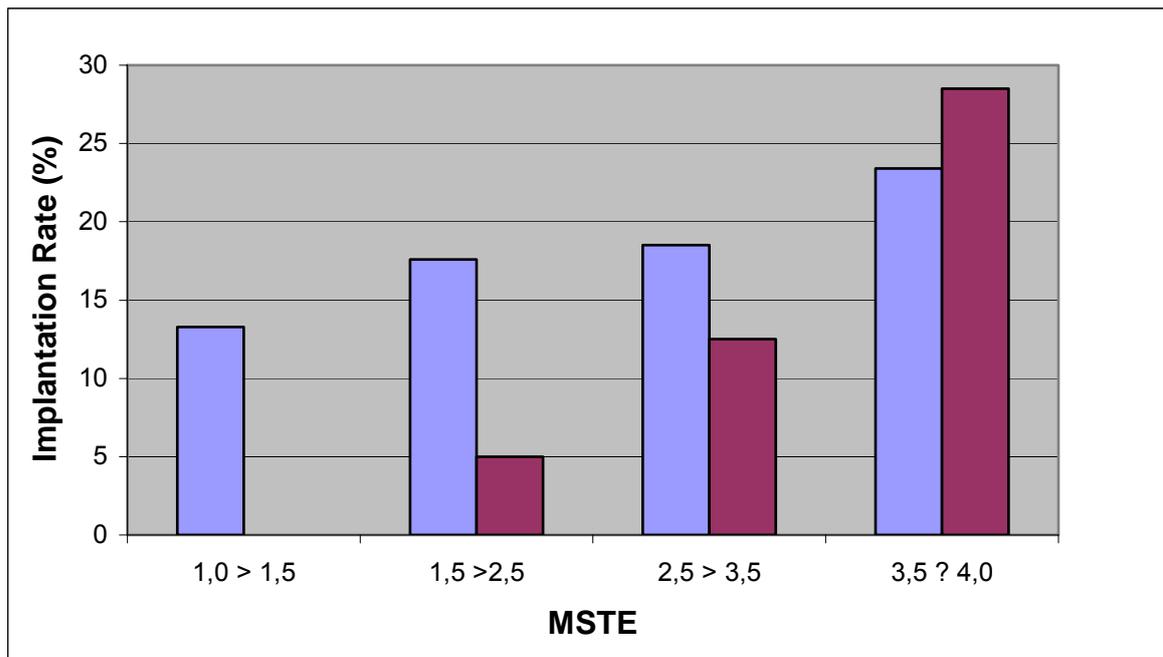
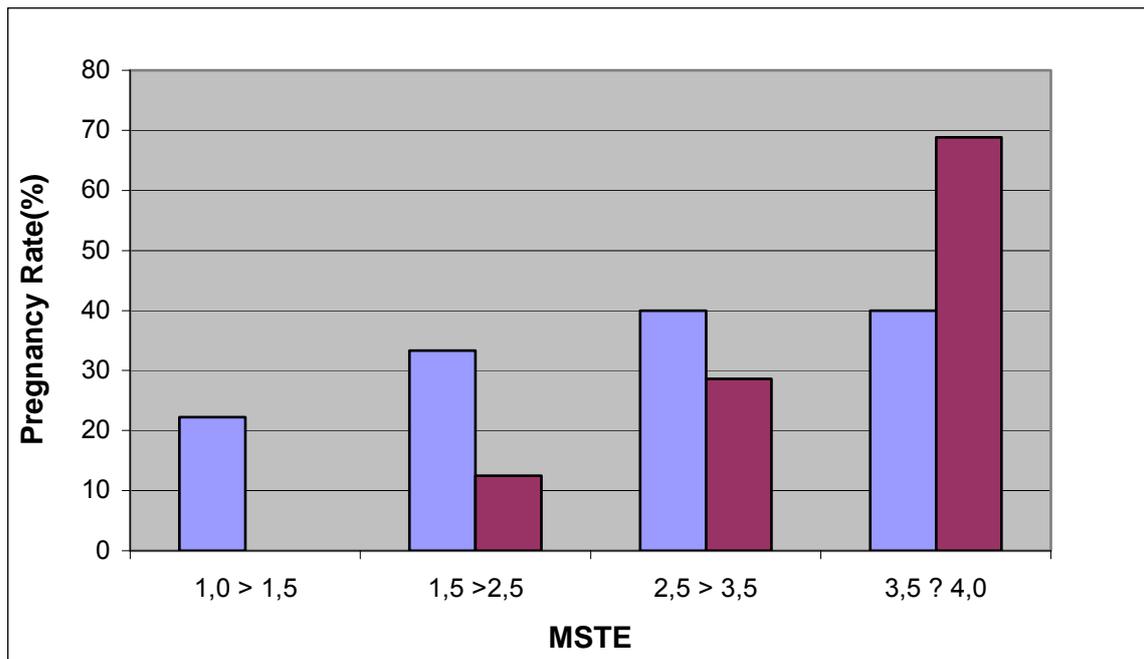


Figure 4. Pregnancy ate in group A and B for MSTE intervals. Group A (blue bars) show no linear association ($P = 0,335$) and correlation ($\tau = 0,09$) with the MSTE intervals and pregnancy rate. Group B (purple bars) evidences a linear association ($P < 0,001$) and correlation ($\tau = 0,46$) between the pregnancy rate and the MSTE.



INFLUÊNCIA DO ÁCIDO HIALURÔNICO PRESENTE NO MEIO DE TRANSFERÊNCIA EMBRIONÁRIA NA TAXA DE IMPLANTAÇÃO EM PACIENTES COM IDADE AVANÇADA

Mariana Saikoski Faller, Taísa Mattiazzi Ferreira, Isabel Cristina Amaral de Almeida, Paulo Augusto Peres Fagundes, Eduardo Pandolfi Passos.

