



# Técnicas De Laboratório Em Procriação Medicamentemente Assistida: Influencia Da Cultura Em Grupo De Oócitos Após ICSI Nas Taxas De Fecundação E De Embriões Utilizados

**Paulo Jorge Freitas Salgueirinho**

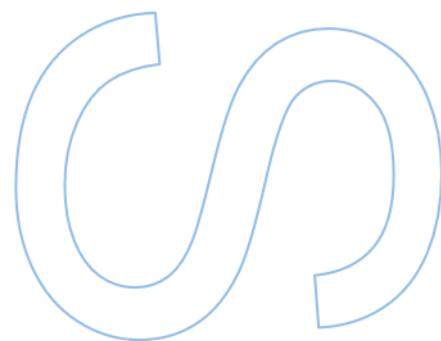
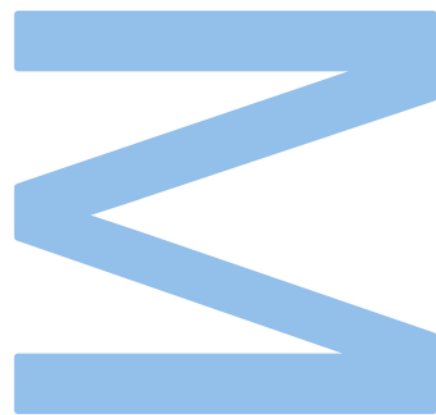
Mestrado em Biologia Celular e Molecular  
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto  
2021/2022

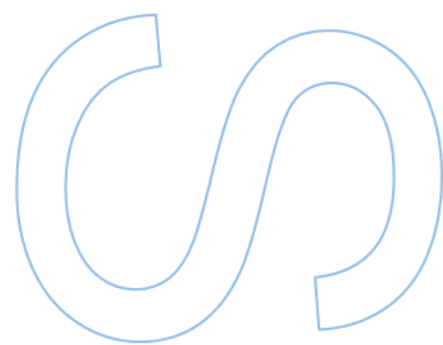
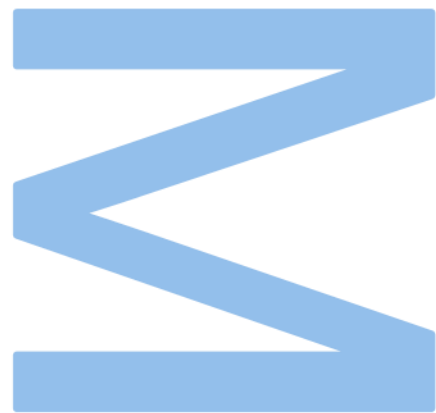
**Orientador**

Filipa Barbosa, Embriologista clínica e responsável de laboratório de Procriação Medicamentemente Assistida, CHUSJ

**Coorientador**

Prof. Vasco Almeida, Professor auxiliar e diretor de laboratório de Procriação Medicamentemente Assistida, FCUP





# Declaração de honra

Eu, Paulo Jorge Freitas Salgueirinho, inscrito no Mestrado em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto declaro, nos termos do disposto na alínea a) do artigo 14.º do Código Ético de Conduta Académica da U.Porto, que o conteúdo do presente relatório de estágio/projeto reflete as perspetivas, o trabalho de investigação e as minhas interpretações no momento da sua entrega.

Ao entregar este relatório de estágio/projeto, declaro, ainda, que a mesma é resultado do meu próprio trabalho de investigação e contém contributos que não foram utilizados previamente noutros trabalhos apresentados a esta ou outra instituição.

Mais declaro que todas as referências a outros autores respeitam escrupulosamente as regras da atribuição, encontrando-se devidamente citadas no corpo do texto e identificadas na secção de referências bibliográficas. Não são divulgados no presente relatório de estágio/projeto quaisquer conteúdos cuja reprodução esteja vedada por direitos de autor.

Tenho consciência de que a prática de plágio e auto-plágio constitui um ilícito académico.

Paulo Salgueirinho

Porto, 03/01/2023

# Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu coorientador Prof. Vasco Almeida, pelo esforço que teve para conseguir abrir oportunidades nesta área num momento difícil devido à pandemia.

Um especial agradecimento à minha orientadora Filipa Barbosa, pelo apoio, acompanhamento e pelo conhecimento na área. Um grande obrigado também pela disponibilidade e tempo despendido fora do laboratório para me esclarecer dúvidas assim como acompanhar-me no desenvolvimento deste trabalho. Não me vou esquecer das lições nem dos conselhos dados. Foi um prazer e privilégio tê-la como minha orientadora.

Também quero dar um especial agradecimento à equipa de biólogas/embriologistas da Unidade Medicina da Reprodução do CHUSJ (Centro Hospitalar Universitário de São João), à Ana Patricia Martins, Beatriz Vieira, Renata Leite, Sofia Xavier e Yone Reis. Gostei muito de conhecer estas pessoas maravilhosas que vou sempre lembrar no coração. Para elas vou guardar sempre um carinho muito especial pelos momentos de riso, mas também de orientação dentro do laboratório. Muito obrigado a elas pela boa disposição, preocupação, acolhimento e por me permitirem experienciar o seu ótimo trabalho em equipa. E agora posso dizer como resposta: “Sai pronto para a vida”.

Um grande obrigado a toda a equipa da Unidade Medicina da Reprodução do CHUSJ, pela boa disposição e pelo acolhimento durante este estágio. Foi um prazer acompanhar o vosso trabalho e adquirir o meu conhecimento num ambiente tão simpático.

Para além das pessoas que conheci no estágio, quero agradecer ao João Faria pela disponibilidade e esclarecimento de dúvidas de análise estatística, essenciais para o projeto de investigação desenvolvido.

Fora do ambiente de estágio, quero dar um enorme obrigado à minha irmã pelo apoio durante todos estes anos de lamentações, stress, mas também de realizações e orgulho pela minha evolução. Um obrigado é pouco por todos as vezes que estive lá para me ouvir, aturar como irmão mais novo e para me ajudar nas decisões mais importantes do meu caminho. Muito obrigado por acreditares em mim, mana!

