

Co-Cultura de Embriões Humanos em Células Vero e Transferência em Fase de Blastocisto

Human Embryo Coculture in Vero Cells and Blastocyst Stage Transfer

Carlos Gilberto Almodin, Lis Andréia Pereira, Vania Cibele Minguetti- Câmara

RESUMO

Objetivos: *determinar se o dia da transferência ou o estágio em que o embrião é transferido interferem nas taxas de gravidez e implantação.*

Métodos: *cento e sete pacientes tiveram seus oócitos aspirados e submetidos à fertilização in vitro. Os embriões foram co-cultivados em células Vero e transferidos no dia 3 ou dia 5 pós-fertilização, após avaliação morfológica.*

Resultados: *a taxa de implantação dos embriões transferidos no dia 5 foi significativamente maior que quando os embriões eram transferidos no dia 3, mas as taxas de gravidez não variaram. Observou-se uma diferença significativa nas taxas de gravidez quando se comparou o estágio em que o embrião era transferido, obtendo-se 70,6% de gravidez quando se transferiam blastocistos expandidos e 20,0% e 10,5% quando eram transferidos blastocistos iniciais ou mórulas, respectivamente.*

Conclusões: *as taxas de implantação e gravidez são significativamente aumentadas quando se transferem embriões em estágio de blastocisto expandido, mas os meios e condições de cultura de que dispomos no momento ainda são insuficientes para nos fornecer uma taxa satisfatória de embriões neste estágio.*

PALAVRAS-CHAVE: Infertilidade. Fator Masculino. Fertilização *in vitro*.

Introdução

Desde que se iniciou a utilização de fertilização *in vitro* (FIV) há vinte anos, temos convivido com índices de gestação insatisfatórios. O aprimoramento dos conhecimentos a respeito de fisiologia reprodutiva tem proporcionado várias modificações nos processos pioneiros, propiciando melhoria na recuperação de oócitos e nas taxas de fertilização e clivagem, além de congelamento e manuseio com número muito pequeno de espermatozoides, porém a taxa de prenhez tem sido baixa. Na última década tem havido esforços no aprimoramento dos meios de cultura e no entendimento da interação embrião-endométrio, levando ao conhecimento de que o momento mais

apropriado e fisiológico para o embrião estar na cavidade uterina seria ao redor do quinto ou sexto dia após sua extrusão do ovário, em estágio de blastocisto^{1,2,3,4}.

Na fertilização *in vitro* os embriões são rotineiramente transferidos para o útero no dia 2 ou 3 de desenvolvimento, sendo os resultados de taxa de implantação e gravidez muito baixos. A transferência dos embriões no dia 5 ou 6 parece aumentar o sucesso da FIV por embrião transferido, não somente por haver uma melhor sincronização entre o estágio do embrião e o desenvolvimento endometrial, mas também por permitir uma seleção dos melhores embriões. Além disso, pode-se transferir poucos embriões sem afetar as taxas de gravidez e reduzir o risco de gravidez múltipla⁵.

Vários autores têm realizado cultura de longa duração com embriões de animais, porém os meios de cultura atuais não têm sido capazes de manter o desenvolvimento embrionário esperado. Na tentativa de se conseguir desenvolvimento em cultura de longa duração, alguns autores iniciaram

Materbaby – Reprodução Humana e Genética
Maringá – PR.

Correspondência:
Carlos Gilberto Almodin
Av. XV de Novembro 1232
87013-230 – Maringá – PR

o cultivo de embriões com outros tipos celulares, na expectativa de melhoria nas condições de cultura e conseqüentemente melhor desenvolvimento embrionário. Já foram relatados co-cultivos com as células da granulosa⁶, células endometriais homólogas e heterólogas, células endossalpingianas humanas e bovinas^{7,8}, sendo atualmente mais utilizadas as células Vero - células da cápsula renal de macaco Rhesus^{5,9,10}. Há consenso entre a maioria dos autores de que o co-cultivo aumenta a probabilidade de obtermos o desenvolvimento a blastocisto até o quinto ou sexto dia de cultura, ocorrendo uma seleção embrionária e aumentando a taxa de gravidez por embrião transferido^{9,11,12}.

