

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:

MEDICINA

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE EMBRIONÁRIA (ESCORE EMBRIONÁRIO) EM  
MULHERES COM ENDOMETRIOSE

Juliana Zanrosso Caran

Porto Alegre

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:

MEDICINA

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE EMBRIONÁRIA (ESCORE EMBRIONÁRIO) EM  
MULHERES COM ENDOMETRIOSE

Juliana Zanrosso Caran

Orientador: João Sabino  
Lahorgue da Cunha Filho

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Medicina: Ciências Médicas,  
UFRGS, como requisito para  
obtenção do título de Mestre

Porto Alegre

2012

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à  
minha mãe e ao meu pai,  
exemplos de vida, caráter,  
e perseverança.

## **AGRADECIMENTOS**

Muitas pessoas trilharam comigo o caminho até a conclusão deste projeto e contribuíram, direta ou indiretamente, para que este trabalho fosse concluído. Agradeço em especial:

- Ao Professor Dr. João Sabino L. da Cunha-Filho, pela orientação e aconselhamentos durante a construção desta dissertação;

- A todos os componentes do nosso grupo de pesquisa, que de alguma forma contribuíram para os resultados deste trabalho, em particular à bolsista Ana Cláudia Magnus Martins e à Dra. Vanessa Genro;

- Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre;

- Daniela Scherer da Silva, Médica Veterinária, Embriologista do Centro de Reprodução Humana Insemine, pela contribuição direta e pela disponibilidade permanente;

- Agradecimento especial aos amigos Fairuz Helena Souza de Castro, Geane Garlet, Ana Luiza Gutierrez e Fabrício Bastos Lewandowski pela motivação compartilhada.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.” – Carl Jung

## RESUMO

**Introdução.** A fertilização *in vitro* (FIV) é uma opção de tratamento para pacientes inférteis com endometriose (EDT), e a escolha dos embriões a serem transferidos é um passo fundamental para o sucesso do processo. A endometriose é capaz de interferir em todas as etapas do processo de FIV, a qual pode estar associada à foliculogênese anormal, a defeitos de implantação e à qualidade oocitária inferior, bem como a alterações na receptividade endometrial. Em estágios mais severos da doença, pode-se observar um importante substrato anatômico associado. O Escore de Graduação Embrionário (GES) é uma classificação baseada numa combinação da morfologia pronuclear, clivagem precoce e morfologia no terceiro dia após a fertilização que permite avaliar quais embriões terão maiores chances de implantação/gestação. Ainda não há, na literatura, relatos de comparação do GES com pacientes portadoras de endometriose.

**Objetivo.** Determinar o escore de graduação embrionário médio entre as pacientes inférteis com endometriose submetidas à fertilização *in vitro* e comparar com pacientes inférteis sem endometriose.

**Métodos.** Foram comparados, através de uma coorte prospectiva, 706 embriões (162 pacientes), sendo 472 embriões pertencentes às pacientes do grupo controle sem endometriose (n=109; infertilidade tubária ou por fator masculino) e 234 embriões de pacientes com endometriose (n=53). Todas as pacientes foram submetidas à fertilização *in vitro*, utilizando o protocolo de indução da ovulação com antagonista do GnRH. Todos os embriões foram transferidos no dia 3 após fertilização. O escore de graduação embrionário

(GES) foi realizado através de avaliação de todos os embriões por 3 vezes, nos tempos: 16 – 18 horas, 25 – 27 horas e 64 – 67 horas, sempre pelo mesmo embriologista. Para pontuação do GES, avaliaram-se: citoplasma, morfologia pronuclear, fragmentação, alinhamento nucleolar, posição do corpo polar, número de blastômeros/morfologia e simetria. Consideramos escore médio a soma dos escores embrionários dividida pelo número de embriões obtidos; e o escore embrionário médio transferido como a soma dos GES dividido pelo número de embriões transferidos. Foi considerado estatisticamente significativo quando  $P < 0,05$  utilizando-se os testes t Student e qui-quadrado.

**Resultados.** Os grupos foram comparados quanto à idade, índice de massa corporal, perfil obstétrico (infertilidade primária, secundária, paridade, abortamentos) e perfil hormonal, não sendo encontrada diferença estatisticamente significativa. Apesar de o número de embriões transferidos ser maior em pacientes com endometriose quando comparadas ao grupo controle ( $2,38 \pm 0,66$  versus  $2,15 \pm 0,54$ , respectivamente;  $P=0,001$ ), não se observou diferença no escore de graduação embrionário médio entre os grupos de estudo e controle ( $71 \pm 19,8$  versus  $71,9 \pm 23,5$ , respectivamente;  $P=0,881$ ). Quanto às taxas de fertilização, houve semelhança entre os grupos, correspondendo a 61% nas pacientes com endometriose e 59% naquelas do grupo controle ( $P=0,511$ ). Também não houve diferença estatisticamente significativa quando os grupos foram comparados quanto às taxas de implantação (21% versus 22%, respectivamente;  $P=0,989$ ) e gestação (26,4% versus 28,4%, respectivamente;  $P=0,989$ ). Para estes parâmetros de avaliação, os diferentes graus de severidade da endometriose não interferiram significativamente nos resultados.

**Conclusão.** A presença de endometriose não impactou significativamente na qualidade embrionária. Da mesma forma, não foram observadas diferenças nos desfechos reprodutivos avaliados entre pacientes inférteis com e sem endometriose.

**Palavras-chave.** Endometriose. Qualidade embrionária. Fertilização *in vitro*. Escore embrionário.

## **ABSTRACT**

**Objective.** To determine embryo quality (Mean Graduated Embryo Score, MGES) in infertile patients with endometriosis submitted to *in vitro* fertilization (IVF-ET).

**Design.** Prospective cohort.

**Setting.** Private Human Reproduction Center.

**Patients.** We compared 706 embryos (162 patients) divided in two groups: 472 embryos derived from patients without endometriosis (n=109, infertile patients with tubal or male infertility) and 234 embryos from patients in study group (n=53, infertile patients with endometriosis).

**Interventions.** All patients were submitted to IVF using an estradiol-antagonist-recombinant FSH protocol for ovarian stimulation. MGES was performed evaluating all embryos three times: 16 – 18 hours, 25 – 27 hours and 64 – 67 hours, by the same embryologist. Embryo evaluation was performed according to the following parameters: fragmentation, nucleolar alignment, polar body apposition, blastomere number/morphology and symmetry.

**Main Outcome Measures.** MGES scores, fertilization, implantation and pregnancy rates.

**Results.** Groups were compared for age, body mass index (BMI), past ob/gyn characteristics (primary or secondary infertility, parity, abortions) and hormonal profile. Although the number of embryos transferred was greater in patients with endometriosis than in the control group ( $2.38 \pm 0.66$  versus  $2.15 \pm 0.54$ , respectively;  $P = 0.001$ ), the MGES was similar in both groups ( $71 \pm 19.8$



versus  $71.9 \pm 23.5$ , respectively;  $P = 0.881$ ). Likewise, fertilization rate was similar in groups, 61% in patients with endometriosis and 59% in control group ( $P=0,511$ ). Moreover, no significant differences were found in implantation rates (21% versus 22%, respectively [ $P=0,989$ ]) and in pregnancy rates (26,4% versus 28,4%, respectively [ $P=0,989$ ]). The severity of endometriosis did not influence the results.

**Conclusions.** Embryo quality measured by MGES was not influenced by endometriosis. Likewise, the reproductive outcomes evaluated were similar between infertile patients with and without endometriosis.

**Key Words.** Endometriosis; embryo quality; *In vitro* fertilization; embryo score.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AFC – antral follicle count (contagem de folículos antrais)

AMH – *anti-Mullerian hormone* (hormônio anti-Mulleriano)

ASRM – *American Society for Reproductive Medicine* (Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva)

DP – desvio padrão

E<sub>2</sub> – estradiol

EDT – endometriose

FIV – fertilização *in vitro*

FSH – hormônio folículo estimulante

GnRH – hormônio liberador de gonadotrofinas

GES – *Graduated Embryo Score* (Escore de Graduação Embrionário)

hCG – gonadotrofina coriônica humana

IL – interleucina

LH – hormônio luteinizante

TSH – hormônio tireotrófico

## **SUMÁRIO**

Introdução

Revisão da Literatura

Endometriose: aspectos gerais

Endometriose e infertilidade

Escore de Qualidade Embrionário

Endometriose e fertilização in vitro

Endometriose e qualidade embrionária

Justificativa

Hipótese Nula

Objetivos

Objetivo principal

Objetivos secundários

Referências Bibliográficas

Artigo

Perspectivas

## **Anexos/Apêndices**

Anexo 1: Classificação da Endometriose segundo a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva

Anexo 2: Escore de Gradação Embrionário

Apêndice 1: Instrumento de coleta de dados

Apêndice 2: Fotos de embriões com as respectivas pontuações

Apêndice 3: Protocolo de manipulação dos embriões

Apêndice 4: Protocolo de indução da ovulação (padrão)

Apêndice 5: Tabela 1 do artigo

Apêndice 6: Tabela 2 do artigo

## INTRODUÇÃO

A associação de endometriose (tecido endometrial fora da cavidade uterina) com infertilidade é tema de diversos estudos. Não existe consenso na literatura sobre fatores causais assim como há resultados contraditórios no que tange aos desfechos de técnicas de fertilização *in vitro*.

A prevalência da endometriose varia de acordo com os diferentes estudos e diferentes populações, mas acredita-se que gire em torno de 10% das mulheres em idade reprodutiva (Olive, Lindheim et al. 2003; Bulun 2009). A prevalência exata na população em geral é difícil de ser determinada, tendo em vista sua grande diversidade de sintomas, além de serem muitas vezes inespecíficos, podem ser até mesmo ausentes em algumas pacientes. Em pacientes submetidas à laparoscopia por infertilidade, observa-se uma prevalência em torno de 9 a 50% dos casos, contra 6,7% naquelas submetidas a mesmo procedimento cirúrgico por outra indicação (Missmer, Hankinson et al. 2004).

O estágio da endometriose é avaliado por laparoscopia e é classificado através dos critérios da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (1997). O espectro varia desde mínimo comprometimento pela presença de tecido ectópico até severa distorção anatômica. Nos estágios mais avançados da doença, como endometriose moderada ou severa, há um substrato anatômico importante para justificar a associação com infertilidade. Na ausência deste fundamento, muitas hipóteses surgem. A avaliação hormonal das pacientes portadoras de endometriose permitiu observar a interferência de algumas rotas endocrinológicas, como a da prolactina e da insuficiência lútea (Cunha-Filho,

Gross et al. 2001), bem como alterações da reserva ovariana através do hormônio anti-Mulleriano (Lemos, Arbo et al. 2008). Também a imunologia exerce algum papel nesta associação de endometriose com infertilidade, e o estudo das interleucinas (Andreoli, Genro et al. 2011) e das citocinas (Bulun 2009) é parte importante neste processo.