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito de um meio para transferência embrionária (TE), suplementado com ácido hialurônico (AH), nas taxas de implantação e gestação, comparando parâmetros de qualidade embrionária a estas em pacientes com idade avançada submetidas à fertilização *in vitro*.

Delineamento: Ensaio clínico prospectivo não randomizado.

Métodos: Foram incluídas 128 pacientes, com idade ≥ 35 anos e embriões para TE, no período de janeiro de 2004 a junho de 2005. Os 128 ciclos obtidos foram divididos em, grupo A, 69 ciclos (meio com AH) e grupo B, 59 ciclos (meio com albumina sérica humana - HSA) equilibrados por 10 minutos para TE.

Resultados: Foram similares, média de idade nos grupos A e B ($38,6 \pm 2,87$ vs. $38,5 \pm 2,6$ anos), embriões transferidos (161 vs. 157) e embriões transferidos/paciente ($2,33 \pm 1,28$ vs. $2,66 \pm 1,17$). As taxas de implantação e gestação foram superiores para o grupo A (19,3% e 36,2%) respectivamente, comparadas ao grupo B (14,6% e 32,2%). O grupo B apresentou uma tendência linear para os intervalos de CES ($P 0,02$) e MSTE ($P 0,04$) com decréscimo na Taxa de implantação dos maiores para os menores escores avaliados.

Conclusão: O meio com AH apresentou uma elevação nas taxas de implantação e gestação, sem diferenças estatisticamente significativas. O grupo com AH apresentou uma manutenção da Taxa de implantação independente da qualidade embrionária, indicando um possível efeito positivo no processo de implantação em pacientes com idade avançada.

Palavras-chave: Ácido hialurônico, implantação, gestação, idade avançada.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effect of using an embryos transfer (ET) medium supplemented with hyaluronic acid (HA) on the implantation and pregnancy rates, as well as to compare embryo quality parameters to those rates in advanced aged patients under *in vitro* fertilization treatment.

Design: Case-control prospective non-randomized study.

Methods: This study included 128 patients were age ≥ 35 years who were under *in vitro* fertilization and ET treatment from January 2004 and June 2005. Group A had 69 cycles with ET medium supplemented with HA and Group B had 59 cycles with medium containing human serum albumin (HSA), the transferred embryos were equilibrated for 10 minutes in respective medium.

Results: There was no significant statistic difference between groups A and B concerning patients' age (38.6 ± 2.87 years vs. 38.5 ± 2.6 years), number of embryos transferred (161 vs. 157) and number of embryos transferred for each patient (2.33 ± 1.28 vs. 2.66 ± 1.17). Implantation and pregnancy rates in group A, being 19.3% and 36.2%, respectively, in group B, which had implantation rate of 14.6% and pregnancy rate of 32.2%. Comparing implantation rate and parameters of embryo quality, group B presented linear tendency for CES ($P 0.02$) and MSTE ($P 0.04$) intervals, showing a statistically significant decrease on implantation from the higher to the lower scores evaluated.

Conclusion: The medium supplemented with HA presented increase on implantation and pregnancy rates, although with no statistically significant differences. The implantation rate of the ET medium with HA presented no linear tendency related the embryo quality; implantation was independent of embryo quality. The supplementation of HA in the ET medium presented positive effect on the implantation process for advanced aged patients.

Key Words: Hyaluronic acid, implantation, pregnancy, advanced age.

INTRODUÇÃO

A capacidade reprodutiva feminina decresce ao longo dos anos e a idade avançada está associada à redução da fertilidade tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Em procedimentos de reprodução assistida, as taxas de gestação e implantação diminuem a partir dos 35 anos, e são extremamente pobres em mulheres acima de 40 anos [1].

Os constantes aperfeiçoamentos nos sistemas de cultivos despertaram, recentemente, questionamentos sobre a necessidade do desenvolvimento de meios específicos para a transferência embrionária. Schoolcraft *et al.* [2] sugerem que a utilização de um meio mais apropriado para os embriões no momento da transferência possa oferecer vantagens ao processo de implantação.

Estudos demonstraram que um candidato prospectivo para aumentar a funcionalidade do meio de TE e possivelmente aumentar as taxas de implantação é o ácido hialurônico (AH). O AH é um glicosaminoglicano, encontrado em abundância na matriz extracelular. Apresenta-se de maneira fisiológica no trato reprodutivo, estando presente no muco cervical, no complexo cumulus-oophorus, no fluido folicular, e no plasma seminal [3,4]. É o glicosaminoglicano em maior quantidade no fluido uterino e parece estar relacionado ao processo de adesão célula-célula e célula-matriz.

Este estudo tem o objetivo de avaliar o efeito da utilização de um meio para TE, acrescido de ácido hialurônico e albumina humana recombinante, nas taxas de gestação e implantação, assim como comparar parâmetros de qualidade dos embriões transferidos a estas taxas em mulheres com idade avançada.

MATERIAL E MÉTODOS

ESTIMULAÇÃO OVARIANA

A estimulação ovariana utilizada em ambos os grupos iniciou-se com 4mg de estradiol no 20º dia do ciclo anterior até o segundo dia do ciclo em questão. A partir do 3º dia iniciava-se a aplicação de hormônio Folículo Estimulante recombinante, seguida de controle ecográficos seriados, sendo introduzido análogo antagonista de hormônio liberador de gonadotrofina quando os folículos atingiam \cong 14mm.

A administração de 5000UI de Gonadotrofina coriônica humana (hCG) subcutânea ocorreu quando dois ou mais folículos atingiram o diâmetro de 16mm. As aspirações foliculares foram realizadas 34 - 36 horas após a administração do hCG. Os oócitos foram direcionados tanto para fertilização *in vitro* convencional como para injeção intra-citoplasmática de espermatozóide, de acordo com critérios prévios de qualidade seminal e falhas de fertilização, sendo em meio IVF (Vitrolife, Suécia) até o segundo dia após a fertilização, quando ocorreram as TEs.