Relatamos aqui os resultados obtidos em dois grupos de pacientes cujos embriões foram submetidos a co-cultivo com células Vero, comparando-se a transferência embrionária no dia três e dia cinco ou seis após a colheita dos oócitos.

Pacientes e Métodos

Este estudo envolveu 107 pacientes com idade entre 21 a 45 anos, atendidas durante o período de maio de 1997 a janeiro de 1999, que tiveram seus embriões co-cultivados em células Vero (células da cápsula renal de macacos Rhesus). A causa da infertilidade em 60 casos foi o fator masculino. Nos casos restantes, as causas de infertilidade feminina incluíram endometriose (6 casos), fator tubário (11 casos) e esterilidade sem causa aparente (27 casos). A inclusão das pacientes no estudo ocorreu após avaliação propedêutica de rotina e com consentimento prévio dos casais, além do aval da comissão de ética do serviço em que o trabalho foi realizado.

As pacientes foram divididas em dois grupos: aquelas cujos embriões foram co-cultivados em células Vero e transferidos para o útero no dia 3 pós-fertilização e aquelas cujos embriões foram mantidos 5 a 6 dias em co-cultivo até a transferência.

A estimulação ovariana foi iniciada com acetato de leuprolida (Lupron; TAP Pharmaceutical, Abbott Laboratories, Chicago, USA), 0,15 ml/dia entre o vigésimo primeiro e o vigésimo terceiro dia do ciclo menstrual sendo administrado até o início da menstruação seguinte. No terceiro dia de sangramento era iniciada a indução, com redução do Lupron para 0,05 ml/dia, e a estimulação ovariana era iniciada com hormônio foliculo-estimulante (Metrodin; Serono, São Paulo), 150-225 UI/dia, associado à gonadotrofina menopausal humana (Pergonal; Serono, São

Paulo), 75-225 UI/dia. O crescimento folicular foi monitorado somente por ultra-sonografia endovaginal. A gonadotrofina coriônica humana (hCG, 10.000 UI; Profasi, Serono, São Paulo) foi administrada quando pelo menos 3 folículos com 20 mm de diâmetro foram observados. Os oócitos foram aspirados 34-36 horas após a injeção de hCG usando punção ovariana transvaginal guiada pelo ultra-som.

Os oócitos colhidos foram lavados em D-PBS (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY, USA), transferidos para placas contendo meio de cultura Menezzo B2 (Laboratoire CCD, Paris, França) e mantidos em incubadora (Forma modelo 3159) a 37°C, com atmosfera contendo 5% de CO₂ e umidade de 97%. O sêmen foi preparado utilizando gradiente descontínuo de Percoll (55/90%; Pharmacia, Uppsala, Sweden). Nos casos de esterilidade por fator masculino os oócitos foram submetidos à injeção intracitoplasmática. Tal procedimento era realizado 3 a 6 horas após a coleta dos oócitos, quando estes eram desnudados com o auxílio de hialuronidase (H-3757 Sigma). Nos casos em que os parâmetros do sêmen eram adequados, foi realizada a inseminação dos oócitos com 100.000 espermatozóides/ml. Quando realizada a micromanipulação utilizava-se protocolo já descrito exaustivamente na literatura^{13,14}.

A confirmação da fecundação era verificada 15 a 18 horas após a fertilização e entre 5 a 6 embriões com 2 pró-núcleos eram depositados sobre a monocamada de células Vero cultivadas em meio de cultura Menezzo B2 com 10% de soro sintético (Irvine Scientific, USA). As pacientes que apresentaram mais que 5 embriões com 2 pró-núcleos, tiveram o restante de seus embriões congelados, segundo protocolo proposto por Check et al.¹³.

As placas contendo células Vero eram preparadas previamente, sendo descongeladas ou repicadas a partir de outros frascos mantidos em estufa. Quando descongeladas, as células eram lavadas e diluídas de modo a obter-se uma concentração de 200.000 a 400.000/ml. O repique era realizado com o auxílio de tripsina (T- 8642, Sigma) que descolava as células do fundo do frasco, sendo posteriormente lavadas e diluídas adequadamente. Eram mantidas a 37°C e 5% de CO₂, alcançando a confluência de células dentro de 48 horas.