Todos os estágios que envolvem a terapêutica da fertilização *in vitro* como opção de tratamento para infertilidade nas pacientes com endometriose são importantes na compreensão dos desfechos finais. Estas mulheres apresentam alterações desde a fase de foliculogênese, embriogênese até na responsividade endometrial de tecido tópico à implantação (Simon, Gutierrez et al. 1994; Garrido, Navarro et al. 2002; Gupta, Goldberg et al. 2008).

Selecionar embriões para a transferência ao útero é passo fundamental nas técnicas de reprodução assistida. A possibilidade de transferir embrião único em pacientes de alto risco para gemelaridade, justifica-se a fim de evitar a geração de uma gestação múltipla. Entretanto, ainda não há consenso sobre a melhor modalidade de avaliação. Muitos estudos foram desenvolvidos no sentido de avaliar morfologia do blastômero. O melhor momento para a transferência, seja no dia 2 ou 3 após fertilização ou em fase de blastocisto também não está bem estabelecida (Fisch, Rodriguez et al. 2002; Sjoblom, Menezes et al. 2006; Luna, Copperman et al. 2008)

O Escore de Graduação Embrionário (GES) é utilizado para classificar quais embriões têm maior probabilidade de sucesso nas taxas de implantação e gestação. Baseia-se na avaliação embrionária durante três momentos após a fertilização, pontuando até um valor máximo de 100, analisando-se:

alinhamento nucleolar ao longo do eixo do procúleo, clivagem (regularidade e simetria), fragmentação e número de células (Fisch, Rodriguez et al. 2001).

Considerando a associação de endometriose com infertilidade, este estudo tem como objetivo comparar a pontuação de GES entre pacientes portadoras de endometriose, nos diferentes graus de severidade, com aquelas do grupo controle (infertilidade tubária ou por fator masculino). Adicionalmente, avaliar e comparar alguns desfechos reprodutivos, como taxas de implantação, fertilização e gestação entre os grupos.

## **REVISÃO DA LITERATURA**

### **Endometriose: aspectos gerais**

Endometriose é uma desordem caracterizada pela presença e crescimento de tecido endometrial em sítios ectópicos (fora da cavidade uterina). A prevalência entre as mulheres assintomáticas está em torno de 2 a 20%, enquanto entre aquelas com queixa de dismenorréia pode ficar em torno de 40%. A endometriose é uma patologia de importância clínica ginecológica e na medicina reprodutiva, sendo foco de constante pesquisa (Leyendecker, Kunz et al. 1998; Bulun 2009; Falconer, Sundqvist et al. 2009; Coccia, Rizzello et al. 2011).

Distúrbios ovulatórios, obstrução tubária, anormalidades espermáticas são de diagnóstico relativamente fácil e são causa de infertilidade em cerca de 75% dos casais (Smith, Pfeifer et al. 2003). Quando estas causas são excluídas, a infertilidade nos restantes 25% dos casais pode dever-se à presença de endometriose, a qual pode estar presente em torno de 40% das mulheres destes casais. Infertilidade sem causa aparente representa 17% dos casos (Tanahatoe, Hompes et al. 2003). Outros autores referem que a presença de endometriose está associada a decréscimo na qualidade oocitária (Hendarto, Prabowo et al. 2009).

### **Endometriose e infertilidade**

A associação entre endometriose e infertilidade tem sido exaustivamente reportada na literatura. Porém, os dados obtidos ainda são contraditórios entre os diferentes estudos. Numerosos mecanismos foram propostos para compreender os possíveis danos à fertilidade, incluindo:



alteração na foliculogênese, disfunção ovulatória e pobre qualidade oocitária, bem como defeitos de fase lútea, fertilização reduzida e embriogênese anormal (Gupta, Goldberg et al. 2008).

A relação causal entre endometriose e infertilidade tem sido aventada pela alta prevalência da doença observada em mulheres subférteis (em torno de 50%) comparada com mulheres com fertilidade comprovada (5 a 10%) (Vercellini, Somigliana et al. 2009). A taxa de fecundidade mensal em casais saudáveis em idade reprodutiva é em torno de 30% para os três primeiros ciclos e declina para cerca de 4% quando o casal está tentando há mais de um ano. Entretanto, esta taxa em casais com endometriose relacionada à infertilidade está entre 2 e 10% ao mês. Mesmo endometriose mínima pode ser associada com marcada subfertilidade (Gupta, Goldberg et al. 2008; Vercellini, Somigliana et al. 2009).

Os mecanismos da infertilidade associada à endometriose são controversos e provavelmente dependem, em parte, do estágio da doença. O estadiamento é realizado cirurgicamente através do sistema da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (*American Society of Reproductive Medicine* [ASRM]) (1997). O espectro varia desde um mínimo comprometimento pela presença de tecido ectópico até severa distorção anatômica.

Durante a avaliação de pacientes inférteis, endometriose em estágios iniciais pode ser o único achado anormal. Endometriose mínima e leve pode estar associada com superprodução de prostaglandinas, metaloproteinases e citocinas (Bulun 2009), e isto resultaria num processo inflamatório com dano

ovariano, peritoneal, tubário, além de alteração na função endometrial, levando ao comprometimento da foliculogênese, fertilização e/ou implantação.

Taxas reduzidas de gravidez em mulheres com endometriose avançada (comparadas com mulheres com estágios iniciais de endometriose ou fator tubário) podem, igualmente, ocorrer devido à depleção prematura do *pool* folicular ovariano, foliculogênese anormal ou à redução do potencial de fertilização oocitário (Toya, Saito et al. 2000).

O nosso grupo de pesquisas desenvolve estudos relacionados à endometriose em todos os seus âmbitos. No que concerne à associação endometriose e infertilidade, vários estudos foram publicados no campo da imunologia, endocrinologia e genética. Em estudo desenvolvido por Cunha-Filho et al. 2001, demonstrou-se que mulheres com endometriose têm secreção e controle da prolactina alterada. Hiperprolactinemia é importante causa de endometriose associada à infertilidade, principalmente naquelas pacientes com graus mínimo ou leve da doença, nos quais não há substrato anatômico importante (Cunha-Filho, Gross et al. 2001; Cunha-Filho, Gross et al. 2002).

Outros autores relataram que pacientes com endometriose apresentam resposta imune aberrante, com padrão alterado de secreção de citocinas e interleucinas. Em estudo desenvolvido pelo nosso grupo, foram observados níveis similares de IL-10, IL-12 e IL-17 no soro e no fluido peritoneal de pacientes com endometriose comparadas com controles férteis saudáveis. Os níveis de IL-23 foram semelhantes no soro, porém significativamente maiores no fluido peritoneal de pacientes inférteis com endometriose mínima/leve,

podendo impactar na subfertilidade apresentada por este grupo de pacientes (Andreoli, Genro et al. 2011).

A imunidade celular, e particularmente a imunidade humoral, exercem papel significativo sobre a fertilidade feminina. Distúrbios no sistema de imunidade humoral podem levar a dano na foliculogênese ovariana. A função das citocinas no ovário tem sido descrita como promotora do processo de crescimento folicular, esteroidogênese, recrutamento e ativação de leucócitos necessários durante a ovulação, luteinização e luteólise. Sarapik et al. concluíram que as várias etiologias da infertilidade são acompanhadas por perfis diferentes de citocinas no fluido folicular (Sarapik, Velthut et al. 2012). Níveis séricos elevados de citocinas derivadas do fluido folicular foram observados em pacientes com endometriose (Galo, Zubor et al. 2005). Sabe-se que a endometriose está associada com ativação de células imunes e citocinas aberrantes no fluido peritoneal, criando um ambiente local inflamatório (Barrier 2010; Herington, Bruner-Tran et al. 2011; Olovsson 2011).

Também estudamos a avaliação da reserva ovariana em pacientes com endometriose, e observamos que a mesma encontra-se diminuída neste grupo de pacientes, o qual apresenta coorte folicular heterogênea. Em trabalho desenvolvido por Lemos et al, mulheres com endometriose mínima e leve apresentaram redução no nível sérico do hormônio anti-Mulleriano (AMH) comparado com aquelas com infertilidade tubária. A análise da coorte folicular mostrou que o número de folículos selecionáveis foi similar; porém, a coorte folicular de pacientes com endometriose foi mais heterogênea quando comparada ao grupo controle (Lemos, Arbo et al. 2008).

O hormônio anti-Mulleriano é produzido pelas células da granulosa dos folículos pré-antrais e antrais iniciais pequenos (Al-Azemi, Killick et al. 2011; Rustamov, Pemberton et al. 2011). AMH é um marcador de reserva ovariana e melhor preditor do número de folículos antrais precoces do que FSH, inibina B e estradiol (também mensurados na avaliação de reserva ovariana) (Lemos, Arbo et al. 2008).

Este hormônio vem sendo utilizado com preditor de resposta à indução da ovulação, bem como ao risco de desenvolvimento de síndrome de hiperestímulo ovariano (Al-Azemi, Killick et al. 2011). Os níveis séricos de AMH foram reportados como papel chave determinante nos resultados de gestação (Ballester, Oppenheimer et al. 2011). Shelb *et al.* encontraram que os níveis séricos de AMH em mulheres com endometriose mínima (ASRM I – II) foram praticamente semelhantes àqueles observados em pacientes sem endometriose, enquanto um decréscimo foi encontrado naquelas pacientes com endometriose severa (ASRM III – IV) (Shebl, Ebner et al. 2009). Buyuk *et al.* reportaram que pacientes com níveis séricos elevados de AMH apresentaram o dobro do número de oócitos recuperados, um maior número de embriões no terceiro dia após fertilização e uma taxa de gestação clínica maior quando comparadas a pacientes com níveis hormonais mais baixos (Buyuk, Seifer et al. 2011).

Foi demonstrado que a concentração de AMH no fluido folicular é um importante indicador da qualidade oocitária e, conseqüentemente, dos desfechos reprodutivos (Wunder, Guibourdenche et al. 2008). Em estudo desenvolvido por Falconer *et al.*, foi evidenciado que mulheres com endometriose possuem níveis séricos e no fluido folicular inferiores quando

comparadas àquelas com infertilidade tubária. Estes autores observaram uma correlação altamente significativa entre os níveis séricos e no fluido folicular deste hormônio (Falconer, Sundqvist et al. 2009). Em outro estudo publicado pelo nosso grupo, foi demonstrado que a concentração de AMH no fluido folicular de pacientes com endometriose mínima e leve submetidas à FIV foi similar àquelas com infertilidade tubária (Campos, Vaamonde et al. 2010).