Agradeço aos meus amigos pelo apoio e pelos momentos compartilhados de frustração, sem as nossas lamentações não sei como seria viver num mundo sozinho dentro delas. Obrigado, também pelos momentos de distração quando eram necessárias e por acreditarem em mim quando me sentia um pouco em baixo. Dentro deste grupo quero

agradecer em especial ao Fábio Fonseca pela ajuda, companhia e paciência dada durante o desenvolvimento desta dissertação.

Por último quero agradecer à minha família, pela ajuda no meu percurso académico, mas especialmente à minha mãe pelo esforço que tem feito para eu continuar este percurso e pelo amor que tem por mim!

## Resumo

Inicialmente o tratamento da infertilidade era baseado apenas em mudanças de estilo de vida e ao longo dos anos surgiram novos conhecimentos na biologia da reprodução humana. Contudo, foi só no século atual e anterior que se verificou a permissão, surgimento e grande desenvolvimento de diversas técnicas de PMA no ser humano.

Essas mesmas técnicas, nos dias de hoje, permitem ultrapassar muitas barreiras de infertilidade, e o melhoramento das condições de cultura aumentar as possibilidades de gravidez. Sendo assim, surgiu o conceito de cultura em grupo de embriões com o intuito de melhorar as taxas de gravidez, no entanto, o seu efeito é incerto devido à existência de resultados contraditórios. Vários estudos sugerem a acumulação ou depleção de fatores produzidos pelos embriões no meio de cultura como a razão para o efeito da cultura em grupo, sendo alguns dos fatores já conhecidos.

Este relatório teve como objetivos dar a conhecer as técnicas de PMA em laboratório de FIV e Andrologia, assim como avaliar a taxa de fecundação após microinjeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) em oócitos dispostos individualmente e em grupo, e subsequente avaliação do desenvolvimento embrionário e taxa de embriões utilizados. Complementarmente, também foi avaliada a interação das mesmas taxas com outros fatores, como a qualidade espermática, o número de oócitos obtidos da punção folicular e ainda a idade materna.

Durante a realização deste estágio foi possível o acompanhamento de todas as práticas realizadas no laboratório de FIV e andrologia e interpretar a atitude crítica necessária num embriologista para avaliar as diversas condições presentes nesses mesmos laboratórios. Quanto aos resultados presentes no estudo realizado verificou-se que neste estudo a cultura em grupo não resultou em qualquer vantagem ou desvantagem, contudo, o tamanho de amostra foi reduzido. Concluindo, para futuros estudos é aconselhado uma melhor uniformização dos ciclos incluídos assim como aumento do seu número, para uma avaliação mais fidedigna das taxas de embriões utilizados, mas também para introduzir uma avaliação da qualidade embrionária em condições de cultura em grupo.

Palavras-chave: técnicas de PMA, cultura em grupo, ICSI, taxa de fecundação, taxa de embriões utilizados, qualidade espermática, número de oócitos recolhidos; idade materna

# Abstract

Initially infertility treatment was based only in lifestyle changes and over time new knowledge about human reproductive biology emerged. However, it was just in the current and previous century that we saw the permission, emergence, and the huge development of different MAR technics in the human being.

Nowadays, the same technics give the chance to overcome infertility problems, and the improvement of culture conditions improves pregnancy possibilities. Thus, the embryo group culture concept arrived with the intuition to improve pregnancy rates, although its effect is uncertain due to contradictory results. Many studies suggest that the reason for group culture effect it is the accumulation or depletion of know factors produce by embryos.

The aims of this study were to make known the MAR technics in the FIV and Andrology labs, as well as evaluate fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in oocytes organized individually or in group, and subsequently evaluate embryo development and embryo utilization rate. Complementarily, it was also evaluated the interaction of the same rates with other factors, as sperm quality, number of retrieved oocytes through follicular puncture and the maternal age.

During this internship it was possible to monitor all the FIV and Andrology lab performances and to interpret the necessary attitude of an embryologist to evaluate all the conditions present in the laboratory. As for the results of this study group culture didn't bring any advantages or disadvantages, however, the sample sized may was too small. Concluding, for future studies it is advised a better cycle uniformization as well as improve the number of cycles, to obtain a more precise evaluation of embryo utilization rate, but also to introduce embryo quality evaluation in group culture conditions.

Keywords: MAR technics, group culture, ICSI, fertilization rate, embryo utilization rates, sperm quality, retrieved oocytes; maternal age

# Índice

Declaração de honra.....	i
Agradecimentos.....	ii
Resumo .....	iv
Abstract .....	v
Lista de Tabelas .....	ix
Lista de Figuras .....	x
Lista de Abreviaturas .....	xii
CAPÍTULO I .....	1
Objetivos e Contexto Histórico .....	1
Objetivos.....	2
História da PMA.....	3
CAPÍTULO II.....	6
Componente de Estágio.....	6
1. Componente Teórica .....	7
1.1. Biologia da Reprodução Masculina.....	7
a) Espermatozoide.....	7
b) A espermatogénese.....	9
1.2. Biologia da Reprodução Feminina .....	12
a) O ócito .....	12
b) A oogénese .....	14
1.3. O embrião e o seu desenvolvimento até à implantação .....	17
1.4. Infertilidade .....	23
2. Técnicas laboratoriais de Procriação Medicamente Assistida .....	28
2.1. Laboratório de Andrologia.....	28
2.1.1. Avaliação espermática .....	28
2.1.2. Extração de espermatozoides .....	35
2.1.3. Criopreservação de espermatozoides .....	41