Os embriões eram mantidos em co-cultivo até o dia 3 pós-fertilização, quando ou eram transferidos para a cavidade uterina ou era feita troca de cerca de 70% de seu meio de cultura por

meio novo, sendo então mantidos até o dia 5. A transferência uterina somente era realizada neste dia quando pelo menos um dos embriões tivesse atingido o estágio de blastocisto, caso contrário eles eram mantidos por mais um dia em cultura. Para a transferência eram selecionados apenas os embriões que não apresentassem sinal de bloqueio no desenvolvimento, sendo transferidos no máximo 2 blastocistos expandidos. Quando havia mais de 2 blastocistos, estes eram congelados, segundo protocolo proposto por Mênêzo et al.¹⁵.

A fase lútea foi suplementada com 50 mg/dia im de progesterona, 16 mg/dia de metilpred-nisolona e 80 mg/dia de ácido acetilsalicílico. A gravidez foi definida pela presença de gestação viável e batimento cardíaco presentes após a 13ª semana pós-transferência.

A significância estatística foi estimada usando o teste do χ^2 . Adotou-se o nível de significância de 0,05 ($\alpha = 5\%$). Níveis descritivos (p) inferiores a esse valor foram considerados significantes.

Resultados

Das 107 pacientes incluídas neste estudo, 55 tiveram seus embriões transferidos no dia 3 pós-fertilização (Grupo 1) e 51 no dia 5 (Grupo 2). Foram colhidos 398 oócitos das pacientes do Grupo 1, dos quais 59 (15%) foram descartados por serem imaturos ou apresentarem morfologia inadequada. Dos 339 oócitos que foram inseminados e ou injetados, foram obtidos 233 pré-embriões com 2 pró-núcleos (68,8%), sendo 163 (70,0%) colocados em co-cultivo, até o dia 3 e o restante (70/30,0%) congelado. Dos embriões que permaneceram em co-cultivo houve transferência de 176 (89,3%) para as pacientes, correspondendo a uma média de $3,2 \pm 1,5$ de embriões transferidos por paciente. Dezoito pacientes das 51 que tiveram embriões transferidos no dia 3 engravidaram (35,3%). Para 4 pacientes das quais não se obteve embriões viáveis para serem transferidos a taxa de implantação foi de 14% (Tabela 1).

Das pacientes do Grupo 2 foram colhidos 434 oócitos e, desses, 349 foram inseminados e ou injetados e os restantes não foram utilizados por apresentarem alterações (20,0%), levando portanto à obtenção de 244 embriões (70,0%). Destes, 161 (66,0%) foram mantidos em co-cultivo por 5 a 6 dias, sendo o restante congelado (83/34,0%). Apenas 108 embriões foram transferidos após o término da co-cultura, o que corresponde a uma

média de $2,1 \pm 1,5$ embriões transferidos por paciente. Neste grupo o número de embriões transferidos foi menor quando comparado com os transferidos no dia 3, mas não houve diferença na taxa de gravidez. Das 46 pacientes que receberam transferência no dia 5 da co-cultura, 16 engravidaram (34,8%). Em 3 casos não houve embriões viáveis para a transferência e em 2 casos não houve recuperação dos oócitos. A taxa de implantação (24%) foi significativamente diferente quando comparada com a obtida no Grupo 1 (Tabela 1).

Tabela 1 - Efeito do dia de transferência sobre a taxa de implantação e de gravidez.