Outra evidência demonstrada pelo nosso grupo é o fato de que pacientes com endometriose graus III e IV, nas quais disfunção ovulatória é sabidamente encontrada, apresentam baixos níveis de IGFBP-1 no fluido folicular quando submetidas à FIV. Nos ovários, o *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) tem ação autócrina e parácrina. O IGF-1 é produzido pelas células da granulosa após estimulação com FSH, e sua atividade é controlada por proteínas de catálise e pelas *insulin-like growth factor binding proteins* (IGFBP), as quais atuam como inibitórias, neutralizando o IGF-1. O resultado deste estudo provavelmente constitui um mecanismo compensatório para a disfunção ovulatória intrínseca em pacientes inférteis com endometriose (Cunha-Filho, Lemos et al. 2003). O estudo do fluido folicular em pacientes com endometriose é importante para elucidar a patofisiologia da doença.

### **Escore de Gradação Embrionário**

A investigação da qualidade embrionária antes da transferência é um importante processo à luz das recomendações para transferência de embrião único.

A redução do número de embriões transferidos após fertilização in vitro (FIV) ou injeção intracitoplasmática (ICSI) é altamente desejável em vista do

ônus associado a gestações múltiplas. A seleção dos embriões para transferência é um passo crítico no tratamento de FIV/ICSI para reduzir o risco de gestação múltipla e aumentar as chances de probabilidade de gestar, especialmente quando apenas um embrião é transferido (Fisch, Rodriguez et al. 2001). A opção pelo dia de transferência de embrião ao útero é variável (Hu, Maxson et al. 1998; Sjoblom, Menezes et al. 2006).

No que diz respeito à qualidade embrionária, diversos fatores foram demonstrados que influenciam as taxas de gestação, incluindo a presença de fragmentos anucleares, de blastômeros irregulares e alterações no número de blastômeros. Diversos sistemas de classificação embrionária já foram propostos, desde 1986 (Puissant, Van Rysselberge et al. 1987; Terriou, Sapin et al. 2001).

Em estudo desenvolvido por Hu et al. 1998, os autores utilizaram um escore de classificação embrionária no qual eram avaliados (no dia 3 após fertilização): o número de células, tamanho e aspecto do blastômero e a presença ou não de fragmentação citoplasmática. Foram avaliadas 754 pacientes submetidas à FIV quanto às taxas de implantação, gestação e concepções múltiplas. A transferência de embriões com maior qualidade (maior escore) permite que um número menor deles seja transferido, visando reduzir taxas de gestações múltiplas, principalmente em mulheres com idade mais avançada (Hu, Maxson et al. 1998).

O desenvolvimento de embriões irmãos supranumerários no estágio de blastocisto também tem sido demonstrado como preditor de gestação no ciclo atual com embriões transferidos no dia 3 (Fisch, Milki et al. 1999). A morfologia

isolada do embrião no dia 3 não é bom preditor da qualidade do blastocisto (Graham, Han et al. 2000). Mais de 50% dos embriões derivados de pacientes submetidas à FIV com pobre prognóstico são geneticamente anormais (Gianaroli, Magli et al. 1997) e tanto quanto 40% dos blastocistos exibem algum mosaicismo cromossômico na massa celular interna (Magli, Jones et al. 2000). Esta alta taxa de disfunção genética correlaciona com o reportado previamente com taxas de conversão de blastocisto de 50% (Behr, Pool et al. 1999) bem como a observação clínica de que cerca de metade dos embriões visualizados no dia 3 não sobrevivem até o dia 5. O benefício da transferência de blastocisto no aumento da taxa de implantação tem sido atribuído por facilitar a seleção natural de boa qualidade embrionária (Fisch, Rodriguez et al. 2001).

Diversos marcos do desenvolvimento precoce, que podem ser importantes preditores de implantação e gestação, foram descritos, como simetria pronuclear, alinhamento nucleolar e halóide perinuclear (Scott and Smith 1998). Estes autores reportaram taxa de implantação de 15% em 97 pacientes, as quais poderiam ter sido elevadas para 28% em 48 pacientes cujos embriões tiveram um maior escore embrionário. Alguns autores reportaram taxa de gestação de 50% (22/44) se pelo menos um embrião transferido fosse padrão 0 (desenvolvimento normal), comparado com 9% (2/23) se apenas embriões padrão 1-5 (desenvolvimento anormal) fossem transferidos (Tesarik and Greco 1999).

A habilidade para identificar no terceiro dia quais embriões se desenvolverão até blastocisto oferece o potencial para incrementar a eficiência laboratorial enquanto mantém altas as taxas de implantação e gestação associadas à transferência de blastocisto.

O objetivo do estudo desenvolvido por Fisch et al foi avaliar a habilidade do escore de gradação embrionário de prever a conversão a blastocisto, gestação e implantação de uma grande coorte de embriões em estágio de clivagem derivados de pacientes submetidas à fertilização *in vitro* (Fisch, Rodriguez et al. 2001).

A cultura estendida de embriões para estágio de blastocisto tem sido utilizada para incrementar a seleção para viabilidade embrionária. O desenvolvimento de técnicas confiáveis de cultura de blastocisto tem permitido a transferência de menor número de embriões, redução nas taxas de gestação múltipla, enquanto mantém altas as taxas de gestação (Gardner, Vella et al. 1998; Milki, Fisch et al. 1999). Entretanto, cultura de blastocisto requer um meio especializado, o que pode incrementar custos laboratoriais. Além disso, estender tais culturas é frequentemente limitado à disponibilidade de espaço adequado nas incubadoras (Fisch, Rodriguez et al. 2001).

O GES baseia-se numa combinação da morfologia pronuclear, clivagem precoce e morfologia no terceiro dia após a fertilização para identificar embriões com alto potencial de conversão para blastocisto, gestação e implantação. A capacidade para prever, no terceiro dia após fertilização, quais embriões irão se desenvolver para blastocisto pode diminuir os custos laboratoriais referentes à cultura, incrementar eficiência e possibilitar a criopreservação precoce dos embriões supranumerários. Desde que embriões com alta pontuação no GES alcancem taxas de implantação e gestação comparáveis àsquelas observadas com a transferência de blastocisto, não se recomenda a transferência de mais de dois embriões com escore 90 – 100. Transferir um único embrião baseado num alto GES pode reduzir as taxas de



gestação múltipla em pacientes de alto risco, enquanto transferir 3 ou mais embriões pode ser apropriado em pacientes com somente embriões com baixo escore disponíveis. (Fisch, Rodriguez et al. 2001)

Em trabalho desenvolvido por Fisch et al, observou-se que não houve efeitos adversos na taxa de desenvolvimento de blastocisto nem com a remoção repetida dos embriões da incubadora para avaliação, de acordo com o método empregado de cultura embrionária utilizado naquele estudo. Também se observou que, se não houve fragmentação na primeira clivagem, a mesma não ocorreu no desenvolvimento subsequente (Fisch, Rodriguez et al. 2001).

### **Endometriose e fertilização in vitro**

Resultados conflitantes são freqüentes entre estudos de resultados de FIV em pacientes com endometriose (Pellicer, Valbuena et al. 1998; Barri, Coroleu et al. 2010; Coccia, Rizzello et al. 2011; Gryparis and Nardo 2011). Essas discrepâncias parecem ser multifatoriais, já que desfechos de FIV podem ser afetados pelo manejo das pacientes, estimulação, critérios de seleção, procedimentos laboratoriais e muitos outros fatores intrínsecos de cada instituição (Garrido, Navarro et al. 2002). O sucesso da FIV e da transferência embrionária é dependente de uma resposta ovariana adequada a uma estimulação gonadotrófica exógena (Al-Azemi, Killick et al. 2011). Barri *et al.* demonstraram que pacientes inférteis com endometriose devem submeter-se, como primeira opção, a tratamento cirúrgico. A combinação de cirurgia e FIV parece ser a melhor opção neste grupo de pacientes (Barri, Coroleu et al. 2010). Entretanto, o tratamento da endometriose com manejo conservador ou cirúrgico demonstrou ser efetivo no combate a alguns sintomas provocados

pela doença, com impacto real sobre a fertilidade ainda em estudo (Barnhart, Dunsmoor-Su et al. 2002).

Apesar de a endometriose estar associada a prejuízo da fertilidade, a sua presença por si só não impede completamente a concepção (Senapati and Barnhart 2011). Alguns estudos demonstraram a possibilidade de gestação espontânea depois de um ano de seguimento. Nos casos de endometriose leve, as taxas variaram entre 17% e 22% (Parazzini 1999; Barri, Coroleu et al. 2010), não excedendo 3% nos casos severos (Barri, Coroleu et al. 2010). A combinação de cirurgia, indução da ovulação associada à inseminação intra-uterina ou fertilização *in vitro* pode ser usada para auxiliar estas mulheres a gestar (Barri, Coroleu et al. 2010). Entre as técnicas de reprodução assistida, a FIV tem sido demonstrada como a de maior sucesso entre pacientes com endometriose (Barnhart, Dunsmoor-Su et al. 2002).

Em estudo desenvolvido por Coccia et al. (2008) foi demonstrado que, em pacientes com endometriose grau I – II, a taxa de fecundidade nos primeiros seis meses após laparoscopia foi de 27% e de 17% nos seis meses subseqüentes, não havendo diferença estatisticamente significativa. A taxa de fecundidade caiu significativamente para 4% após um ano do procedimento cirúrgico, e não houve concepção após 60 meses (Coccia, Rizzello et al. 2011).

A fertilização *in vitro* consiste em um ciclo de várias etapas, as quais devem ser avaliadas individualmente para o efeito da endometriose na função reprodutiva. A endometriose parece interferir com os desfechos de FIV através de diferentes efeitos e mecanismos (Barnhart, Dunsmoor-Su et al. 2002; Barri, Coroleu et al. 2010). Para estágio moderado/severo da doença, os efeitos

deletérios sobre os ciclos de FIV foram em termos de taxas de cancelamento de cirurgia e menores taxas de implantação. Estágios I e II apresentaram decréscimo significativo nas taxas de fertilização (Coccia, Rizzello et al. 2011).

Dados de revisão sistemática publicados em 2002 demonstraram que cada etapa do processo de FIV pode sofrer interferência pela presença da endometriose, desde o pico do nível de estradiol, o número de oócitos recuperados, fertilização, implantação e taxas de gestação. Os graus de severidade da doença impactaram nos desfechos reprodutivos, havendo associação fortemente negativa com EDT severa e número de oócitos recuperados por ciclo, taxas de implantação e gestação (Barnhart, Dunsmoor-Su et al. 2002).

O estudo da reserva ovariana também é parte decisiva no tratamento de infertilidade através de FIV e transferência embrionária. Há na literatura dados que sugerem que há similaridade entre endometriose e outras condições que afetam a reserva ovariana, como falência ovariana prematura e, conseqüentemente, entre os resultados de técnicas de reprodução assistida. Em pacientes com endometriose e reserva ovariana preservada, entretanto, pode-se observar prejuízo nos resultados de FIV. Este dado sugere que a presença da atividade inflamatória da doença em nível sérico ou fluido peritoneal pode ter alguma interferência (Halis and Arici 2004; Falconer, Sundqvist et al. 2009). Foi demonstrada também redução dos níveis séricos de AMH, hormônio mensurado na avaliação da reserva ovariana, em pacientes com endometriose, associada a coorte folicular heterogênea neste grupo de pacientes (Lemos, Arbo et al. 2008).