SELEÇÃO DAS PACIENTES

Foram incluídas 128 pacientes, correspondentes a 128 ciclos, submetidas à fertilização *in vitro* e TE na Clínica SEGIR – Serviço de Ecografia, Genética e Reprodução Humana, no período de janeiro de 2004 a junho de 2005. Critérios de inclusão: idade igual ou superior a 35 anos e um ou mais embriões para transferência no segundo dia após a fertilização. Grupo A, formado por 69 ciclos realizados no período de setembro de 2004 a junho de 2005 e o grupo B, por 59 ciclos entre janeiro de 2004 a agosto de 2004.

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE EMBRIONÁRIA

Os critérios para avaliação da qualidade embrionária seguiram os padrões descritos por Terriou *et al.* [5]. Os parâmetros de avaliação utilizados foram, o escore cumulativo dos embriões (CES) transferidos e a média de escores dos embriões transferidos (MSTE). O escore baseava-se em 4 pontos, de acordo com critérios de qualidade embrionária, sendo um ponto para cada critério: embriões clivados, ausência de fragmentação (ou fragmentação >20% do embrião), ausência de irregularidades no tamanho ou formato dos blastômeros e embriões no estágio de 4 células [5], permitindo para cada embrião uma variação de 1 a 4 pontos. O número máximo de embriões/transferência foi de 4 embriões. O CES foi obtido através da soma dos escores individuais dos embriões transferidos e o MSTE obtido a partir da divisão do CES pelo número de embriões transferidos. O CES variou de 1 a 16 pontos e o MSTE de 1 a 4 pontos. Para comparação com as taxas de implantação e gestação os escores foram segregados em quatro intervalos. O CES em intervalos de 1 a 4, de 5 a 8, de 9 a 12, de 13 a 16 pontos e o MSTE, de $1 > 1,5$; de $1,5 > 2,5$; $2,5 > 3,5$; e $3,5 \geq 4,0$ pontos.

TRANSFERÊNCIA EMBRIONÁRIA

Em ambos os grupos os embriões permaneceram em equilíbrio de 10 minutos nos respectivos meios antes da TE. O meio suplementado com 0,5 mg/ml de AH e rAH (EmbryoGlue -Vitrolife, Suécia) foi utilizado no grupo A e no grupo B o meio IVF com 10% de HSA (Vitrolife, Suécia). Todas as etapas laboratoriais foram realizadas pelo mesmo operador durante os diferentes períodos. Todos os embriões foram transferidos com visualização e auxílio de ultra-som abdominal e cateter Wallace 1816N (Smiths Medical International, Reino Unido).

Foi utilizado de suporte a progesterona natural micronizada via vaginal, na dose diária de 600mg, a partir da punção folicular.

A dosagem de β -hCG ocorreu 14 dias após a TE e foram definidas como gestações clínicas todas aquelas com presença de saco gestacional visualizado por ultra-som transvaginal.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das taxas de implantação e gestação obtidas a partir das transferências embrionárias do grupo A foram comparados aos resultados do grupo B. Os CES e MSTE foram comparados às taxas de implantação e gestação em ambos os grupos. A tendência linear foi avaliada para o grupo A e B em relação ao CES e ao MSTE para Taxas de implantação e gestação. Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão. Para análise dos resultados utilizamos o teste qui-quadrado (χ^2) e/ou teste T de *Student*, ou Fisher quando apropriado, sendo considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico SPSS 11.0.

RESULTADOS

COMPARAÇÃO DOS GRUPOS COM AS TAXAS DE IMPLANTAÇÃO E GESTAÇÃO

A média de idade e o número de embriões transferidos foram similares em ambos os grupos (tabela 1). A idade variou de 35 a 46 anos no grupo A, e de 35 a 45 anos no grupo B. Todos os parâmetros de idade, causa de infertilidade, protocolos de indução e utilização de fertilização *in vitro* convencional ou com injeção de espermatozóide apresentaram médias similares em ambos os grupos, sem diferenças estatisticamente significativas. A taxa de gestação demonstrou-se superior no grupo A comparada ao grupo B (tabela 1), assim como a Taxa de implantação (31/161 vs. 23/157 sacos gestacionais/embriões transferidos) grupos A e B respectivamente, entretanto, sem diferenças estatisticamente significativas. Podemos observar um aumento também no número de abortos espontâneos no grupo A em comparação com grupo B (tabela 1), sem diferenças estatisticamente significativas.

ESCORE CUMULATIVO DOS EMBRIÕES (CES)

Os grupos A e B apresentaram uma distribuição comparável dos CES nos intervalos avaliados (tabela 2). A figura 1 mostrou uma associação linear entre a Taxa de implantação e o CES, para o grupo B ($P < 0,02$), existindo um decréscimo linear na Taxa de implantação do maior intervalo de CES para o menor ($P < 0,02$). Por outro lado, o grupo A não apresentou tendência linear para os intervalos de CES, demonstrando uma manutenção da Taxa de implantação (figura 1). A figura 2 mostra uma tendência linear entre a Taxa de gestação e o CES, apresentando melhores taxas para os intervalos de CES maiores, para ambos os grupos A e B ($P < 0,01$ e $P < 0,02$) respectivamente.

MÉDIA DE ESCORE DOS EMBRIÕES TRANSFERIDOS (MSTE)

Os grupos A e B apresentaram uma distribuição comparável dos MSTE nos intervalos avaliados (tabela 3). O grupo A apresentou taxas de implantação (figura 3) e gestação (figura 4) similares para os quatro intervalos de MSTE, demonstrando que as taxas de implantação e gestação apresentam-se elevadas para todos os intervalos MSTE, mostrando uma manutenção da implantação independente da qualidade embrionária. O grupo B apresentou um aumento linear de acordo com MSTE maiores, para implantação ($P < 0,004$) e gestação ($P < 0,001$). Existindo um decréscimo linear do maior intervalo de MSTE para o menor ($P < 0,001$) em relação à Taxa de implantação (figura 3) e da mesma forma para a Taxa de gestação (figura 4).