	Dia 3	Dia 5
Número de pacientes	55	51
Média de idade (\pm DP) em anos	$32,5 \pm 4,4$	$33,1 \pm 5,0$
Média do número de oócitos colhidos (\pm DP)	$7,2 \pm 3,8$	$8,5 \pm 6,3$
Média do número de oócitos fertilizados (\pm DP)	$4,2 \pm 2,9$	$4,8 \pm 3,9$
Média do número de embriões transferidos (\pm DP)	$3,2 \pm 1,5^*$	$2,1 \pm 1,5^*$
Taxa de gravidez clínica / transferência (%)	35,3 β	34,8 β
Taxa de implantação (%)	14 #	24 #

* p < 0,001

β , # diferença não-significante

Foram obtidos 47 blastocistos/zigoto, quando os embriões permaneciam por 5 dias em cultura, atingindo-se uma taxa de blastulação de 29,4%, sendo que 32 destes (19,9%) eram blastocistos expandidos. Das 51 pacientes em estudo, 17 tiveram transferência uterina de embriões no estágio de blastocisto expandido. Doze destas pacientes engravidaram, correspondendo a 70,6%. Esta taxa foi significativamente maior do que quando os embriões eram transferidos em fase de blastocisto inicial (20,0%) e mórula (10,5%). As taxas de implantação também aumentaram quando estágios mais avançados dos embriões eram alcançados (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 - Efeito do estágio de desenvolvimento sobre a taxa de implantação e de gravidez, quando a transferência ocorreu no dia 5 ou 6 pós-fertilização.

Estágio de desenvolvimento	Pacientes	Taxa de gravidez (%)	Taxa de implantação (%)
Mórula	19	2 (10,5) *	9
Blastocisto inicial	10	2 (20,0) *	14
Blastocisto expandido	17	12 (70,6) *	51

* p < 0,001

Tabela 3 - Evolução das pacientes cujos embriões alcançaram o estágio de blastocisto expandido em co-cultura.

Paciente	Oócitos colhidos	Oócitos fertilizados	Embriões co-cultivados	Blastocisto expandido	Gravidez
1	22	19	5	1	Sim
2	10	7	5	1	Sim
3	8	4	4	2	Não
4	19	2	2	1	Sim
5	13	6	4	1	Não
6	15	11	5	2	Sim
7	20	10	5	3	Não
8	6	6	4	1	Sim
9	17	14	5	1	Não
10	13	8	5	1	Sim
11	19	8	2	2	Sim
12	10	7	5	3	Sim
13	15	2	2	1	Sim
14	8	3	3	3	Sim
15	7	6	5	3	Sim
16	7	5	2	2	Sim
17	10	9	3	3	Não

Discussão

Alguns autores têm usado o co-cultivo dos embriões sobre outras células na tentativa de manter os embriões viáveis por mais tempo *in vitro*, objetivando boas taxas de blastulação. As primeiras co-culturas de embriões de mamíferos usavam células epiteliais do oviduto bovino e humano, sendo poucos estudos realizados com embriões humanos, em razão da dificuldade de se obterem amostras sem contaminação bacteriana ou viral. A maioria dos autores optou pelo co-cultivo de embriões humanos em células Vero, que apresentam controle para vírus e outros contaminantes, por serem utilizadas em produção de vacinas. Além disso, crescem facilmente em uma variedade de meios e são facilmente adquiridas comercialmente. O mecanismo de ação pelo qual as células de co-cultura melhoram o desenvolvimento dos embriões é ainda discutível, mas inclui a possibilidade de desintoxicação do meio pela remoção de íons de metais pesados, hipoxantina ou radicais livres ou pela secreção de substâncias embriotróficas como os fatores de crescimento. A importância destes fatores de crescimento para o embrião tem sido comprovada pela presença de receptores sobre o trofotoderma^{11,16}. Turner e Lenton¹⁰ sugeriram que as células Vero influenciam a produção de gonadotrofina coriônica.

Os resultados usando embriões co-cultivados ainda são muito conflitantes, pois enquanto alguns sugerem que as taxas de gravidez são

aumentadas^{17,18}, outros não conseguiram confirmar isto^{9,14}. Pode-se demonstrar que um maior número de embriões alcança o estágio de blastocisto, mas não há melhora na morfologia dos blastocistos resultantes¹⁰. Bavister¹⁹ tem argumentado contra a co-cultura, pois expõe o embrião a numerosos fatores não-conhecidos (proteínas sintetizadas pelas células) e introduz diversos organismos ao sistema de cultura, principalmente quando são usadas células de animais. Entretanto, muitos autores acham que as mudanças metabólicas levam a condições favoráveis ao desenvolvimento do embrião²⁰, e outros ainda propõem o uso de co-cultivo somente em casos de sucessiva falha de implantação.