2.1.4.	Preparação de espermatozoides.....	44
2.1.5.	IIU .....	49
2.2.	Laboratório de Embriologia.....	51
2.2.1.	Manipulação de oócitos.....	51
i)	Punções foliculares.....	51
ii)	Desnudação .....	52
iii)	Criopreservação.....	54
iv)	FIV convencional.....	56
v)	ICSI .....	58
2.2.2.	Manipulação de embriões .....	62
i)	Cultura de embriões .....	62
ii)	Eclosão assistida.....	70
iii)	PGT .....	71
iv)	Criopreservação.....	74
v)	Transferência.....	75
vi)	Qualidade embrionária.....	77
CAPÍTULO III.....		83
Componente de investigação .....		83
1.	Resumo .....	84
2.	Abstract .....	85
3.	Introdução.....	86
4.	Material e métodos .....	88
5.	Resultados.....	91
6.	Discussão.....	98
Conclusões do estágio.....		103
Referências Bibliográficas .....		106
Anexos .....		121
Anexo 1 .....		122



## Lista de Tabelas

Tabela 1. Classificação embrionária ao dia 2 e 3 de desenvolvimento .....	80
Tabela 2. Classificação embrionária ao dia 4 de desenvolvimento .....	81
Tabela 3. Classificação embrionária ao dia 5 de desenvolvimento .....	82
Tabela 4. Informação recolhida dos ciclos incluídos neste estudo consoante o tipo de cultura (cultura individual ou em grupo) .....	91
Tabela 5. Organização de oócitos por gota de meio em cada placa de cultura.....	122

## Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura do espermatozoide maturo e corte de vários segmentos do flagelo .....	8
Figura 2. Imagem ilustrativa de um corte de túbulo seminífero e diferentes etapas da espermatogénese .....	9
Figura 3. O complexo <i>cumulus</i> -coroa-oócito e o oócito desnudado .....	13
Figura 4. O desenvolvimento folicular .....	15
Figura 5. Desenvolvimento e maturação do oócito .....	16
Figura 6. Capacitação dos espermatozoides .....	18
Figura 7. Desenvolvimento embrionário até ao momento de implantação .....	20
Figura 8. Atividade transcricional durante o desenvolvimento do embrião pré implantação .....	21
Figura 9. Hemocítmetro Neubauer .....	31
Figura 10. Testes de viabilidade espermática .....	33
Figura 11. Anomalias morfológicas nos espermatozoides .....	34
Figura 12. Técnicas de extração de espermatozoides do testículo .....	36
Figura 13. Extração microcirúrgica de espermatozoides (micro-TESE) .....	38
Figura 14. Técnicas de extração de espermatozoides dos epidídimos .....	39
Figura 15. Representação esquemática das técnicas de preparação de espermatozoides .....	45
Figura 16. Exemplo de imobilização mecânica de espermatozoides.....	60
Figura 17. Procedimento de ICSI.....	61
Figura 18. Ilustração da complexidade e interação entre fatores que afetam um tratamento de FIV .....	65
Figura 19. Procedimento de uma biópsia a blastocisto com assistência de laser.....	73
Figura 20. Cateter de transferência carregado com embrião .....	76
Figura 21. Organização de placas de cultura após microinjeção-intracitoplasmática de espermatozoides .....	89
Figura 22. Histogramas da frequência das taxas de fecundação (%) da cultura em grupo(G) e da cultura individual(I) em conjunto (G + I) e de forma separada. ....	92
Figura 23. Histogramas da frequência das taxas de embriões utilizados (%) da cultura em grupo(G) e da cultura individual(I) em conjunto (G + I) e de forma separada. ....	93
Figura 24. Mediana das taxas de fecundação (%) da cultura individual (I) e da cultura em grupo (G) e respetivos desvios padrão .....	94
Figura 25. Mediana das taxas de embriões utilizados (%) da cultura individual (I) e da cultura em grupo (G) e respetivos desvios padrão.....	94

Figura 26. Comparação do efeito da qualidade espermática nas taxas de fecundação (a) e de embriões utilizados (b) da cultura em grupo e da cultura individual .....	95
Figura 27. Comparação do efeito da idade materna nas taxas de fecundação (a) e de embriões utilizados (b) da cultura em grupo e da cultura individual .....	96
Figura 28. Comparação do efeito do nº de oócitos recolhidos nas taxas de fecundação (a) e de embriões utilizados (b) da cultura em grupo e da cultura individual .....	97

## Lista de Abreviaturas

ABP	PROTEÍNA DE LIGAÇÃO DE ANDRÓGENOS
ADN	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO
ANR	ÁCIDO RIBONUCLEICO
ATP	ADENOSINA TRIFOSFATO
ASEBIR	SOCIEDADE ESPANHOLA DOS ESTUDOS DA BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO
ASRM	SOCIEDADE AMERICANA PARA A MEDICINA REPRODUTIVA
cAMP	ADENOSINA MONOFOSFATO CÍCLICA
CHUSJ	CENTRO HOSPITALAR UNIVERSITÁRIO DE SÃO JOÃO
ESHRE	SOCIEDADE EUROPEIA DA REPRODUÇÃO HUMANA E EMBRIOLOGIA
FIV	FERTILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i>
FSH	HORMONA FOLÍCULO-ESTIMULANTE
GnRH	HORMONA LIBERTADORA DE GONADOTROFINAS
hCG	GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA
ICSI	MICROINJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES
IUI	INSEMINAÇÃO INTRA-UTERINA
LH	HORMONA LUTEINIZANTE
MESA	MICROASPIRAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES DO EPIDÍDIMO
PCR	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE
PESA	ASPIRAÇÃO PERCUTÂNEA DE ESPERMATOZOIDES DO EPIDÍDIMO
PGT	TESTE GENÉTICO PRÉ-IMPLANTAÇÃO
PMA	PROCREAÇÃO MEDICAMENTE ASSISTIDA
PVP	POLIVINILPIRROLIDONA
PZD	DISSECAÇÃO PARCIAL DA ZONA PELÚCIDA
RT-PCR	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE VIA TRANSCRIÇÃO REVERSA
ROS	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÉNIO
SUZI	INSERÇÃO DE UM ESPERMATOZOIDE NO ESPAÇO PERIVITELINO

TESA	ASPIRAÇÃO TESTICULAR DE ESPERMATOZOIDES
TESE	EXTRAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES TESTICULARES
VIH	VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA
WHO	<i>WORLD HEALTH ORGANAZATION</i>
WOW	SISTEMA <i>WELL-OF-THE-WELL</i>

# CAPÍTULO I

## **Objetivos e Contexto Histórico**

## Objetivos

O estágio desenvolvido teve como principal objetivo a consolidação de conhecimentos em embriologia clínica, através do acompanhamento das práticas executadas em laboratório de Fertilização *in vitro* (FIV) e Andrologia. Auxiliarmente, de forma a obter-se esse objetivo, também se considerou essencial uma pesquisa bibliográfica e consequente descrição das técnicas acompanhadas em laboratório.