É necessário entendermos melhor as alterações que ocorrem no desenvolvimento oocitário e embrionário do ponto de vista fisiológico, para podermos propor esquemas de indução da ovulação mais racionais e buscar otimizar os resultados nestas pacientes inférteis com endometriose.

### **Endometriose e qualidade embrionária**

Embriões de boa qualidade (aqueles com capacidade de implantação e desenvolvimento apropriados) com certeza originam-se de oócitos de boa qualidade, os quais por sua vez originam-se de folículos com adequado ambiente condicionado pelo fluido folicular e células próximas, as quais são capazes de influenciar a progressão (Garrido, Navarro et al. 2002).

Diversos estudos sugerem que alterações no microambiente folicular ou problemas ovarianos intrínsecos podem ser responsáveis pela oogênese defeituosa e subsequente baixa qualidade oocitária, resultando em prejuízo nas taxas de fertilização ou pobre qualidade embrionária, com habilidade reduzida de implantação (Garrido, Navarro et al. 2002).

Em análise retrospectiva desenvolvida por Simón et al. 1994 e corroborada por Pellicer et al. 1998, sugere-se que a infertilidade em pacientes com endometriose pode estar relacionada a alterações oocitárias, as quais acabam resultando em embriões com decréscimo na habilidade de implantação. A doação de oócitos foi realizada por pacientes doadoras com e sem endometriose, para mulheres receptoras sem a doença, e ambas as situações foram comparadas. Foi observada redução significativa nas taxas de implantação naquelas pacientes que receberam oócitos de doadoras com

endometriose, quando comparadas às doadoras saudáveis (Simon, Gutierrez et al. 1994; Pellicer, Valbuena et al. 1998).

Um estudo retrospectivo comparou a qualidade dos embriões de mulheres com endometriose com a dos embriões de pacientes com infertilidade tubária. O número de blastômeros e o grau de fragmentação foram estabelecidos após 48 e 72 horas em cultura e não houve diferença entre os dois grupos em idade, número de oócitos recuperados, oócitos fertilizados e número médio de blastômeros após 48 horas. No entanto, após 72 horas, houve um significativo decréscimo no número de blastômeros em mulheres com endometriose comparadas com aquelas com infertilidade tubária (Garrido, Navarro et al. 2002). Alguns outros autores sugerem uma porcentagem mais alta de embriões anormais em pacientes com endometriose (estudos *in vitro*) (Brizek, Schlaff et al. 1995).

A redução na qualidade oocitária pode ser conseqüência de uma foliculogênese anormal. Consideráveis evidências em ciclos naturais suportam este conceito em pacientes com endometriose. Primeiro, a redução ocorre no pico sérico de concentração de estradiol e o tamanho do folículo dominante em mulheres com endometriose comparadas com controles (Pellicer, Valbuena et al. 1998; Barnhart, Dunsmoor-Su et al. 2002), bem como uma fase folicular maior em pacientes com endometriose. Em adição, alterações na secreção de LH foram previamente descritas nestas pacientes. Segundo, outros estudos têm demonstrado que a atividade da aromatase e o acúmulo de progesterona *in vitro* são prejudicados em células derivadas de pacientes com endometriose mínima e leve quando comparadas com controles (Pellicer, Valbuena et al. 1998). A função endócrina alterada nas células da granulosa observada nestas

pacientes, traduzidas pela baixa produção de progesterona e função da aromatase, podem ser demonstradas pelo dano ao corpo lúteo, o qual torna-se inapto a manter adequada produção de esteróide (Garrido, Navarro et al. 2002). Estas funções alteradas podem explicar, ao menos em parte, a redução na qualidade oocitária e um subsequente desempenho alterado dos embriões resultantes (Pellicer, Valbuena et al. 1998).

## **JUSTIFICATIVA**

Existe uma clara associação da endometriose com infertilidade; entretanto, o mecanismo desta em mulheres com tal moléstia permanece em estudo e desconhecido. O ambiente folicular é fator de estudo constante neste âmbito, e seu amplo conhecimento nas pacientes com endometriose pode auxiliar no manejo desta associação.

A seleção de embriões com maiores chances de implantação visa a obter índices de sucesso mais altos após sua transferência. Além disso, possibilita que um menor número de embriões seja transferido, reduzindo taxas de gestação múltipla.

Há poucos estudos prévios relatando a taxa de qualidade embrionária e sua associação com endometriose. O Escore de Gradação Embrionário é uma forma de avaliar a qualidade do embrião e permitir, então, a transferência daqueles com mais alta pontuação, na tentativa de aumentar taxas de sucesso de implantação/gestação.

É neste contexto que este estudo inédito se desenvolverá, a fim de comparar o escore embrionário em pacientes inférteis com e sem endometriose.

## **HIPÓTESE NULA**

A qualidade embrionária, medida pelo escore embrionário, é igual em mulheres com e sem endometriose submetidas à fertilização *in vitro*.



## **OBJETIVOS**

### **Principal**

Comparar a qualidade embrionária pela pontuação do Escore de Gradação Embrionário médio entre pacientes inférteis com endometriose com aquelas do grupo controle (infertilidade de causa tubo-peritoneal ou fator masculino).

### **Secundários**

Comparar o escore embrionário entre pacientes inférteis com endometriose com aquelas do grupo controle (infertilidade de causa tubo-peritoneal ou fator masculino).

Comparar o número de embriões transferidos entre pacientes inférteis com endometriose com aquelas do grupo controle (infertilidade de causa tubo-peritoneal ou fator masculino).

Comparar as taxas de implantação entre pacientes inférteis com endometriose com aquelas do grupo controle.

Comparar as taxas de fertilização entre pacientes inférteis com endometriose com aquelas do grupo controle.

Comparar as taxas de gestação entre pacientes inférteis com endometriose com aquelas do grupo controle.

Comparar a dose total de gonadotrofinas utilizadas para indução da ovulação entre pacientes inférteis com endometriose com aquelas do grupo controle.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1997). "Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1997." Fertil Steril **67**(5): 817-21.
- Al-Azemi, M., S. R. Killick, et al. (2011). "Multi-marker assessment of ovarian reserve predicts oocyte yield after ovulation induction." Hum Reprod **26**(2): 414-22.
- Andreoli, C. G., V. K. Genro, et al. (2011). "T helper (Th)1, Th2, and Th17 interleukin pathways in infertile patients with minimal/mild endometriosis." Fertil Steril **95**(8): 2477-80.
- Ballester, M., A. Oppenheimer, et al. (2011). "Nomogram to predict pregnancy rate after ICSI-IVF cycle in patients with endometriosis." Hum Reprod.
- Barnhart, K., R. Dunsmoor-Su, et al. (2002). "Effect of endometriosis on in vitro fertilization." Fertil Steril **77**(6): 1148-55.
- Barri, P. N., B. Coroleu, et al. (2010). "Endometriosis-associated infertility: surgery and IVF, a comprehensive therapeutic approach." Reprod Biomed Online **21**(2): 179-85.
- Barrier, B. F. (2010). "Immunology of endometriosis." Clin Obstet Gynecol **53**(2): 397-402.
- Behr, B., T. B. Pool, et al. (1999). "Preliminary clinical experience with human blastocyst development in vitro without co-culture." Hum Reprod **14**(2): 454-7.
- Blake, D. A., C. M. Farquhar, et al. (2007). "Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception." Cochrane Database Syst Rev(4): CD002118.
- Brizek, C. L., S. Schlaff, et al. (1995). "Increased incidence of aberrant morphological phenotypes in human embryogenesis--an association with endometriosis." J Assist Reprod Genet **12**(2): 106-12.
- Bulun, S. E. (2009). "Endometriosis." N Engl J Med **360**(3): 268-79.
- Buyuk, E., D. B. Seifer, et al. (2011). "Random anti-Mullerian hormone (AMH) is a predictor of ovarian response in women with elevated baseline early follicular follicle-stimulating hormone levels." Fertil Steril **95**(7): 2369-72.
- Cakmak, H. and H. S. Taylor (2011). "Implantation failure: molecular mechanisms and clinical treatment." Hum Reprod Update **17**(2): 242-53.
- Campos, C. S., D. Vaamonde, et al. "Follicular-fluid anti-Mullerian hormone concentration is similar in patients with endometriosis compared with non-endometriotic patients." Reprod Biomed Online **21**(4): 470-3.
- Coccia, M. E., F. Rizzello, et al. (2011). "Impact of endometriosis on in vitro fertilization and embryo transfer cycles in young women: a stage-dependent interference." Acta Obstet Gynecol Scand **90**(11): 1232-8.
- Cunha-Filho, J. S., J. L. Gross, et al. (2001). "Hyperprolactinemia and luteal insufficiency in infertile patients with mild and minimal endometriosis." Horm Metab Res **33**(4): 216-20.
- Cunha-Filho, J. S., J. L. Gross, et al. (2002). "Prolactin and growth hormone secretion after thyrotrophin-releasing hormone infusion and dopaminergic (DA2) blockade in infertile patients with minimal/mild endometriosis." Hum Reprod **17**(4): 960-5.
- Cunha-Filho, J. S., N. A. Lemos, et al. (2003). "Insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF binding protein-1 and -3 in the follicular fluid of infertile patients with endometriosis." Hum Reprod **18**(2): 423-8.