As taxas de gravidez clínica em fertilização *in vitro* giram em torno de 20 a 30%, sendo menores do que a que obtivemos com o uso de células Vero. Entretanto, não observamos diferença significativa nas taxas de gravidez, quando os embriões eram transferidos no dia 3 ou 5 de desenvolvimento. Nossos dados mostram no entanto, que há uma tendência a um aumento na taxa de implantação ($p = 0,07$) quando os embriões eram transferidos após 5 dias de cultura, pois um número menor de embriões era transferido. Podíamos selecionar para transferência apenas os embriões que não apresentassem bloqueio ou retardo em seu desenvolvimento. Uma média de $2,1 \pm 1,5$ embriões foram transferidos para as pacientes no dia 5, ao passo que uma média de $3,2 \pm 1,5$ foram transferidos no dia 3, havendo redução considerável do risco de gravidez múltipla.

Analisando os resultados pode-se observar que há uma diferença significativa quando comparamos as taxas de gravidez com o estágio em que os embriões eram transferidos, sendo observado um aumento significativo nestas taxas quando a transferência era efetuada em estágio de blastocisto expandido. Infelizmente uma limitada porcentagem de embriões atingiu o estágio de blastocisto expandido (19,9%). Na França, vários grupos trabalhando com co-cultura de embriões humanos com células Vero obtiveram média de 41,8% de blastocistos por embrião clivado e taxas de gravidez e implantação de 32,9 e 24,8%, respectivamente, quando a transferência era efetuada no dia 5^o. As taxas de implantação e gravidez são significativamente maiores quando transferimos embriões em estágio de blastocisto. Porém, as condições de culturas de que dispomos neste momento ainda são insuficientes para nos fornecer uma alta taxa de desenvolvimento até esta fase.

Alguns autores têm formulado meios seqüenciais na tentativa de obter maiores taxas de blastocistos, pois os embriões têm diferentes necessidades durante o seu desenvolvimento, que um meio simples não é capaz de satisfazer. Têm-se utilizado meios com omissão de glicose nos estágios precoces de clivagem, capazes de suportar o desenvolvimento de blastocistos viáveis em várias espécies de mamíferos, inclusive em humanos, sendo atingidas taxas em torno de 59%^{4,21}. A utilização prematura de glicose está associada a diminuição da capacidade oxidativa. Já os aminoácidos parecem ser essenciais para o embrião passado o estágio de 2-4 células^{22,23}. Outras alterações têm sido realizadas nas formulações dos meios usuais, buscando alcançar números mais altos de blastocistos, já que com a co-cultura não conseguimos taxas satisfatórias.

SUMMARY

Purpose: to determine whether the transfer day or the stage that the embryo is transferred interferes in pregnancy and implantation rates.

Methods: oocytes we recovered from 107 patients and submitted to in vitro fertilization. The embryos were cocultured on Vero cells and transferred on day 3 or day 5 post-fertilization, after morphological assessment.

Results: the implantation rate of the transferred embryos on day 5 was significantly higher than when the embryos were transferred on day 3, but the pregnancy rates did not change. However, a significant difference was observed in the pregnancy rates for embryos transferred at the expanded blastocyst stage (70.6% of pregnancy) when compared to

20.0% and 10.5% at the earlier blastocyst and morula stages, respectively.

Conclusions: the implantation and pregnancy rates were significantly increased when the embryos were transferred at the expanded blastocyst stage, but the culture media and culture conditions now available are not able to provide a satisfactory rate at this stage.