Para além disso, surgiu um outro objetivo de forma suplementar a este estágio, a execução de um projeto de investigação: "Influencia da cultura em grupo de oócitos após ICSI nas taxas de fecundação e de embriões utilizados". Este estudo teve como propósito abordar um dos vários fatores presentes nos sistemas de cultura de embriões que pode melhorar o desenvolvimento embrionário, e assim também dar ênfase à atitude crítica a ser tomada em ambiente laboratorial de embriologia. De forma mais pormenorizada, o estudo desenvolvido teve como foco avaliar se a cultura em grupo de oócitos após ICSI tem influência sobre a taxa de fecundação, assim como no subsequente desenvolvimento embrionário caso se verifique presença de 2 pronúcleos e 2 glóbulos polares e na taxa de embriões utilizados. Adicionalmente, este estudo teve também como último objetivo trazer benefício, em termos de informação e melhoramento da eficácia, para o laboratório da Medicina da Reprodução Assistida do CHUSJ caso haja uma influência positiva da cultura em grupo de oócitos após ICSI.

## História da PMA

O período do Renascimento, séculos XV e XVI, deram lugar ao período do renascimento científico onde se deu grandes avanços na medicina moderna e consequentemente no tratamento da infertilidade. Na época surgiu um sistema de razão científica baseado no pensamento racional, sendo assim, incluiu-se a infertilidade nos problemas com necessidade de diagnóstico e tratamento na medicina. Contudo, o tratamento da infertilidade era baseado apenas em mudanças de estilo de vida. Mais tarde, em 1677 Antonie Philips van Leeuwenhoek fez a primeira descrição detalhada de espermatozoides aos quais deu o nome de “animalcules”<sup>1</sup>. Como resultado das suas observações Leeuwenhoek surgiu com a hipótese da importância do espermatozoide para se obter uma gravidez<sup>2</sup>, no entanto, foi Lazzaro Spallanzani, aproximadamente 100 anos depois, que demonstrou essa importância ao inseminar artificialmente uma cadela<sup>3</sup>. Adicionalmente, existem indícios de que Lazzaro Spallanzani também foi o primeiro a tentar preservar espermatozoides ao congelá-los<sup>4</sup>. Já os oócitos de mamíferos só foram descobertos em 1827 por Carl Ernst Von Baer<sup>2</sup>.

Ao longo dos anos os estudos e desenvolvimentos dos métodos de inseminação artificial tornaram este método mais seguro e popular, no entanto, na altura os argumentos éticos sobre as técnicas de procriação medicamente assistida (PMA) no governo e igreja influenciaram o atraso da evolução destas técnicas. Apesar disso, entre as décadas de 1920 e 1930 foram identificadas e estudadas as hormonas envolvidas na reprodução humana o que consequentemente levou à produção de hormonas sintéticas, durante a década de 1940, para uso nos tratamentos de infertilidade<sup>5</sup>. Logo após essa década, em 1953 obteve-se pela primeira vez, no ser humano, uma gravidez através de inseminação de espermatozoides após o congelamento<sup>6</sup>, isto só foi possível devido à descoberta da capacidade crioprotetora do glicerol<sup>7</sup>.

Nas décadas de 1960 e 1970 a compreensão pelo facto de a fertilização ser gerada pela fusão do espermatozoide com o oócito foi estabelecida, o que permitiu os avanços para a realização da FIV<sup>8</sup>. Com isto, foi em 1978 que se conseguiu pela primeira vez o nascimento do primeiro bebe resultante de FIV de oócitos humanos. Neste experimento o oócito pré-ovulatório foi colhido da paciente, fertilizado *in vitro* e com clivagem normal em meio de cultura até obter-se um embrião de 8 células, o qual foi de seguida transferido para o útero da paciente<sup>9</sup>. Este grande avanço na PMA foi de tal modo tão discutido e disperso pelos media que permitiu mudança de opiniões e consequentemente o aumento no apoio das técnicas de PMA. Nessa mesma época

desenvolviam-se os bancos de gâmetas, no entanto, só para gâmetas masculinos, e assim só em 1983 surgiu a primeira gravidez a partir de doação de oócitos <sup>10</sup>. Poucos anos depois, em 1986, foi possível uma gravidez utilizando oócitos após criopreservação <sup>11</sup>. A possível criopreservação de gâmetas alargou as hipóteses de engravidar para os casais com infertilidade, ao poderem preservar a sua fertilidade, recorrer a doações e também pelo incentivo nas pesquisas da área.

Apesar das diversas técnicas de PMA, na altura, ainda existiam muitos fatores de infertilidade masculina aos quais ainda era difícil contornar, daí surgir a microinjeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Foi em 1987 que se realizou pela primeira vez ICSI <sup>12</sup>, contudo, nenhum dos zigotos resultantes foi transferido e só em 1992 obteve-se gravidezes com sucesso recorrendo a ICSI <sup>13</sup>. Adicionalmente a esta grande evolução, em 1988 foi reportada uma gravidez resultante da transferência de embrião após eclosão assistida, conseqüentemente seguiram-se estudos sobre este método, porém foram surgindo opiniões contraditórias sobre o seu benefício para as taxas de gravidez ou de implantação <sup>14</sup>.