DISCUSSÃO

O decréscimo da capacidade reprodutiva feminina ao longo dos anos pode ser observado pela redução da fertilidade tanto *in vivo* quanto *in vitro* em mulheres com idade avançada. Estudos como de Kenny, e Segal e Casper, demonstraram, em pacientes submetidas à fertilização *in vitro*, uma correlação estreita com a redução da fertilidade a partir dos 35 anos e Piette *et al* demonstraram esta a partir dos 37 anos [6,7,8].

No presente estudo, avaliamos o efeito de um meio enriquecido com 0,5mg/ml de AH utilizado no momento da TE em pacientes com idade avançada. As taxas de gestação e implantação apresentaram-se elevadas, no grupo que utilizou AH quando comparado ao grupo suplementado com HSA, entretanto, sem diferenças estatisticamente significativas.

As perdas gestacionais não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, entretanto, podemos observar uma elevação na taxa para o grupo A em comparação com o grupo B, podendo ser um reflexo dos fatores relacionados à idade. Pacientes com idade avançada, normalmente recrutam um número pequeno de oócitos; juntamente com o declínio da reserva ovariana, ocorre um aumento na incidência de aneuploidias nos oócitos, sendo um fator significativo para as altas taxas de abortos espontâneos encontradas neste grupo de pacientes [9]. O aumento da idade está diretamente relacionado com o decréscimo da qualidade embrionária [10,11]. Alguns estudos demonstram que não somente a qualidade oocitária e embrionária como também diversos fatores de receptividade uterina estão envolvidos no declínio das taxas de implantação e aumento nas taxas de perdas gestacionais com o aumento da idade [12].

O aumento do número de embriões implantados no grupo suplementado com AH sugere um possível efeito promotor de AH no processo de implantação. O aumento do número de perdas gestacionais neste grupo reflete outros fatores

associados ao avanço da idade, não sendo a implantação suficiente para suplantar estes demais fatores relacionados ao declínio reprodutivo.

Em um estudo prospectivo randomizado com pacientes de diferentes idades, divididas em dois grupos, um utilizando meio de TE suplementado com 0,5mg/ml de AH e outro com meio acrescido de 0,125mg/ml de AH, apresentaram para o primeiro grupo taxas de gestação e implantação de 26,6% e 11,5%, e para o segundo grupo 30,4% e 25,5%, respectivamente. No estudo de Ravhon, a suplementação aumentada de AH não agregou valores às taxas de gestação e implantação, as quais apresentaram-se similares em ambos os grupos [13]. Entretanto, Hazlett *et al* avaliando o efeito da suplementação com AH no meio de TE em pacientes com resposta ovariana normal, divididas em grupos com TE no terceiro ou no quinto dia, obtiveram melhores taxas de gestação e implantação nos grupos suplementados com AH [14]. As taxas de gestação e implantação demonstraram-se aumentadas na presença de AH no meio de TE para os dois diferentes momentos de TE, porém não foram encontradas diferenças significativas.

O estudo de Gardner *et al* com camundongos demonstraram um aumento na implantação e no desenvolvimento fetal de embriões na presença de AH no meio de TE, sugerindo uma regulação de AH no processo de interação do embrião com endométrio [15].

Simon *et al* demonstraram que o AH pode substituir a albumina no meio de TE utilizado em embriões humanos, proporcionando taxas de gestação e implantação comparavelmente aumentadas [16].

Nosso estudo demonstrou que a presença de AH no meio de TE proporcionou taxas de implantação similares para embriões de diferentes qualidades embrionárias quando comparado ao meio com HSA. No grupo suplementado com AH a implantação ocorreu de maneira independente à qualidade embrionária quando comparado com o meio de TE com HSA o qual apresentou uma associação linear entre os parâmetros de avaliação da qualidade e Taxa de implantação. Estes dados sugerem um efeito

promotor do AH no processo de implantação do embrião, possibilitando aos embriões melhores taxas de implantação de forma independente a qualidade embrionária, melhorando as condições do processo de implantação. O grupo com meio acrescido com HSA apresentou baixas taxas de implantação para embriões de pouca qualidade e um aumento das taxas de acordo com o crescente aumento da qualidade embrionária.

O estudo de Terriou *et al.* demonstrou uma forte correlação para CES e MSTE em relação à Taxa de gestação [5]. Em nosso estudo uma tendência linear pode ser observada entre o CES e a Taxa de gestação para ambos os grupos, entretanto o MSTE não seguiu uma tendência linear com a qualidade embrionária para o grupo suplementado com AH, apresentando uma manutenção da Taxa de gestação para os diferentes intervalos avaliados.

Terriou *et al* demonstram uma queda na Taxa de gestação em pacientes acima de 38 anos, em todos os intervalos de MSTE avaliados, quando comparadas as pacientes com idade igual ou inferior a 37 anos [5]. Observaram uma distribuição de MSTE no grupo acima de 38 anos similar à encontrada nos demais grupos com idade inferior, demonstrando que a qualidade dos embriões não depende da idade. Sugerem que o decréscimo nas taxas de gestação de pacientes com idade avançada não está relacionado à qualidade embrionária, mas sim ao declínio da receptividade uterina.

Muitos são os possíveis mecanismos de ação do AH como promotor no processo de implantação. O AH encontra-se liberado na matriz extracelular e está envolvido na formação da matriz, no processo de adesão célula-célula e célula-matriz, na proliferação e migração celular, apresentando também co-receptores para fatores de crescimento, podendo estar relacionado, de alguma maneira, ao processo inicial de interação, aposição, adesão e invasão do blastocisto no endométrio [16,17,18].

O AH é o principal glicosaminoglicano presente nos fluidos foliculares e uterinos, e fluidos dos ovidutos propiciando uma alta viscosidade à estes micro-

ambientes [19,20,21]. A presença do AH talvez possa facilitar a rápida difusão do conteúdo do meio de transferência dentro da cavidade uterina. O meio contendo uma apropriada concentração de AH apresenta uma maior viscosidade em comparação aos meios de TE contendo apenas proteínas [22].