- Falconer, H., J. Sundqvist, et al. (2009). "IVF outcome in women with endometriosis in relation to tumour necrosis factor and anti-Mullerian hormone." Reprod Biomed Online **18**(4): 582-8.
- Fisch, J. D., A. A. Milki, et al. (1999). "Sibling embryo blastocyst development correlates with the in vitro fertilization day 3 embryo transfer pregnancy rate in patients under age 40." Fertil Steril **71**(4): 750-2.
- Fisch, J. D., H. Rodriguez, et al. (2001). "The Graduated Embryo Score (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage-stage embryos." Hum Reprod **16**(9): 1970-5.
- Galo, S., P. Zubor, et al. (2005). "[TNF-alpha serum levels in women with endometriosis: prospective clinical study]." Ceska Gynekol **70**(4): 286-90.
- Gardner, D. K., P. Vella, et al. (1998). "Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers." Fertil Steril **69**(1): 84-8.
- Garrido, N., J. Navarro, et al. (2002). "The endometrium versus embryonic quality in endometriosis-related infertility." Hum Reprod Update **8**(1): 95-103.
- Genro, V., C. Souza, et al. (2009). "The Graduated Embryo Score (GES) and Total Graduated Embryo Score (TGES) were not associated to endometriosis." Fertility & Sterility **92**(3)(Supplement): S112-S113.
- Gianaroli, L., M. C. Magli, et al. (1997). "Preimplantation genetic diagnosis increases the implantation rate in human in vitro fertilization by avoiding the transfer of chromosomally abnormal embryos." Fertil Steril **68**(6): 1128-31.
- Graham, J., T. Han, et al. (2000). "Day 3 morphology is a poor predictor of blastocyst quality in extended culture." Fertil Steril **74**(3): 495-7.
- Gryparis, I. and L. G. Nardo (2011). "Update in endometriosis and IVF." Minerva Ginecol **63**(6): 571-6.
- Gupta, S., J. M. Goldberg, et al. (2008). "Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility." Fertil Steril **90**(2): 247-57.
- Halis, G. and A. Arici (2004). "Endometriosis and inflammation in infertility." Ann N Y Acad Sci **1034**: 300-15.
- Hendarto, H., P. Prabowo, et al. (2009). "Growth differentiation factor 9 concentration in the follicular fluid of infertile women with endometriosis." Fertil Steril.
- Hendarto, H., P. Prabowo, et al. (2009). "Growth differentiation factor 9 concentration in the follicular fluid of infertile women with endometriosis." Fertil Steril **94**(2): 758-60.
- Herington, J. L., K. L. Bruner-Tran, et al. (2011). "Immune interactions in endometriosis." Expert Rev Clin Immunol **7**(5): 611-26.
- Hu, Y., W. S. Maxson, et al. (1998). "Maximizing pregnancy rates and limiting higher-order multiple conceptions by determining the optimal number of embryos to transfer based on quality." Fertil Steril **69**(4): 650-7.
- Kitajima, M., S. Defrere, et al. (2011). "Endometriomas as a possible cause of reduced ovarian reserve in women with endometriosis." Fertil Steril **96**(3): 685-91.
- Landazabal, A., E. Muñoz, et al. (1999). "Endometriosis and in vitro fertilization (IVF): a meta-analysis." Hum Reprod **14** (Abstract Book 1): 181 - 182.

- Lemos, N. A., E. Arbo, et al. (2008). "Decreased anti-Mullerian hormone and altered ovarian follicular cohort in infertile patients with mild/minimal endometriosis." Fertil Steril **89**(5): 1064-8.
- Lessey, B. A. (2011). "Assessment of endometrial receptivity." Fertil Steril **96**(3): 522-9.
- Leyendecker, G., G. Kunz, et al. (1998). "Endometriosis: a dysfunction and disease of the archimetra." Hum Reprod Update **4**(5): 752-62.
- Luna, M., A. B. Copperman, et al. (2008). "Human blastocyst morphological quality is significantly improved in embryos classified as fast on day 3 ( $\geq 10$  cells), bringing into question current embryological dogma." Fertil Steril **89**(2): 358-63.
- Magli, M. C., G. M. Jones, et al. (2000). "Chromosome mosaicism in day 3 aneuploid embryos that develop to morphologically normal blastocysts in vitro." Hum Reprod **15**(8): 1781-6.
- Milki, A. A., J. D. Fisch, et al. (1999). "Two-blastocyst transfer has similar pregnancy rates and a decreased multiple gestation rate compared with three-blastocyst transfer." Fertil Steril **72**(2): 225-8.
- Missmer, S. A., S. E. Hankinson, et al. (2004). "Incidence of laparoscopically confirmed endometriosis by demographic, anthropometric, and lifestyle factors." Am J Epidemiol **160**(8): 784-96.
- Olive, D. L., S. R. Lindheim, et al. (2003). "Endometriosis and infertility: what do we do for each stage?" Curr Womens Health Rep **3**(5): 389-94.
- Olovsson, M. (2011). "Immunological aspects of endometriosis: an update." Am J Reprod Immunol **66** Suppl 1: 101-4.
- Pal, L., J. L. Shifren, et al. (1998). "Impact of varying stages of endometriosis on the outcome of in vitro fertilization-embryo transfer." J Assist Reprod Genet **15**(1): 27-31.
- Parazzini, F. (1999). "Ablation of lesions or no treatment in minimal-mild endometriosis in infertile women: a randomized trial. Gruppo Italiano per lo Studio dell'Endometriosi." Hum Reprod **14**(5): 1332-4.
- Pellicer, A., D. Valbuena, et al. (1998). "The follicular endocrine environment in stimulated cycles of women with endometriosis: steroid levels and embryo quality." Fertil Steril **69**(6): 1135-41.
- Pouly, J. L., M. Canis, et al. (2007). "[Endometriosis related infertility]." J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) **36**(2): 151-61.
- Pouly, J. L. and L. Larue (2007). "[Are French results in assisted reproductive techniques so bad?]." Gynecol Obstet Fertil **35**(1): 30-7.
- Puissant, F., M. Van Rysselberge, et al. (1987). "Embryo scoring as a prognostic tool in IVF treatment." Hum Reprod **2**(8): 705-8.
- Rustamov, O., P. W. Pemberton, et al. (2011). "The reproducibility of serum anti-Mullerian hormone in subfertile women: within and between patient variability." Fertil Steril **95**(3): 1185-7.
- Sarapik, A., A. Velthut, et al. (2012). "Follicular proinflammatory cytokines and chemokines as markers of IVF success." Clin Dev Immunol **2012**: 606459.
- Scott, L. A. and S. Smith (1998). "The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval." Hum Reprod **13**(4): 1003-13.
- Senapati, S. and K. Barnhart (2011). "Managing Endometriosis-associated Infertility." Clin Obstet Gynecol **54**(4): 720-6.

- Shahine, L. K., R. O. Burney, et al. (2009). "Embryo quality before and after surgical treatment of endometriosis in infertile patients." J Assist Reprod Genet **26**(2-3): 69-73.
- Shebl, O., T. Ebner, et al. (2009). "Anti muellerian hormone serum levels in women with endometriosis: a case-control study." Gynecol Endocrinol **25**(11): 713-6.
- Simon, C., A. Gutierrez, et al. (1994). "Outcome of patients with endometriosis in assisted reproduction: results from in-vitro fertilization and oocyte donation." Hum Reprod **9**(4): 725-9.
- Sjoblom, P., J. Menezes, et al. (2006). "Prediction of embryo developmental potential and pregnancy based on early stage morphological characteristics." Fertil Steril **86**(4): 848-61.
- Smith, S., S. M. Pfeifer, et al. (2003). "Diagnosis and management of female infertility." JAMA **290**(13): 1767-70.
- Tanahatoc, S. J., P. G. Hompes, et al. (2003). "Investigation of the infertile couple: should diagnostic laparoscopy be performed in the infertility work up programme in patients undergoing intrauterine insemination?" Hum Reprod **18**(1): 8-11.
- Terriou, P., C. Sapin, et al. (2001). "Embryo score is a better predictor of pregnancy than the number of transferred embryos or female age." Fertil Steril **75**(3): 525-31.
- Tesarik, J. and E. Greco (1999). "The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology." Hum Reprod **14**(5): 1318-23.
- Toya, M., H. Saito, et al. (2000). "Moderate and severe endometriosis is associated with alterations in the cell cycle of granulosa cells in patients undergoing in vitro fertilization and embryo transfer." Fertil Steril **73**(2): 344-50.
- Vercellini, P., E. Somigliana, et al. (2009). "Surgery for endometriosis-associated infertility: a pragmatic approach." Hum Reprod **24**(2): 254-69.
- Wunder, D. M., J. Guibourdenche, et al. (2008). "Anti-Mullerian hormone and inhibin B as predictors of pregnancy after treatment by in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection." Fertil Steril **90**(6): 2203-10.

## ARTIGO

Este artigo foi submetido à Fertility and Sterility®.

## EVALUATION OF EMBRYO QUALITY (EMBRYO SCORE) IN WOMEN WITH ENDOMETRIOSIS

Caran JZ, Genro V, Souza C, Silva DS, Costa F, Martins ACM, Cunha-Filho JS

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Centro de Reprodução Humana Insemine; and Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Corresponding author: Juliana Zanrosso Caran, Rua Ramiro Barcelos, 2350 sala 1124, CEP 90035-003 Porto Alegre-RS-Brazil (FAX: 55-51-33598117; e-mail: jzcaran@yahoo.com.br).

## ABSTRACT

**Objective.** To determine embryo quality (Mean Graduated Embryo Score, MGES) in infertile patients with endometriosis submitted to *in vitro* fertilization (IVF-ET).

**Design.** Prospective cohort.

**Setting.** Private Human Reproduction Center.

**Patients.** We compared 706 embryos (162 patients) divided in two groups: 472 embryos derived from patients without endometriosis (n=109, infertile patients with tubal or male infertility) and 234 embryos from patients in study group (n=53, infertile patients with endometriosis).

**Interventions.** All patients were submitted to IVF using an estradiol-antagonist-recombinant FSH protocol for ovarian stimulation. MGES was performed evaluating all embryos three times: 16 – 18 hours, 25 – 27 hours and 64 – 67 hours, by the same embryologist. Embryo evaluation was performed according to the following parameters: fragmentation, nucleolar alignment, polar body apposition, blastomere number/morphology and symmetry.

**Main Outcome Measures.** MGES scores, fertilization, implantation and pregnancy rates.

**Results.** Groups were compared for age, body mass index (BMI), past ob/gyn characteristics (primary or secondary infertility, parity, abortions) and hormonal profile. Although the number of embryos transferred was greater in patients with endometriosis than in the control group ( $2.38 \pm 0.66$  versus  $2.15 \pm 0.54$ , respectively;  $P = 0.001$ ), the MGES was similar in both groups ( $71 \pm 19.8$  versus  $71.9 \pm 23.5$ , respectively;  $P = 0.881$ ). Likewise, fertilization rate was similar in groups, 61% in patients with endometriosis and 59% in control group ( $P=0,511$ ). Moreover, no significant differences were found in implantation rates (21% versus 22%, respectively [ $P=0,989$ ]) and in pregnancy rates (26,4% versus 28,4%, respectively [ $P=0,989$ ]). The severity of endometriosis did not influence the results.

**Conclusions.** Embryo quality measured by MGES was not influenced by endometriosis. Likewise, the reproductive outcomes evaluated were similar between infertile patients with and without endometriosis.

**Key Words.** Endometriosis; embryo quality; *In vitro* fertilization; embryo score.

## INTRODUCTION

Endometriosis is an enigmatic disorder that, in the most advanced stages, may cause structural damage and therefore influence a patient's fertility. It is largely accepted that the non-adhesive form (minimal-mild) of the disease is also associated with subfertility (Pouly, Canis et al. 2007; Barri, Coroleu et al. 2010). *In vitro* fertilization with embryo transfer (IVF-ET) has been prescribed in many cases of endometriosis-associated infertility and it has allowed us to study how this disease affects a patient's fertility (Falconer, Sundqvist et al. 2009; Barri, Coroleu et al. 2010).