KEY WORDS: *Infertility. Male factor. In vitro fertilization.*

Referências

1. Van Blerkom J. Development of human embryos to the hatched blastocyst stage in the presence or absence of a monolayer of vero cells. *Hum Reprod* 1993; 8: 1525-39.
2. Fong CY, Bongso A, Ng SC, Anandakumar C, Trounson A, Ratnam S. Ongoing normal pregnancy after transfer of zona-free blastocysts: implications for embryo transfer in the human. *Hum Reprod* 1997; 12: 557-60.
3. Gardner DK, Lane M. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Hum Reprod Update* 1997; 3: 367-82.
4. Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril* 1998; 69: 84-8.
5. Guerin JF, Nicollet B. Interest of co-cultures for embryos obtained by in vitro fertilization: a French collaborative study. *Hum Reprod* 1997; 12: 1043-6.
6. Broussard JR, Thibodeaux JK, Myers MW, Roussel JD, Prough SG, Blackwell J, et al. Frozen-thawed cumulus-granulosa cells support bovine embryo development during coculture. *Fertil Steril* 1994; 62: 176-80.
7. Wiemer KE, Cohen J, Wiker SR, Malter HE, Wright G, Godke RA. Coculture of human zygotes on fetal bovine uterine fibroblasts: embryonic morphology and implantation. *Fertil Steril* 1989; 52: 503-8.
8. Wiemer KE, Hoffman DI, Maxson WS, Eager S, Muhlberger B, Fiore I, et al. Embryonic morphology and rate of implantation of human embryos following co-culture on bovine oviductal epithelial cells. *Hum Reprod* 1993; 8: 97-101.
9. Sakkas D, Jacquenoud N, Leppens G, Campana A. Comparison of results after in vitro fertilized human embryos are cultured in routine medium and in co-culture on Vero cells: a randomized study. *Fertil Steril* 1994; 61: 521-5.
10. Turner K, Lenton EA. The influence of Vero cell culture on human embryo development and chorionic gonadotrophin production in-vitro. *Hum Reprod* 1996; 11: 1966-74.

11. Ménézo YJR, Guérin JF, Czyba JC. Improvement of human early embryo development in vitro by coculture on monolayers of Vero cells. *Biol Reprod* 1990; 42: 301-6.
12. Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Fortini D, Fiorentino A, D'Errico A. Human embryo coculture: results of a randomized prospective study. *Int J Fertil Menopausal Stud* 1995; 40: 254-9.
13. Check JH, Hoover L, Nazari A, O'Shaughnessy A, Summers D. The effect of assisted hatching on pregnancy rates after frozen embryo transfer. *Fertil Steril* 1996; 65: 254-7.
14. Cohen J, Elsner C, Kort H, Malter H, Massey J, Mayer MP, et al. Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation. *Hum Reprod* 1990; 5: 7-13.
15. Ménézo Y, Nicollet B, Herbaut N, André D. Freezing cocultured human blastocysts. *Fertil Steril* 1992; 58:977-80.
16. Kauma SW, Matt DW. Coculture cells that express leukemia inhibitory factor (LIF) enhance mouse blastocyst development in vitro. *J Assist Reprod Genet* 1995; 12: 153-6.
17. Bongso A, Ng SC, Fong CY, Anandakumar C, Marshall B, Edirisinghe, et al. Improved pregnancy rate after transfer of embryos grown in human fallopian tubal cell coculture. *Fertil Steril* 1992; 58:569-74.
18. Freeman MR, Whitworth CM, Hill GA. Granulosa cell coculture enhances human embryo development and pregnancy rate following in vitro fertilization. *Hum Reprod* 1995; 10: 408-14.
19. Bavister, BD. Response to the use of co-culture for embryo development. *Hum Reprod* 1993; 8: 1160-2.
20. Leppens G, Sakkas D. Differential effect of epithelial cell-conditioned medium fractions on preimplantation mouse embryo development. *Hum Reprod* 1995; 10:1178-83.
21. Hardy K, Handyside AH, Winston RML. The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development in vitro. *Development* 1989; 107: 597-604.
22. Schini SA, Bavister BD. Development of golden hamster embryos through the two-cell block in chemically-defined medium. *J Exp Zool* 1988; 245, 111-5.
23. McKiernan SH, Bavister BD, Tasca RJ. Energy substrate requirements for in vitro development of hamster 1- and 2-cell embryos to the blastocyst stage. *Hum Reprod* 1991; 6: 64-75.