A síntese de ácido hialurônico aumenta substancialmente no dia em que a implantação normalmente ocorre [23]. Em contraste com este aumento, a síntese da maioria dos outros glicosaminoglicanos permanece constante durante o estágio de peri-implantação [24].

Na avaliação dos grupos a Taxa de implantação apresentou-se superior na presença de AH no meio de TE. Ainda que sem diferenças significativas, o número de embriões implantados é superior com esta suplementação. A expressão de receptores de AH nas células endometriais e nos embriões humanos e de mamíferos em geral, sugere uma possível função do AH no processo de implantação embrionário [25,26,27]. A expressão de CD44, um receptor de AH, nos embriões e nas células endometriais e decíduais, indicam um possível envolvimento desta molécula no processo de implantação [28,29].

Outro tipo de receptor para AH, RHAMM/IHABP, é expresso pelo embrião no estágio de pré-implantação e com níveis mais elevados no estágio de blastocisto expandido [30].

O mecanismo envolvido na implantação embrionária relacionado ao efeito do AH ainda não é claro. A presença deste no meio de transferência possivelmente se pronuncie de maneira mais importante em estádios mais avançados de desenvolvimento embrionário, quando há um aumento na expressão de receptores específicos para AH e onde a sinalização entre o blastocisto e o endométrio ocorre de maneira crucial.

Este estudo demonstrou que a suplementação do meio de TE, com AH, proporcionou uma elevação nas taxas de implantação e gestação para pacientes com

idade avançada, entretanto sem diferenças estatisticamente significativas. Na avaliação dos parâmetros de qualidade dos embriões transferidos e Taxa de implantação o meio suplementado com AH demonstrou uma sustentação das taxas independente a qualidade embrionária, sugerindo uma melhor interação embrião-endométrio. Aparentemente a suplementação com AH apresenta um efeito positivo no momento de implantação embrionária.

A presença de AH no meio de TE melhorando as condições do processo de implantação embrionária pode otimizar as chances de implantação dos embriões. Esta possibilidade pode auxiliar em uma redução no número de embriões transferidos sem queda nas taxas de gestação e implantação e ao mesmo tempo, evitando as gestações múltiplas, principalmente para grupos de pacientes mais jovens.

Estudos prospectivos randomizados, direcionados a grupos específicos, com suplementação de AH no meio de TE para embriões em estádios mais avançados de desenvolvimento embrionário podem demonstrar uma otimização dos resultados de gestação e implantação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dew JE, Don RA, Hughes GJ, Johnson TC, Steigrad SJ. The influence of advanced age on the outcome of assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet* 1998;15:210–4.
2. Schoolcraft WB, Surrey ES, Gardner DK. Embryo transfer: techniques and variables affecting success. *Fertil Steril* 2001;76(5):863-70.
3. Eppig JJ. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature*. 1979 Oct 11;281(5731):483-4.
4. Binette JP, Ohishi H, Burgi W, Kimura A, Suyemitsu T, Seno N, Schmid K. The content and distribution of glycosaminoglycans in the ejaculates of normal and vasectomized men. *Andrologia*. 1996 May-Jun;28(3):145-9.
5. Terriou P, Sapin C, Giorgetti C, Hans E, Spach JL, Roulier R. Embryo score is a better predictor of pregnancy than the number of transferred embryos or female age. *Fertil Steril* 2001;75(3):525-31.
6. Kenny DT. The impact of maternal age on clinical pregnancy and spontaneous abortion in women undergoing in vitro fertilization and gamete intra-fallopian transfer. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1994 ;34(4):443-8.
7. Segal S, Casper RF. The response to ovarian hyperstimulation and in-vitro fertilization in women older than 35 years. *Hum Reprod* 1990;5(3):255-7.
8. Piette C, de Mouzon J, Bachelot A, Spira A. In-vitro fertilization: influence of women's age on pregnancy rates. *Hum Reprod* 1990;5(1):56-9.
9. Richardson SJ, Nelson JF. Follicular depletion during the menopausal transition. *Ann. N.Y. Acad Sci* 1990; 592:13–20.

10. Chetkowski RJ, Rode RA, Burruel V, *et al.* The effect of pituitary suppression and the woman's age on embryo viability and uterine receptivity. *Fertil Steril* 1991;56:1095–1103.
11. Hull MG, Fleming C, Hughes A, *et al.* The age related decline in female fecundity: a quantitative controlled study of implanting capacity and survival of individual embryos after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1996;65:783–790.
12. Navot D, Bergh PA, Williams MA, *et al.* Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fecundity. *Lancet* 1991;337:1375–1377.
13. Ravhon A, Nahum H, Weissman A, Biran G, Umansky N, Levran D. Embryo Transfer in Hyaluronan Enriched Transfer Medium Does Not Improve Pregnancy Rate in IVF Program. *Fertil Steril* 2005;84(Suppl 1):P-619.
14. Hazlett WD, Meyer L, Nasta T, Mangan P, Karande VC. EmbryoGlue® and its Impact on Pregnancy and Implantation Rates in Normal and Low Responding IVF Patients. *Fertil Steril* 2005;84 (Suppl 1):S375-S376.
15. Gardner DK, Rodriegez-Martinez H, Lane M. Fetal development after transfer is increased by replacing p rotein with the glicosaminoglycan hyaluronan for mouse embryo culture and transfer. *Hum. Reprod* 1999; 14: 2575-80.
16. Simon A, Safran A, Revel A, Aizenman E, Reubinoff B, Porat-Katz A, Lewin A, Laufer N. Hyaluronic acid can successfully replace albumin as the sole macromolecule in a human embryo transfer medium. *Fertil Steril* 2003; 79(6):1434-8.
17. Turley E, Moore D. Hyaluronate binding proteins also bind to fibronectin, laminin and collagen. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984;29;121(3):808-14.
18. Sato E, Tanaka T, Takeya T, Miyamoto H, Koide SS Ovarian glycosaminoglycans potentiate angiogenic activity of epidermal growth factor in mice. *Endocrinology.* 1991;128(5):2402-6.
19. Lee CN, Ax RL. Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. *J Dairy Sci.* 1984 Sep;67(9):2006-9.