Estes avanços em PMA permitiram ultrapassar vários problemas de infertilidade, mas não só, uma outra tecnologia desenvolvida na área da PMA foi o teste genético pré-implantação (PGT), esta técnica não tem como objetivo superar problemas de infertilidade, como todas as outras técnicas de PMA, mas consiste na transferência de embriões saudáveis evitando doenças genéticas. Em 1990 lançou-se o primeiro relato bem-sucedido de PGT em embriões humanos, e com o passar dos anos a técnica sofreu grandes avanços e ainda hoje sofre <sup>15</sup>.

Embora houvesse imensas vantagens nas técnicas de PMA antes da década de 1990, ainda existiam problemas para serem contornados, um desses problemas seria a gravidez múltipla, a qual levanta riscos sérios tanto para a paciente como para a sua descendência. No desenvolvimento inicial da FIV os oócitos fertilizados eram mantidos em meio de cultura até ao terceiro dia e posteriormente transferidos para o útero da paciente, contudo, este método tornava difícil prever qual dos embriões poderia estar mais apto para implantar e daí considerar-se a transferência de 3 ou mais embriões de uma só vez resultando, por vezes, em gravidez múltipla. Sendo assim, foi no final da década de 1990 que se iniciou a seleção do embrião com melhor qualidade ao 5º ou 6º dia. Neste estágio, de blastocisto, o embrião tem melhor probabilidade de implantar após a transferência, no entanto, só foi possível esta estratégia devido ao desenvolvimento do conhecimento sobre as necessidades nutricionais de um embrião para o cultivar durante mais tempo <sup>16</sup>.

Para terminar, nos dias de hoje existe uma grande diversidade de métodos que ajudam a melhorar as condições das técnicas de PMA, assim como aumentar as probabilidades de se obter uma gravidez. Atualmente, as condições do meio de cultura, os métodos utilizados nas técnicas de PMA, assim como as melhores técnicas a serem usadas em cada caso tornam-se um dos principais fatores a serem estudados para se obter um melhor desenvolvimento embrionário e melhor probabilidades de gravidez, aquele que é o verdadeiro objetivo da PMA.

## CAPÍTULO II

### **Componente de Estágio**

# 1. Componente Teórica

## 1.1. Biologia da Reprodução Masculina

### a) Espermatozoide

O espermatozoide é uma célula altamente especializada e extremamente adaptada para migrar no sistema reprodutor feminino e entregar o seu ADN (ácido desoxirribonucleico) ao oócito, permitindo a formação de um zigoto com ADN paterno e materno. Para atingir o seu único objetivo o espermatozoide apresenta uma diversidade de características tais como capacidade de movimento; uma quantidade de citoplasma quase nula; ausência de alguns organelos citoplasmáticos desnecessários para a fecundação; maquinaria para fecundar o oócito; e um núcleo condensado levando à inatividade transcricional e traducional, apesar de apresentar vias metabólicas <sup>17,18</sup>.

De uma forma simplificada, estruturalmente os espermatozoides são divididos em 3 partes principais, a cabeça, a peça intermédia e a cauda (Fig. 1). A cabeça alberga o material genético e possui o acrossoma, a cauda é constituída por características que conferem o movimento linear ao espermatozoide e a peça intermédia contém mitocôndrias para a produção de energia <sup>18</sup>. Para além disso, existem organelos únicos destas células: o acrossoma, que cobre a cabeça do espermatozoide e contém enzimas digestivas (hialuronidase e acrosina); a manchete, uma estrutura microtubular que dá forma à cabeça e facilita o desenvolvimento da peça intermédia; centríolos atípicos, com propriedades únicas nos espermatozoides; uma região de transição ciliar, que controla a composição proteica do compartimento ciliar; e uma bainha fibrosa de estrutura flagelar que regula sinais de transdução, vias metabólicas e a rigidez mecânica do flagelo <sup>19</sup>.

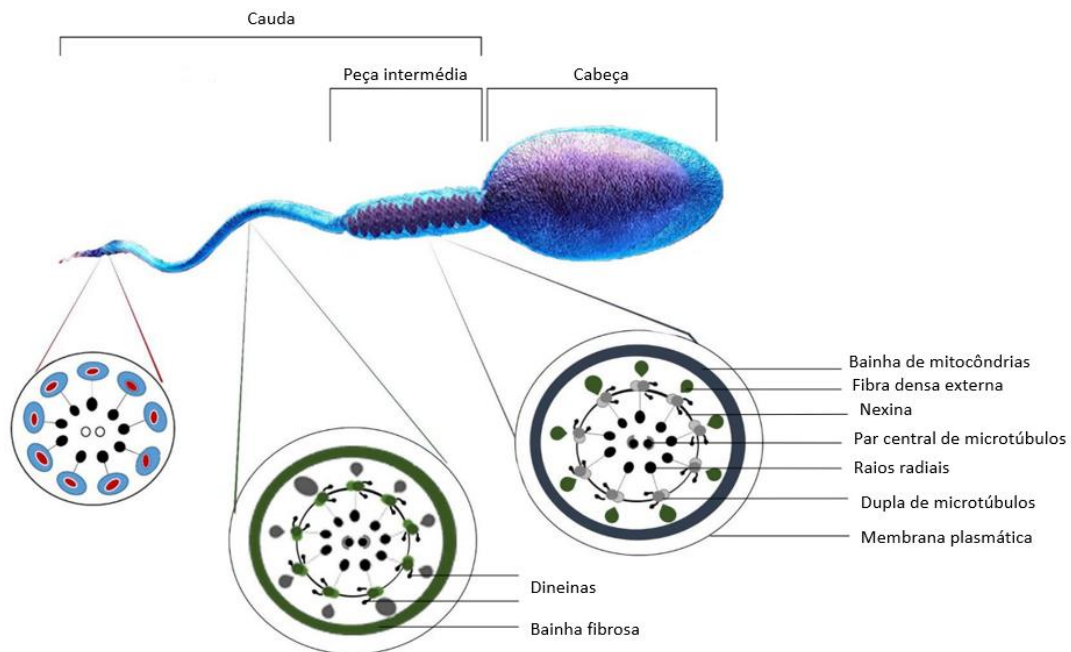


Figura 1. Estrutura do espermatozoide maturo e corte de vários segmentos do flagelo. Adaptado de Dcunha et al., 2022<sup>18</sup>.