Although previous studies about IVF outcomes showed controversial results (Hu, Maxson et al. 1998; Barnhart, Dunsmoor-Su et al. 2002; Shahine, Burney et al. 2009; Barri, Coroleu et al. 2010; Coccia, Rizzello et al. 2011), it has been shown that patients with endometriosis have altered hormonal status, luteal phase deficiency, altered folliculogenesis as well as oocyte dysfunction (Cunha-Filho, Gross et al. 2001; Garrido, Navarro et al. 2002; Lemos, Arbo et al. 2008) which may affect embryo quality.

Embryo quality evaluation for selection for transfer into the uterus is a critical step in IVF treatment to maximize the probability of pregnancy, especially when we choose to transfer only one embryo (Fisch, Rodriguez et al.



2001; Sjoblom, Menezes et al. 2006). Previous retrospective studies evaluated embryo quality in patients with endometriosis and observed a decrease in morphological parameters (Garrido, Navarro et al. 2002), as well as a higher percentage of abnormal embryos in these patients (Brizek, Schlaff et al. 1995).

The graduated embryo score (GES) is a system of classification that relies on a combination of pronuclear morphology, early cleavage and day 3 morphology used to identify which embryos have a high potential for blastocyst conversion, as well as a higher probability of implantation and pregnancy. The present system is based on embryo assessment in three evaluations post insemination and awards a total possible score of 100 points (Fisch, Rodriguez et al. 2001).

Since the association between endometriosis and infertility is not completely justified by anatomical changes, the purpose of this study is to verify if the embryo quality based on GES scoring is different between infertile patients with endometriosis (and in their degrees of severity) and patients in the control group (tubal or male infertility). In addition, this study proposes to evaluate and compare other reproductive outcomes, such as implantation, fertilization and pregnancy rates between the groups.

## **Materials and Methods**

### **Design**

We prospectively evaluated infertile patients undergoing treatment in the Insemine Center for Human Reproduction, Brazil.

### **Patients/methods**

From April, 2008 to October, 2011, 162 women underwent IVF-ET for the infertile treatment in our unit. Patients were divided into two groups according to the presence (study group) of endometriosis and absence (control group) of the disease.

The diagnosis of endometriosis was proven by laparoscopy and the severity of the disease was evaluated according to the criteria of American Society for Reproductive Medicine (ASRM) (1997).

The estradiol-antagonist-recombinant FSH protocol was used for ovulation induction in all patients. Briefly, estradiol 4 mg/day was initiated in the 20<sup>th</sup> day of the preceding cycle. Gonadotropin was initiated in a standard dose of 225 UI of recombinant FSH applied subcutaneously (SC) on the second day of the current cycle. From the 6<sup>th</sup> day of recombinant FSH therapy onwards, daily FSH doses were adjusted according to estradiol levels and/or the number of growing follicles. The hormonal serum levels of estradiol, progesterone and luteinizing hormone (LH) were evaluated, as well as the follicular response which was estimated by transvaginal ultrasound scans. The use of antagonist started on day 6 of the treatment cycle. When three or more follicles reached a size  $\geq 17$  mm, final oocyte maturation was induced with a subcutaneous injection of human chorionic gonadotropin (hCG). Oocyte pickup under general anesthesia followed 36 hours later. Embryo transfer was performed on day 3 after insemination.

The exclusion criteria were: endometrioma, poor response in ovulation induction, moderate/severe male factor, intracytoplasm sperm injection.

### **Embryo quality (embryo score)**

The GES was performed based on three evaluations occurring at 16 – 18 hours, 25 – 27 hours and 64 – 67 hours post insemination, by the same embryologist. The score was composed by the following criteria: nucleolar alignment along pronuclear axis, regular cleavage and degree of fragmentation at the first cell division, and cell number and morphology on day 3 after insemination. The maximum score was 100 (Fisch, Rodriguez et al. 2001). The mean score was calculated by sum of embryo scores divided by the number of obtained embryos; and mean transferred embryo score was calculated by the sum of GES divided by the number of transferred embryos.

### **Statistical Analysis**

Absolute data were analyzed with the chi-square or Fisher exact test. Continuous variables were compared using Student t test. Data were analyzed using the SPSS 18.0 software package. Significance was set at  $P < 0.05$ .

The sample size was calculated from a pilot study conducted in 2009, according to which it would require a sample of 37 patients in each group ( $n=74$ ) to obtain a significant difference ( $P\alpha$  of 5% and  $P\beta$  of 80%). In this pilot study, developed by Genro et al. 2009, there was a GES value of  $92 \pm 12$  in the control group without endometriosis, compared to  $85 \pm 9$  in those infertile patients with endometriosis. There was no significant difference between groups ( $P=0,643$ ) (Genro, Souza et al. 2009).

### **RESULTS**

During the study period, 706 fertilized embryos were produced from 162 patients undergoing IVF-ET procedure for infertility treatment, which 234 corresponded to patients with the diagnosis of endometriosis and 472 to those

from the control group. Of these, 360 were transferred to the uterus in the day 3 after insemination.

In the endometriosis group (n=53), patients were classified as having: grade I of severity (minimal EDT) 26 patients; 13, grade II (mild EDT); 5, grade III (moderate EDT); and 9 patients were classified for grade IV (severe EDT). Baseline characteristics in both groups are shown in Table 1 and the reproductive outcomes in Table 2. One thousand and nine oocytes were retrieved during the study period, of which 42% in study group (n=424) and 58% (n=858) in control group.

Groups were compared according to infertility characteristics (primary or secondary), with no significant difference between groups ( $P=0,295$ ). The abortion rate was similar in patients of control group (12.8%, n=14) and in those with endometriosis (13.2%, n=7). There was no statistically significant difference for this endpoint ( $P=0.767$ ).

The number of embryos obtained was similar in both groups (4,42/patient in study group and 4,33/patient in control group); the number of transferred embryos in patients with endometriosis ( $2.38 \pm 0.66$ ) was significantly higher when compared to the control group ( $2.15 \pm 0.54$ ) ( $P=0.001$ ).

The mean GES of transferred embryos was  $71 \pm 19.8$  in infertile patients with endometriosis and  $71.9 \pm 23.5$  in patients from the control group, and there was no significant difference ( $P=0.801$ ). When the different degrees of endometriosis were compared, this study found the following scores: grade I ( $66 \pm 18$ ; n=26/53); grade II ( $76.4 \pm 24.7$ ; n=14/53); grade III ( $70 \pm 9.2$ ; n=6/53); and grade IV ( $80 \pm 19.6$ ; n=10/53).

With regard to the GES of all embryos obtained, there was no difference when comparing the control and study groups, as well as when comparing patients with endometriosis according to the degree of severity of the disease. The observed values according to different grades were: grade I ( $62.3 \pm 21$ ); grade II ( $63.7 \pm 19$ ); grade III ( $63.8 \pm 20$ ); and grade IV ( $66.8 \pm 16$ ), with  $P=0,945$ .

In order to check for differences between groups we performed a secondary analysis considering that embryos with scores higher than 70 points have higher implantation rates (Fisch, Rodriguez et al. 2001). Among the 109 control patients, 42 (38.5%) had GES score greater than 70, compared with 20 patients from the 53 patients with endometriosis (37.7%). There was no significant difference between groups ( $P=0.888$ ).

The fertilization rate was similar between both groups, corresponding to 61% in patients with endometriosis and 59% in the control group ( $P=0.511$ ). Likewise, there was no difference between study and control groups in cleavage rates, which was 89% and 90%, respectively ( $P=0.713$ ). Among the patients with different degrees of endometriosis, the fertilization ( $P=0.976$ ) and cleavage rates were also similar ( $P=0,432$ ).

There was no statistically significant difference between patients with and without endometriosis with regard to implantation rates, corresponding to 21% and 22%, respectively ( $P=0.989$ ). The pregnancy rates were similar between groups ( $P=0.853$ ), with 14 positive cases in control group (26,4%) versus 31 in endometriosis patients (28,4%).

## **DISCUSSION**

Several studies suggest that endometriosis may impair fertility through different pathways, like hormonal unbalance, oocyte dysfunction and endometrial receptivity (Simon, Gutierrez et al. 1994; Garrido, Navarro et al. 2002; Pouly, Canis et al. 2007; Gupta, Goldberg et al. 2008; Senapati and Barnhart 2011). We have investigated if patients with this disease exhibit altered embryo quality when assessed by the GES score system. We have found that the presence of endometriosis in infertile patients undergoing IVF-ET does not affect MGES. There were no previous reports in the literature comparing the use of GES between infertile patients with and without endometriosis (with tubal or male infertility).

Altered embryo quality diagnosed by altered embryo development and embryo blockage in patients with endometriosis has been described in the literature by several authors (Brizek, Schlaff et al. 1995; Pellicer, Valbuena et al. 1998). Moreover this data has been supported by other studies regarding oocyte donation programs (Garrido, Navarro et al. 2002). However, recent studies have questioned this finding (Reinblat, Ishai et al. 2011). Embryo selection for transfer is a critical step in IVF treatment to optimize implantation rates and, finally, patient's pregnancy chance. Correctly evaluate embryo quality before transfer is, therefore, of critical importance (Fisch, Rodriguez et al. 2001; Terriou, Sapin et al. 2001; Sjoblom, Menezes et al. 2006; Luna, Copperman et al. 2008). Thus, understanding if and how endometriosis affects embryo quality may help clinicians in everyday decisions.

In our population, although the number of embryos obtained was similar between groups, we have transferred a higher number of embryos in patients with endometriosis. Although we have found no difference in implantation and

pregnancy rates, the initial choice for this management is based on existing data, which show strong evidence of lower implantation and pregnancy rates in this group of patients (Garrido, Navarro et al. 2002; Gupta, Goldberg et al. 2008; Coccia, Rizzello et al. 2011).

Successful implantation requires a functional embryo at the blastocyst developmental stage and a receptive endometrium that should be able to accept embryo attachment and development (Garrido, Navarro et al. 2002; Cakmak and Taylor 2011; Lessey 2011). The number of retrieved oocytes, fertilization rates and total number of transferred embryos were compared in infertile patients with and without endometriosis in a previous papers with conflicting results (Landazabal, Muñoz et al. 1999; Garrido, Navarro et al. 2002; Barnhart, Duns Moor-Su et al. 2002). Landazabal showed a significant decrease in pregnancy rates per cycle, per transfer, and in implantation rates in the group of women with endometriosis compared with tubal infertility (Landazabal, Muñoz et al. 1999). However, others have showed similar implantation rates between infertile patients with and without endometriosis (Cakmak and Taylor 2011). The heterogeneity of patients, the difficulty in standardizing laboratory routines and the presence of outcomes assessed in different ways between studies are limiting factors, and the results should be critically evaluated.

Endometriosis has a wide spectrum of symptoms, and there is no consensus about how the different stages of the disease may affect women's fertility (Pal, Shifren et al. 1998; Barri, Coroleu et al. 2010; Coccia, Rizzello et al. 2011). Our population is composed, predominantly, of patients with minimal and mild disease and we have not included patients with endometriomas. We have chosen to do to obtain a homogeneous sample representative of patients with

endometriosis, however it may have flattened our results and explain, at least in part, the lack of difference found in our sample. Moreover, patients with poor response towards ovarian stimulation had their cycles canceled before oocyte pickup and have been forcefully excluded from our sample since the analysis of embryo quality was not possible. This may mean that the most severe cases are not represented in our paper.