20. Suchanek E, Simunic V, Juretic D, Grizelj V. Follicular fluid contents of hyaluronic acid, follicle-stimulating hormone and steroids relative to the success of in vitro fertilization of human oocytes. *Fertil Steril*. 1994 Aug;62(2):347-52.
21. Rodriguez-Martinez H, Iborra A, Martinez P, Calvete JJ. Immunoelectronmicroscopic imaging of spermadhesin AWN epitopes on boar spermatozoa bound in vivo to the zona pellucida. *Reprod Fertil Dev*. 1998;10(6):491-7.
22. Stojkovic M, Kolle S, Peinl S, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Thompson JG, Wenigerkind H, Reichenbach HD, Sinowatz F, Wolf E. Effects of high concentrations of hyaluronan in culture medium on development and survival rates of fresh and frozen-thawed bovine embryos produced in vitro. *Reproduction*. 2002;124(1):141-53.
23. Carson DD, Dutt A, Tang JP. Glycoconjugate synthesis during early pregnancy: hyaluronate synthesis and function. *Dev Biol* 1987;120(1):228-35.
24. Zorn TM, Pinhal MA, Nader HB, Carvalho JJ, Abrahamsohn PA, Dietrich CP. Biosynthesis of glycosaminoglycans in the endometrium during the initial stages of pregnancy of the mouse. *Cell Mol Biol* 1995 Feb;41(1):97-106.
25. Furnus CC, Valcarcel A, Dulout FN, Errecalde AL. The hyaluronic acid receptor (CD44) is expressed in bovine oocytes and early stage embryos. *Theriogenology* 2003;60(9):1633-44.
26. Campbell S, Swann HR, Aplin JD, Seif MW, Kimber SJ, Elstein M. CD44 is expressed throughout pre-implantation human embryo development. *Hum Reprod*. 1995 Feb;10(2):425-30.
27. Valcarcel A, de Matos DG, Furnus CC. The hyaluronic acid receptor (CD44) expressed in bovine oocytes and preimplantational stage embryos. *Theriogenology* 1999 51:193 (abstract)
28. Behzad F, Seif MW, Campbell S, Aplin JD. Expression of two isoforms of CD44 in human endometrium. *Biol Reprod*. 1994 Oct;51(4):739-47.

29. Yaegashi N, Fujita N, Yajima A, Nakamura M. Menstrual cycle dependent expression of CD44 in normal human endometrium. *Hum Pathol* 1995;26(8):862-5.

30. Stojkovic M, Krebs O, Kollé S, Prella K, Assmann V, Zakhartchenko V, Sinowatz F, Wolf E. Developmental regulation of hyaluronan-binding protein (RHAMM/IHABP) expression in early bovine embryos. *Biol Reprod* 2003;68(1):60-6.

Tabela 1. Resultados clínicos dos ciclos de transferência embrionária para os dois grupos em estudo.

	Grupo A (n = 69)	Grupo B (n = 59)	P
Idade das Pacientes	38,6 ± 2,87	38,5 ± 2,6	0,842
Embriões Transferidos	161	157	-
Embriões/Transferência	2,33 ± 1,28	2,66 ± 1,17	0,135
Gestações Clínicas	25	19	0,837
Gestações Únicas	20	16	
Gestações Múltiplas	5	3	
Abortos Espontâneos	14	9	0,611
Taxa de Gestação (%)	25/69 (36,2%)	19/57 (32,2%)	0,771
Taxa de Implantação (%)	31/161 (19,3%)	23/157 (14,6%)	0,345

Valores expressos em média ± desvio padrão.

Grupo A = Meio TE suplementado com AH

Grupo B = Meio de TE suplementado com HSA

Tabela 2. Distribuição de ciclos entre os intervalos de CES para os grupos A e B.

CES	Grupo A	Grupo B
1 a 4	32 (46,4%)	21 (35,6%)
5 a 8	17 (24,6%)	14 (23,7%)
9 a 12	12 (17,4%)	15 (25,4%)
13 a 16	8 (11,6%)	9 (15,3%)
Total Ciclos	69 (100%)	59 (100%)

P 0,532

Grupo A = Meio TE suplementado com AH

Grupo B = Meio de TE suplementado com HSA

Tabela 3. Distribuição de ciclos entre os intervalos de MSTE para os grupos A e B.

MSTE	Grupo A	Grupo B
1 > 1,5	9 (13,0%)	6 (10,2%)
1,5 > 2,5	15 (21,7%)	16 (27,1%)
2,5 > 3,5	25 (36,2%)	21 (35,6%)
3,5 ≥ 4,0	20 (29,0%)	16 (27,1%)
Total Ciclos	69 (100%)	59(100%)

P 0,886

Grupo A = Meio TE suplementado com AH

Grupo B = Meio de TE suplementado com HSA

FIGURAS

Figura 1. Taxa de implantação dos grupos A e B para os intervalos de CES. Grupo A (barras azuis), não demonstrou tendência linear ($P = 0,45$) e correlação ($\tau = 0,10$) entre a taxa de implantação e os intervalos de CES. O grupo B, (barras roxas), demonstrou uma tendência linear ($P < 0,02$) e correlação ($\tau = 0,17$) entre as variáveis em estudo.