O flagelo do espermatozoide tem uma parte crucial para o seu movimento, a qual se dá o nome de axonema. Esta secção do flagelo é constituída por 9 dopletos e um par central (Fig. 1). Nos dopletos são projetadas dineínas (Fig. 1), proteínas dependentes de adenosina trifosfato (ATP) para criarem movimento nos espermatozoides<sup>17,18</sup>. Estas moléculas de ATP são produzidas pelas mitocôndrias que se encontram organizadas de forma helicoidal e envolvem o axonema na peça intermédia<sup>18</sup>. Contudo, o movimento dos espermatozoides, para além de depender de energia, também é regulado por diversas vias de sinalização complexas como a sinalização adenosina monofosfato cíclica (cAMP)/proteína cinase A e a 3-cinase, que são vias controladas pelas concentrações intracelulares de iões de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), e ainda a via DAG-MAPK (ERK1/2) [proteína ativada por diacilglicerol-mitogéno cinase (cinase 1/2 regulada por sinal extracelular)]<sup>18</sup>.

Concluindo, em termos moleculares, os espermatozoides são células inativas transcricional e traducionalmente, o que as torna dependentes de modificações pós-tradução, tendo as regulações redox como principal mecanismo para encaminhar a função das proteínas<sup>20</sup>.

## b) A espermatogénese

A espermatogénese consiste na produção de espermatozoides nos túbulos seminíferos dos testículos e tem o seu início na puberdade até ao final da vida de um homem <sup>17,21</sup>. Suspeita-se que um homem adulto por dia produz cerca de 150-270 milhões de espermatozoides <sup>22</sup>. Ainda durante o desenvolvimento embrionário as células germinativas primordiais migram para o local onde se dá a evolução das gónadas, e aí atingem a sua maturidade ao dividirem-se em espermatogónias <sup>23</sup>. É nesta fase de espermatogónias que se inicia o processo sequencial da espermatogénese: proliferação das espermatogónias; diferenciação das espermatogónias em espermatócitos; divisão meiótica dos espermatócitos produzindo espermátides; maturação de espermátides; e libertação de espermatozoides para o lúmen dos túbulos seminíferos (Fig. 2) <sup>22</sup>.

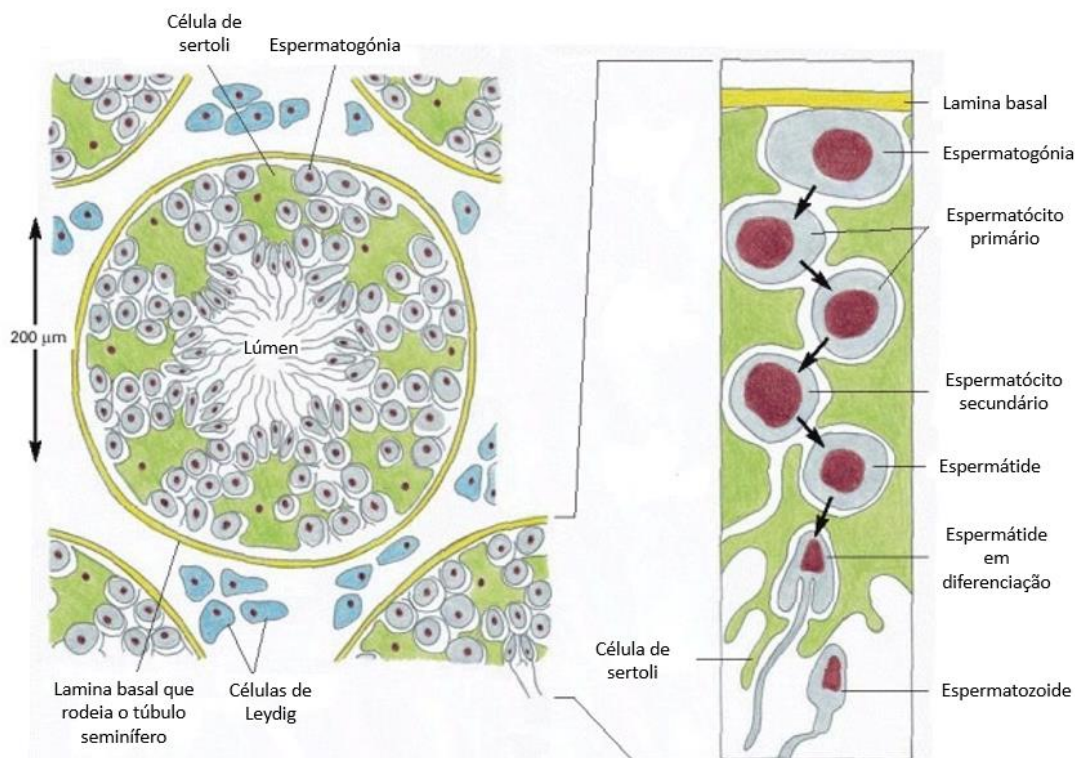


Figura 2. Imagem ilustrativa de um corte de túbulo seminífero e diferentes etapas da espermatogénese. Adaptado de Alberts et al., 2002 <sup>17</sup>.