Furthermore, the embryo score we have chosen to use to evaluate embryo competence involves a lot of subjectivity. We have tried to control this factor by one single observer performing all analysis in our study. The development of a scoring method for embryo evaluation, on the third day after insemination or on blastocyst stage, with higher reproducibility may be necessary to detect more subtle differences.

In conclusion, the presence of endometriosis in infertile patients submitted for IVF-ET did not affect embryo quality when measured by GES. Further studies involving different scoring methods and mechanisms involved in subfertility in patients with endometriosis are necessary to explore our results.

## **REFERENCES**

Barnhart, K., R. Dunsmoor-Su, et al. (2002). "Effect of endometriosis on in vitro fertilization." Fertil Steril **77**(6): 1148-55.

Barri, P. N., B. Coroleu, et al. (2010). "Endometriosis-associated infertility: surgery and IVF, a comprehensive therapeutic approach." Reprod Biomed Online **21**(2): 179-85.



Brizek, C. L., S. Schlaff, et al. (1995). "Increased incidence of aberrant morphological phenotypes in human embryogenesis--an association with endometriosis." J Assist Reprod Genet **12**(2): 106-12.

Cakmak, H. and H. S. Taylor (2011). "Implantation failure: molecular mechanisms and clinical treatment." Hum Reprod Update **17**(2): 242-53.

Coccia, M. E., F. Rizzello, et al. (2011). "Impact of endometriosis on in vitro fertilization and embryo transfer cycles in young women: a stage-dependent interference." Acta Obstet Gynecol Scand **90**(11): 1232-8.

Cunha-Filho, J. S., J. L. Gross, et al. (2001). "Hyperprolactinemia and luteal insufficiency in infertile patients with mild and minimal endometriosis." Horm Metab Res **33**(4): 216-20.

Falconer, H., J. Sundqvist, et al. (2009). "IVF outcome in women with endometriosis in relation to tumour necrosis factor and anti-Mullerian hormone." Reprod Biomed Online **18**(4): 582-8.

Fisch, J. D., H. Rodriguez, et al. (2001). "The Graduated Embryo Score (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage-stage embryos." Hum Reprod **16**(9): 1970-5.

Garrido, N., J. Navarro, et al. (2002). "The endometrium versus embryonic quality in endometriosis-related infertility." Hum Reprod Update **8**(1): 95-103.

Genro, V., C. Souza, et al. (2009). "The Graduated Embryo Score (GES) and Total Graduated Embryo Score (TGES) were not associated to endometriosis." Fertility & Sterility **92**(3)(Supplement): S112-S113.

Gupta, S., J. M. Goldberg, et al. (2008). "Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility." Fertil Steril **90**(2): 247-57.

Hendarto, H., P. Prabowo, et al. (2009). "Growth differentiation factor 9 concentration in the follicular fluid of infertile women with endometriosis." Fertil Steril **94**(2): 758-60.

Hu, Y., W. S. Maxson, et al. (1998). "Maximizing pregnancy rates and limiting higher-order multiple conceptions by determining the optimal number of embryos to transfer based on quality." Fertil Steril **69**(4): 650-7.

Landazabal, A., E. Muñoz, et al. (1999). "Endometriosis and in vitro fertilization (IVF): a meta-analysis." Hum Reprod **14 (Abstract Book 1)**: 181 - 182.

Lessey, B. A. (2011). "Assessment of endometrial receptivity." Fertil Steril **96**(3): 522-9.

Luna, M., A. B. Copperman, et al. (2008). "Human blastocyst morphological quality is significantly improved in embryos classified as fast on day 3 ( $\geq 10$  cells), bringing into question current embryological dogma." Fertil Steril **89**(2): 358-63.

Pal, L., J. L. Shifren, et al. (1998). "Impact of varying stages of endometriosis on the outcome of in vitro fertilization-embryo transfer." J Assist Reprod Genet **15**(1): 27-31.

Pellicer, A., D. Valbuena, et al. (1998). "The follicular endocrine environment in stimulated cycles of women with endometriosis: steroid levels and embryo quality." Fertil Steril **69**(6): 1135-41.

Pouly, J. L., M. Canis, et al. (2007). "[Endometriosis related infertility]." J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) **36**(2): 151-61.

Reinblatt, S. L., L. Ishai, et al. (2011) "Effects of ovarian endometrioma on embryo quality." Fertil Steril 95(8):2700-2.

Senapati, S. and K. Barnhart (2011). "Managing Endometriosis-associated Infertility." Clin Obstet Gynecol 54(4): 720-6.

Shahine, L. K., R. O. Burney, et al. (2009). "Embryo quality before and after surgical treatment of endometriosis in infertile patients." J Assist Reprod Genet 26(2-3): 69-73.

Simon, C., A. Gutierrez, et al. (1994). "Outcome of patients with endometriosis in assisted reproduction: results from in-vitro fertilization and oocyte donation." Hum Reprod 9(4): 725-9.

Sjoblom, P., J. Menezes, et al. (2006). "Prediction of embryo developmental potential and pregnancy based on early stage morphological characteristics." Fertil Steril 86(4): 848-61.

Terriou, P., C. Sapin, et al. (2001). "Embryo score is a better predictor of pregnancy than the number of transferred embryos or female age." Fertil Steril 75(3): 525-31.

**Table 1.** Characteristics of control and endometriosis groups (mean  $\pm$  standard deviation) (n=162)

	Control group N = 109	Endometriosis group N = 53	<i>P</i> *
Age (years)	33,6 $\pm$ 5,61	33,0 $\pm$ 3,84	0,43
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23,6 $\pm$ 3,96	23,8 $\pm$ 2,93	0,80
Menarche (years)	12,5 $\pm$ 1,5	12,5 $\pm$ 1,2	0,90
Parity (n)	0,43 $\pm$ 0,82	0,17 $\pm$ 0,43	0,29
Abortion (n)	0,16 $\pm$ 0,46	0,15 $\pm$ 0,41	0,76
Time of infertility (months)	47,5 $\pm$ 45,3	48,5 $\pm$ 31,2	0,89

BMI: body mass index. \* Student t Test .

**Table 2.** Reproductive aspects of control group and endometriosis group (mean  $\pm$  standard deviation) (n=162)

	Control group N = 109	Endometriosis group N = 53	<i>P</i> *
AFC (n)	11,6 $\pm$ 6,9	11,5 $\pm$ 4,8	0,93
FSH (mUI/mL)	7,4 $\pm$ 4,6	6,4 $\pm$ 2,0	0,62
TSH (mUI/mL)	2,51 $\pm$ 1,77	2,28 $\pm$ 1,18	0,38
Prolactin (ng/mL)	17,9 $\pm$ 12,9	14,4 $\pm$ 7,3	0,50
Estradiol (pg/mL)	61,3 $\pm$ 43,2	46,5 $\pm$ 25,1	0,25
Total gonadotropin dose (UI)	2634 $\pm$ 785,8	2777 $\pm$ 711,8	0,27
Number of oocytes retrieved (n)	8,48 $\pm$ 4,2	8,38 $\pm$ 3,1	0,86

AFC: antral follicle count; FSH: follicle stimulating hormone; TSH: thyroid stimulating hormone. \* Student t Test

## **CONCLUSÃO**

Não houve diferença no Escore de Gradação Embrionário entre pacientes inférteis com endometriose e sem essa condição (representantes do grupo controle com infertilidade de causa tubo-peritoneal ou fator masculino), em embriões avaliados no dia 3 após fertilização.

O número de embriões transferidos foi significativamente maior nas pacientes com endometriose quando comparadas ao grupo controle.

As taxas de implantação foram semelhantes entre o grupo em estudo e o grupo controle.

As taxas de fertilização foram semelhantes entre o grupo em estudo e o grupo controle.

As taxas de gestação foram semelhantes entre o grupo de pacientes inférteis com endometriose e o grupo controle.

Não houve diferença estatisticamente significativa na dose total de gonadotrofinas utilizada pelo grupo com endometriose quando comparado ao grupo controle.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Aprimorar o conhecimento sobre o ambiente folicular e o desenvolvimento oocitário para compreendermos melhor todas as suas fases e determinar os fatores que podem influenciar nessas etapas, como por exemplo, a presença de endometriose, deve ser foco constante de pesquisa. A fase não gonadotrófica do desenvolvimento folicular permanece pouco compreendida e suas características ainda não estão estabelecidas em pacientes com endometriose.

O fluido folicular é o ambiente do oócito durante seu desenvolvimento e maturação. A composição do fluido folicular pode influenciar e/ou determinar a qualidade oocitária. A concentração de hormônios esteróides, hipofisários, citocinas e fatores de crescimento no fluido folicular tem sido correlacionada com o desenvolvimento oocitário, desfechos de fertilização e desenvolvimento inicial pós-fertilização.

O conceito mais importante que emerge é de que o oócito não é passivo no folículo ovariano, mas, ao contrário, é um regulador fundamental da diferenciação e função das células somáticas e exerce um papel central na regulação da foliculogênese e, por meio disso, do seu próprio desenvolvimento.

O GDF-9 (*growth differentiation factor-9*) e o GDF-9B ou BMP-15 (*bone morphogenetic protein-15*) são fatores de crescimento derivados do oócito. Fazem parte da superfamília TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ), bem como o hormônio antimulleriano (AMH). Deleções ou mutações do GDF-9 ou BMP-15 podem afetar grandemente a fertilidade. Alterações no BMP-15 em camundongos expôs à disfunção das células do *cumulus oophorus*, e no GDF-

9, à falha na foliculogênese. Estes fatores de crescimento são, portanto, importantes não só na foliculogênese inicial, mas também como potentes mediadores da diferenciação de células da granulosa.

Diversas pesquisas têm revelado alguns discernimentos sobre o diálogo que ocorre entre o oócito e as células da granulosa, aumentando o entendimento da importância dos fatores intra-ovarianos (parácrinos ou autócrinos) na regulação da foliculogênese e na aquisição de competência e maturação para o desenvolvimento oocitário. Estes fatores atuam, como consequência, na qualidade embrionária e desfechos reprodutivos.

O estudo da endometriose associada à infertilidade é uma linha de pesquisa com amplo espectro de resultados, em vista de uma grande diversidade de apresentações da doença bem como de um conhecimento ainda restrito de suas vias patogênicas. Um melhor entendimento do impacto desta patologia no ambiente folicular e na resposta oocitária às células da granulosa é uma perspectiva em nossa linha de pesquisa.