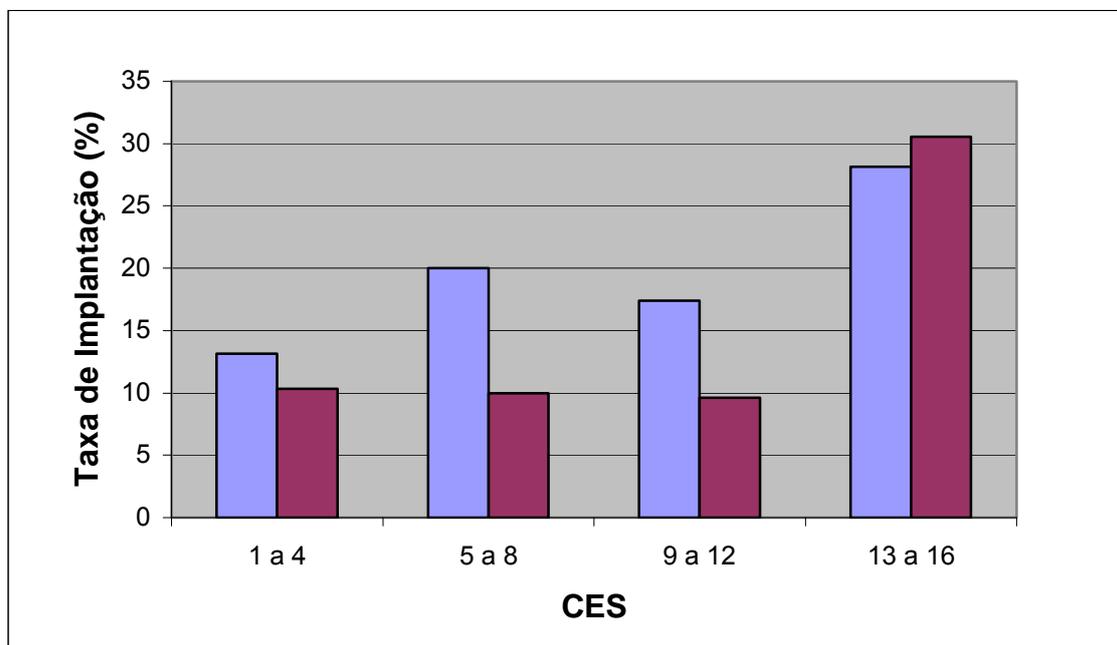


Figura 2. Taxa de gestação dos grupos A e B para os intervalos de CES. Grupo A (barras azuis) e grupo B (barras roxas), ambos apresentaram tendência linear entre as variáveis em estudo, ($P < 0,01$ e $P < 0,02$, respectivamente) e correlação ($\tau = 0,39$ e $\tau = 0,36$, respectivamente).

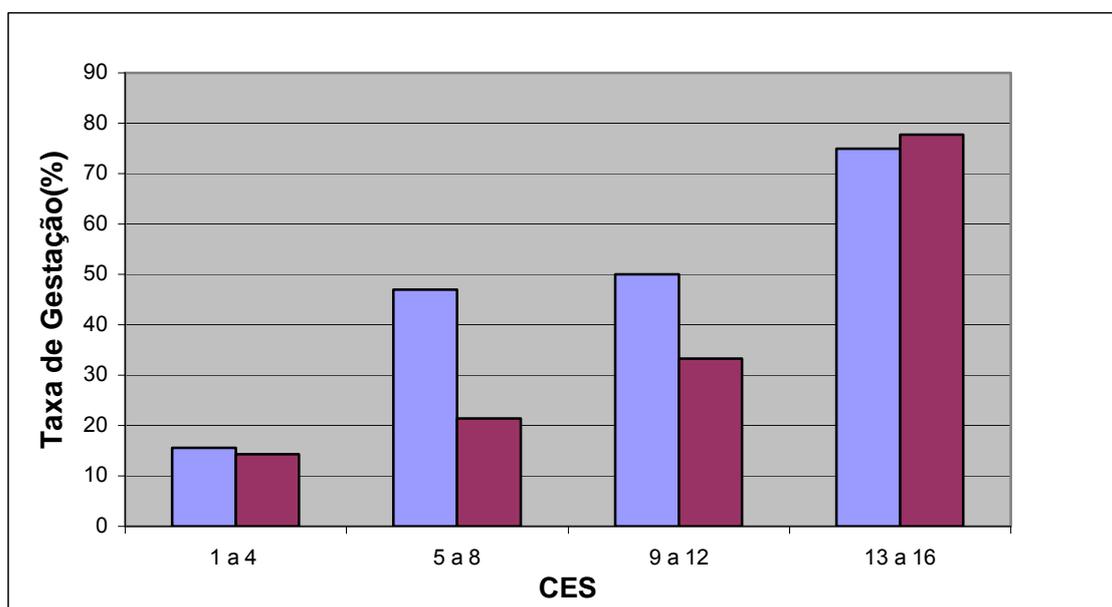


Figura 3. Taxa de implantação dos grupos A e B para os intervalos de MSTE. Grupo A (barras azuis), não apresentou tendência linear ($P = 0,358$) e correlação ($\tau = 0,07$) entre a taxa de implantação e os intervalos de MSTE. O grupo B (barras roxas), apresentou uma tendência linear ($P < 0,004$) e correlação ($\tau = 0,26$) entre as variáveis em estudo.