De uma forma mais pormenorizada, nos túbulos seminíferos as células germinativas encontram-se organizadas numa ordem sequencial desde a membrana dos túbulos até ao seu lúmen. Como células iniciais do processo, as espermatogónias encontram-se junto da membrana basal dos túbulos e em seguida, com o desenvolvimento do processo, surgem subsequentemente os espermatócitos primários, secundários e as

espermátides (Fig. 2) <sup>17,21</sup>. Já no lúmen dos túbulos seminíferos é possível encontrar espermatozoides. Os espermatócitos primários, produzidos pelas divisões mitóticas e diferenciação das espermatogônias, entram em primeira fase de meiose e os espermatócitos secundários gerados entram na segunda fase produzindo espermátides, células haploides <sup>17,21,23</sup>. Finalizando o processo, as espermátides sofrem uma diferenciação morfológica até ao estado de espermatozoide: formação do acrossoma por fusão de vesículas do complexo de Golgi; rotação do núcleo para extensão do flagelo a partir dos centríolos até ao lúmen dos túbulos; o núcleo condensa; o excesso de citoplasma é removido; e as mitocôndrias reorganizam-se na base do flagelo <sup>21,23</sup>.

Contudo, existem estruturas e outras células que têm um papel fundamental na espermatogénese, assim como existe uma gama acrescida de fatores que influenciam este processo <sup>22</sup>. Em termos celulares, para além das células da linha germinativa que originam os espermatozoides, existem duas outras células muito importantes para o decorrer da espermatogénese:

- Células de Leydig: estas células encontram-se individualmente ou em grupos no tecido conjuntivo entre os túbulos seminíferos e apresentam um citoplasma granuloso (Fig. 2) <sup>21</sup>. Apesar disso, são células que têm como principal produto a testosterona ao serem estimuladas pela hormona luteinizante (LH) <sup>21,22</sup>. Posteriormente, a testosterona produzida pelas células de Leydig é armazenada no compartimento intratesticular, onde se encontra em maior quantidade, ou liberta para a corrente sanguínea <sup>21,22</sup>. Adicionalmente, a testosterona intratesticular tem uma grande influência sobre as células de sertoli, controlando a espermatogénese <sup>22</sup>.

- Células de sertoli: são células que se dispõem junto da membrana basal dos túbulos seminíferos e estendem-se até ao lúmen dos mesmos, ou seja, apresentam uma forma irregular, de alinhamento polarizado e em constantes mudanças morfológicas (Fig. 2) <sup>21,22</sup>. Auxiliariamente, estas células apresentam diversos locais de comunicação entre si e com as células da linha germinativa para permitir um meio hormonal apropriado para o desenrolar da espermatogénese <sup>21,22</sup>. Um dos produtos destas células é a proteína de ligação de andrógenos (ABP), que é secretada devido à sinalização provocada pela hormona folículo-estimulante (FSH), e tem como uma das suas funções controlar a espermatogénese ao ligar-se à testosterona <sup>22</sup>. Finalizando, algumas das funções destas células são por exemplo: manutenção da integridade do epitélio dos túbulos seminíferos; secreção de fluido para o lúmen dos túbulos com objetivo de transporte dos espermatozoides no ducto; participação na maturação das espermátides; fagocitose e

eliminação de citoplasma; nutrir as células da linha germinativa; movimento das células no epitélio; e regulação do ciclo de espermatogénese <sup>21</sup>.

Por último, após a espermatogénese, os espermatozoides ainda não são capazes de fecundar o oócito, e é nos epidídimos que estes sofrem maturação, adquirem a habilidade para interagir com a zona pelúcida do oócito e adquirem capacidade de movimento.

## 1.2. Biologia da Reprodução Feminina

### a) O oócito

O oócito é uma célula germinativa que tem um papel fundamental no desenvolvimento embrionário e fetal, uma vez que é onde ocorrem reorganizações nucleares, citoplasmáticas e funcionais. Permite ainda a segregação do material genético do espermatozoide e a formação do zigoto <sup>24</sup>. Esta célula é considerada como uma das maiores células no corpo humano, sendo rica em citoplasma, o ooplasma, com grânulos de substâncias essenciais para o crescimento celular, a maturação e o desenvolvimento inicial após fecundação <sup>25</sup>. Quando maduro, o oócito apresenta-se bloqueado na fase meiótica metáfase II, onde adquire a capacidade para ser fecundado por um espermatozoide <sup>25</sup>.

Morfologicamente, quando se refere a um oócito maduro, é necessária a visualização do oócito como um complexo e não como uma única célula (complexo *cumulus*-coroa-oócito) (Fig. 3), onde se encontra características citoplasmáticas, como a granulosidade e a presença de vacúolos, e extracitoplasmáticas <sup>26</sup>. Quanto às características extracitoplasmáticas, o oócito é rodeado por uma estrutura de proteção esférica e uniforme, a zona pelúcida, a qual é ainda é rodeada por uma camada de células, o complexo *cumulus*-coroa (Fig. 3) <sup>24,26</sup>. As células do *cumulus*-coroa encontram-se ligadas entre si através de moléculas de ácido hialurónico, adicionalmente, as células da coroa radiata estão em contacto próximo com o oócito, uma vez que estas desenvolvem projeções citoplasmáticas que atravessam a zona pelúcida e formam junções comunicantes com o oolema <sup>26</sup>. Para mais, existe um espaço entre a zona pelúcida e o oócito, o qual se dá o nome de espaço perivitelino, e nesse mesmo espaço é visível um glóbulo polar que foi liberto durante a primeira divisão meiótica do oócito (Fig. 3) <sup>26</sup>.



Figura 3. O complexo *cumulus*-coroa-oócito e o oócito desnudado. A imagem do lado esquerdo corresponde a um complexo *cumulus*-coroa-oócito visto numa lupa binocular e do lado direito a um oócito após desnudação, onde é possível ver um glóbulo polar (GP) e o espaço perivitelino (EPV), rodeados por uma zona pelúcida (ZP). Imagens obtidas através do software RI Viewer Imaging.