## **ANEXOS/APÊNDICES**

Anexo 1: Classificação da Endometriose segundo a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva

Anexo 2: Escore de Gradação Embrionário

Apêndice 1: Instrumento de coleta de dados

Apêndice 2: Fotos de embriões com as respectivas pontuações

Apêndice 3: Protocolo de manipulação dos embriões

Apêndice 4: Protocolo de indução da ovulação (padrão)

Apêndice 5: Tabela 1 do artigo

Apêndice 6: Tabela 2 do artigo

## Anexo 1: Classificação da Endometriose segundo a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (1997)

PONTUAÇÃO: estágio I (Mínima): 1-5; estágio II (Leve): 6-15; estágio III (Moderada): 16-40; estágio IV (Severa): > 40 - PONTUAÇÃO TOTAL:

Laparoscopia:

Laparotomia:

Tratamento Recomendado:

Prognóstico:

PERTÚNIO	ENDOMETRIOSE		< 1 cm	1 - 3 cm	> 3 cm
			Superficial	1	2
		Profunda	2	4	6
OVÁRIOS	D	Superficial	1	2	4
		Profunda	4	16	20
	E	Superficial	1	2	4
		Profunda	4	16	20
OBLITERAÇÃO DO FUNDO DE SACO POSTERIOR			Parcial 4	Completa 40	
ADERÊNCIAS			Envolvendo < 1/3	Envolve 1/3 - 2/3	Envolvendo > 2/3
OVÁRIOS	D	Finas	1	2	4
		Densas	4	8	16
	E	Finas	1	2	4
		Densas	4	8	16
TROMPAS	D	Finas	1	2	4
		Densas	4	8	16
	E	Finas	1	2	4
		Densas	4	8	16

Se a porção fimbrial da trompa estiver completamente obstruída, altere a pontuação para 16.

## Anexo 2: ESCORE DE GRADUAÇÃO EMBRIONÁRIO

Avaliação	Horas após inseminação	Parâmetro de desenvolvimento	Escore
1	16 – 18	Alinhamento do nucléolo ao longo do eixo pronuclear	20
2	25 – 27	Clivagem regular e simetria	30
		Fragmentação: <sup>a</sup>	
		ausente	30
		< 20%	25
		> 20%	0
3	64 – 67	Número de células e grau <sup>b</sup> :	
		7, I; 8, I; 9, I	20
		7, II; 9 II; 10, I; 11, I;	10
Escore total			100

<sup>a</sup>: Se não houve clivagem até 25 – 27 horas, o grau de fragmentação foi avaliado no tempo 64 – 67 horas.

<sup>b</sup>: Grau 1: blastômeros simétricos e ausência de fragmentação; grau 2: blastômeros desiguais/irregulares e fragmentação < 20%; grau 3: blastômeros irregulares e fragmentação > 20%.

Modificado de Fisch, J. D., H. Rodriguez, et al. (2001). "The Graduated Embryo Score (GES, #1155) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage-stage embryos." Hum Reprod **16**(9): 1970-5.

## Apêndice 1: INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

### PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS

Código..... ( ) E ( ) C Fator masculino ( ) Fator tubário ( )

Endometriose ( ) Mínima ( ) Leve ( ) Moderada ( ) Severa

Idade ..... Anos Menarca ..... Anos

Peso ..... Kg Altura ..... IMC ..... Kg/m<sup>2</sup>

Paridade ( ) G ( ) P ( ) C ( ) A ( ) E

Infertilidade ( ) primária ( ) secundária

Tempo de infertilidade ..... meses

#### Avaliação Hormonal

FSH ..... TSH .....

prolactina ..... E2 .....

#### Ecografia

contagem dos folículos antrais .....

Protocolo de indução da ovulação: Dose de gonadotrofinas ..... UI

Desfechos reprodutivos:

Oócitos: ..... Embriões: ..... ET: .....

Score ET: ..... Escote total: .....

**Apêndice 2: Figura 1. Fotos de embriões com as respectivas pontuações.**



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)



(g)

**Figura 1.** (a) Embrião de 20 pontos. Apresentou 2 pronúcleos entre 16-18 horas pós inseminação. Houve fragmentação após esse período. (b) Embrião de 40 pontos. (c) Embrião de 60 pontos. (d) Embrião de 80 pontos. (e) (f) (g) Embriões de 100 pontos.

Créditos: Daniela Scherer da Silva, Médica Veterinária, Embriologista do Centro de Reprodução Humana Insemine.

### **Apêndice 3: Protocolo de manipulação dos embriões.**

#### **Procedimento de Inseminação**

1. Inseminar cada gota de 100µL (5 oócitos por gota) da placa de FIV, onde estão os oócitos, com cerca de 100000 espermatozóides (150000 no máximo), em um volume máximo de 4µl, sob lupa estereomicroscópica.

2. Incubar a placa (atmosfera a 6,0% de CO<sub>2</sub> em ar, 37°C e 100% de umidade relativa do ar) no intervalo de 5 – 18 horas.

#### **Procedimento de Cultivo**

1. Preparar no dia anterior à punção: placa de lavagem (placa de 60x15mm, com 9 gotas de 100µl de G1 PLUS, sob óleo mineral; placa de inseminação (placa de 60x15mm, com 6 gotas de 100µl de G-IVF PLUS, sob óleo mineral); equilibrar o meio e as gotas, em atmosfera a 6,0% de CO<sub>2</sub> em ar, a 37°C e 100% de umidade relativa do ar, no dia anterior a utilização.

2. Passar os oócitos, pelas gotas de lavagem com auxílio de estripper.

3. Dissociar sob lupa, as células da corona com ajuda do stripper.

4. Colocar cada oócito desnudo em cada gota da placa de CIV.

#### **Avaliação da Fecundação**

1. Observar os oócitos inseminados cerca de 16-18 horas após inseminação.

2. Avaliar a fecundação identificando a presença de 2 pronúcleos (PN) e a presença de 2 corpúsculos polares no espaço perivitelino conforme critério de pontos (GES).

3. Separar os oócitos sem PN ou zigotos com número diferente de 2 PN.

Incubar.

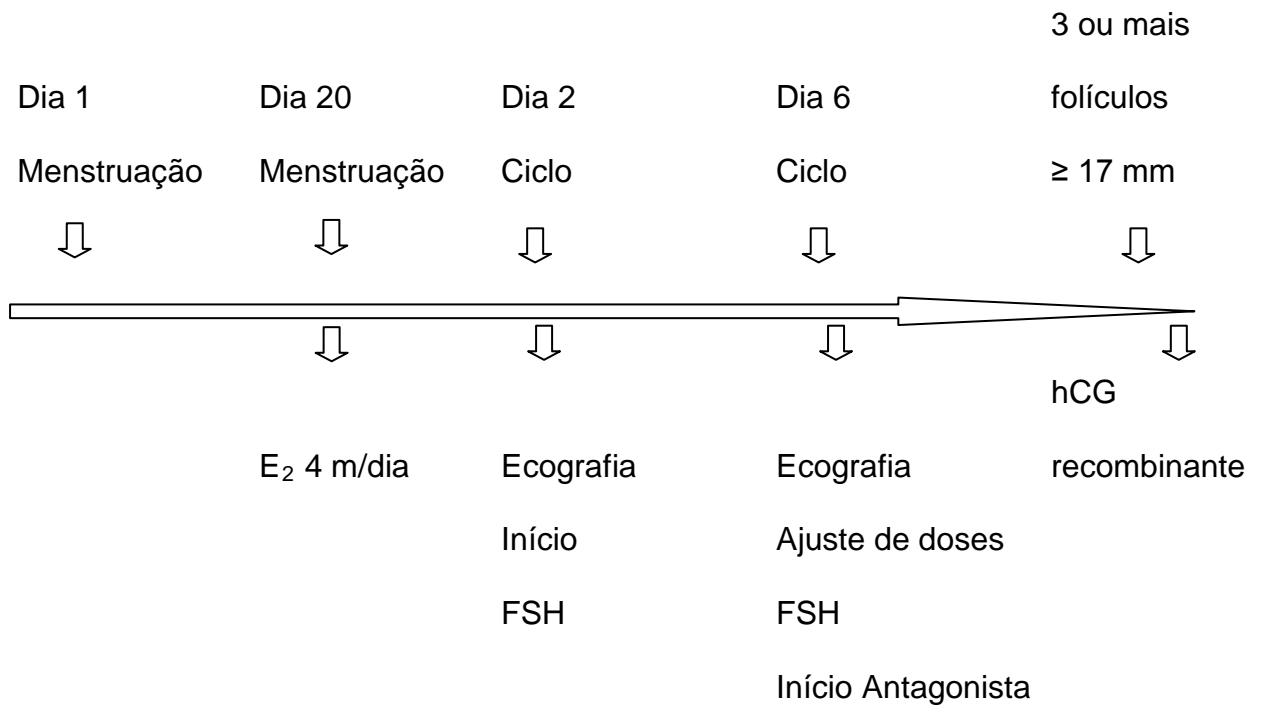
## **Avaliação da Clivagem**

1. Observar clivagem precoce 25 – 27 horas após a inseminação.
2. Não observando clivagem precoce, avaliar nas 48 horas.

A avaliação do desenvolvimento embrionário baseia-se na classificação do GES.



**Apêndice 4: Protocolo de indução da ovulação.**



## Apêndice 5: Tabela 1 do artigo

**Tabela 1.** Características das pacientes do grupo controle e das pacientes portadoras de endometriose (média ± desvio padrão) (n=162)

	Grupo controle N = 109	Grupo endometriose N = 53	<i>P</i>
Idade (anos)	33,6 ± 5,61	33,0 ± 3,84	0,43
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	23,6 ± 3,96	23,8 ± 2,93	0,80
Menarca (anos)	12,5 ± 1,5	12,5 ± 1,2	0,90
Paridade (n)	0,43 ± 0,82	0,17 ± 0,43	0,29
Aborto (n)	0,16 ± 0,46	0,15 ± 0,41	0,76
Tempo de infertilidade (meses)	47,5 ± 45,3	48,5 ± 31,2	0,89

IMC: índice de massa corporal. \* Test t Student.

## Apêndice 6: Tabela 2 do artigo

**Tabela 2.** Aspectos reprodutivos das pacientes do grupo controle e das portadoras de endometriose

	Grupo controle N = 109	Grupo endometriose N = 53	<i>P</i> *
AFC (n)	11,6 ± 6,9	11,5 ± 4,8	0,93
FSH	7,4 ± 4,6	6,4 ± 2,0	0,62
TSH	2,51 ± 1,77	2,28 ± 1,18	0,38
Prolactina	17,9 ± 12,9	14,4 ± 7,3	0,50
Estradiol	61,3 ± 43,2	46,5 ± 25,1	0,25
Dose total de gonadotrofinas	2634 ± 785,8	2777 ± 711,8	0,27
Número de oócitos capturados	8,48 ± 4,2	8,38 ± 3,1	0,86

AFC: antral follicle count; FSH: follicle stimulating hormone; TSH: thyroid stimulating hormone. \* Test t Student