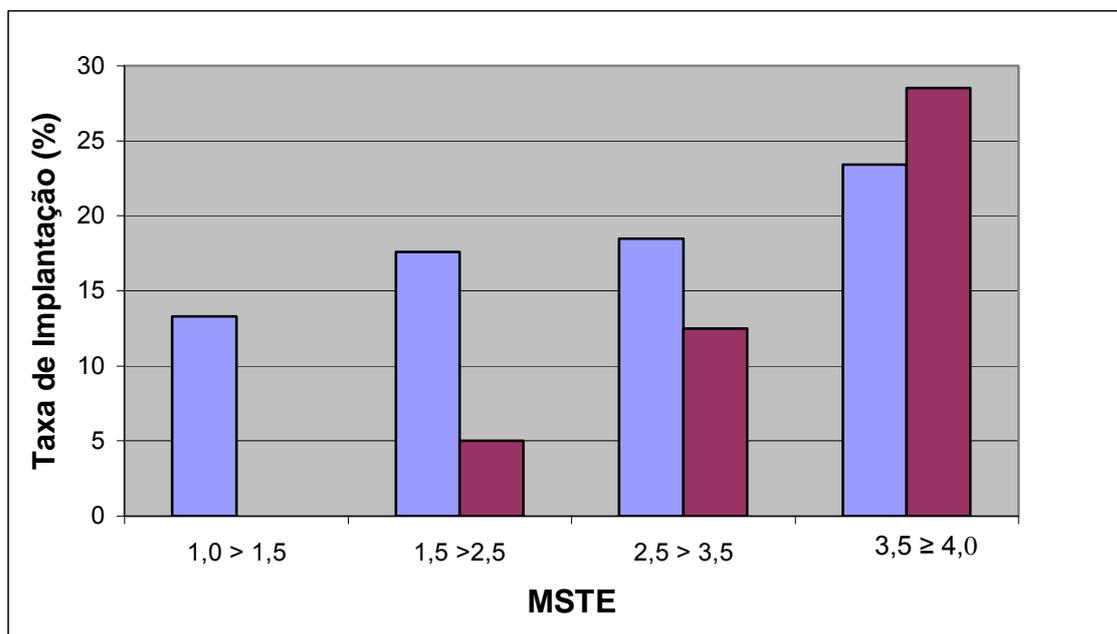
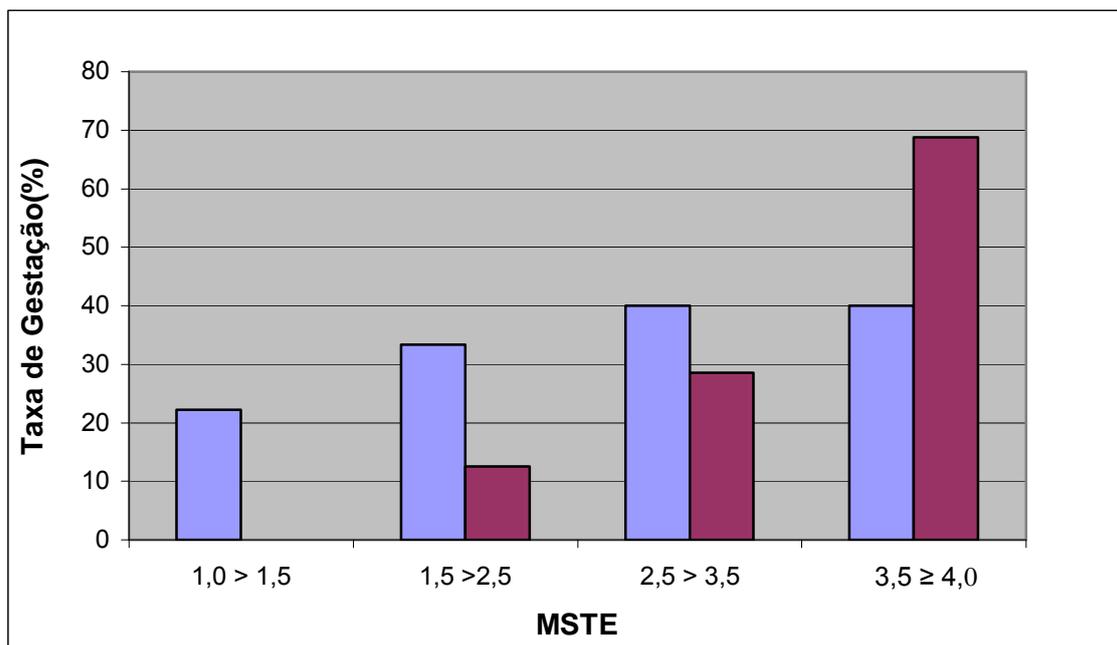


Figura 4. Taxa de gestação dos grupos A e B para os intervalos de MSTE. Grupo A (barras azuis), não apresentou tendência linear ($P = 0,335$) e correlação ($\tau = 0,09$) entre a taxa de gestação e os intervalos de MSTE. O grupo B (barras roxas), apresentou uma tendência linear ($P < 0,001$) e correlação ($\tau = 0,46$) entre as variáveis em estudo.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstrou que a suplementação do meio de TE, com AH, proporcionou uma elevação nas taxas de implantação e gestação em pacientes com idade avançada, quando comparado ao grupo suplementado com HSA, entretanto, sem diferenças estatisticamente significativas. Quando analisados os parâmetros de e qualidade embrionária o meio suplementado com AH demonstrou uma sustentação das taxas de implantação independente a qualidade dos embriões, sugerindo uma melhor interação embrião-endométrio. A presença de AH no meio de TE melhorando as condições do processo de implantação embrionária pode otimizar as chances de implantação dos embriões e com isso possibilitar a redução no número de embriões transferidos sem queda nas taxas de gestação e implantação, minimizando assim os riscos de gestações múltiplas associados aos processos de reprodução assistida.

ANEXOS:

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaramos, para os devidos fins, que, ao nos submetermos ao procedimento de fertilização *in vitro* / micromanipulação de gametas e transferência de embriões, fomos plenamente informados sobre todas as etapas da técnica tendo recebido impresso detalhando os vários aspectos do método.

Ainda, fomos informados de que tal procedimento poderá ser suspenso no caso de não obtenção de folículos ou se os mesmos tiverem crescimento inadequado.

Estamos cientes de todos os aspectos mencionados acima, bem como da possibilidade de utilização de dados relativos ao tratamento para fins de divulgação científica, resguardando toda informação de caráter confidencial relacionada com nossa privacidade para o que subscrevemos o presente documento.

Porto Alegre, de de 200 .

Ciente:

Paciente:_____.

Cônjuge:_____.