A camada do *cumulus ophorus* é constituída por vários tipos de células cuja estrutura e atividade metabólica estão relacionadas com o crescimento, maturação e fecundação do oócito assim como garantir o desenvolvimento inicial do embrião: células sintetizantes de proteínas ou esteroides, leucócitos e macrófagos <sup>27</sup>. Mesmo abaixo do *cumulus ophorus* e acima da zona pelúcida, encontra-se a camada de células da coroa radiata, e estas células, por comunicarem diretamente com o oócito, permitem o fornecimento de substâncias essenciais para o mesmo, como proteínas <sup>28</sup>. Já a zona pelúcida é constituída principalmente por 3 glicoproteínas e suporta a comunicação entre o oócito e as células foliculares (células da coroa radiata), protege o oócito e o embrião durante o desenvolvimento inicial e ainda regula a interação entre o oócito e os espermatozoides durante e depois da fecundação <sup>29</sup>.

## b) A oogénese

A oogénese tem início durante o desenvolvimento embrionário, assim como acontece com a espermatogénese, através da migração das células primordiais para o local onde se dá a evolução das gónadas <sup>21</sup>. Depois de chegarem ao seu destino, estas células dividem-se dando origem às oogónias, que vão aumentando o seu número de forma exponencial até ao momento em que estas células são rodeadas por células somáticas epiteliais formando os folículos primordiais <sup>21</sup>.

Existem dois desenvolvimentos durante a maturação dos oócitos, o desenvolvimento do oócito e a sua meiose e o desenvolvimento folicular.

### **Desenvolvimento folicular:**

Os folículos primordiais surgem aproximadamente ao 4<sup>o</sup> mês de gestação fetal e iniciam o seu desenvolvimento mais tarde na região medular do ovário em direção ao córtex <sup>30,31</sup>. Nos folículos primordiais as células pré-granulosas entram num período de quiescência, e a proliferação celular só retoma quando se estabelece um sinal para que o folículo inicie o seu desenvolvimento <sup>30,31</sup>. Após a puberdade, iniciam-se os sinais e vários folículos primordiais entram em desenvolvimento todos os dias dependendo da expressão de alguns genes presentes nos oócitos e na interação de várias células <sup>30,31</sup>. Existem 3 fases de desenvolvimento folicular: folículo primário/pré-antral, folículo antral e folículo pré-ovulatório (Fig. 4) <sup>30,31</sup>. Os folículos primordiais que entram em crescimento apresentam mudanças bioquímicas, fisiológicas, moleculares e morfológicas como aumento do tamanho do oócito e as células pré-granulosas tornam-se cuboides <sup>21,30,31</sup>. Estes folículos que começam a desenvolver são chamados de folículos primários/pré-antrais. Seguindo o desenvolvimento, as células da granulosa dividem dando origem a múltiplas camadas e os folículos ficam associados a pequenos vasos sanguíneos, e, a partir das 3-6 camadas de células da granulosa, surge a camada de células da teca <sup>30,31</sup>. Com a influência de fatores de crescimento, as células da teca e da granulosa proliferam e o oócito continua o seu aumento ao acumular água, iões, lípidos, ácido ribonucleico (ANR) e proteínas <sup>30,31</sup>. De seguida, inicia-se a formação de fluido folicular que é derivado da corrente sanguínea e de glicoproteínas secretadas pelas células da granulosa, dando-se como consequência o surgimento da cavidade antral (Fig. 4) <sup>21,30,31</sup>. Antes de ocorrer ovulação, sobre a influência da hormona folículo estimulante (FSH), as células do *cumulus*-granulosa que rodeiam o oócito deixam de se dividir, a camada de células mais interna forma a coroa radiata e a parede do folículo expressa recetores da hormona luteinizante (LH) <sup>21,30,31</sup>. Assim que surge um pico de LH na corrente sanguínea

dá-se uma sequência de eventos que irão provocar ovulação. Contudo, ocorre seleção de apenas um folículo para se tornar dominante enquanto os restantes folículos, que também se desenvolveram até à fase de folículo antral, entram em atresia <sup>21,30,31</sup>.

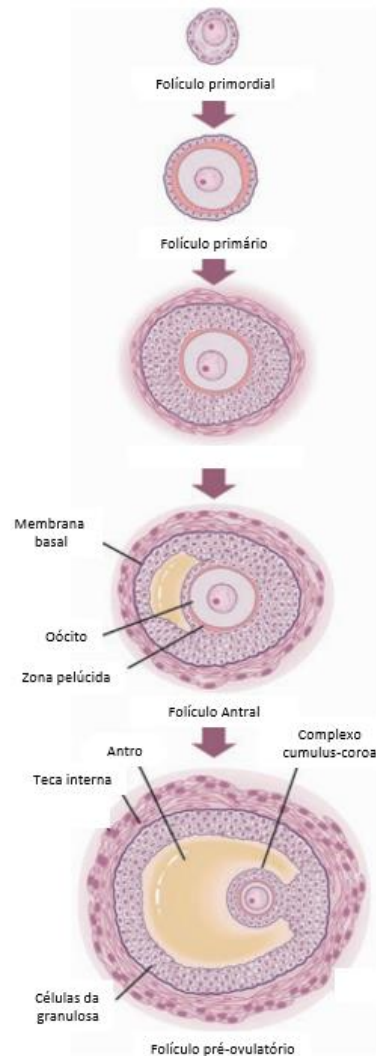


Figura 4. O desenvolvimento folicular. Adaptado de Falcone e Hurd, 2017 <sup>21</sup>.

### Desenvolvimento do oócito:

Ao contrário do que acontece com a espermatogénese, na oogénese as divisões meióticas são desequilibradas provocando a formação de apenas uma célula haploide, o oócito, e de glóbulos polares (Fig. 5) <sup>21</sup>. O ambiente presente nos folículos em desenvolvimento oferece um nicho essencial para a sobrevivência, nutrição e desenvolvimento do oócito <sup>30,31</sup>. Assim que se formam os folículos primordiais as oogónias deixam de se dividir e entram em meiose, bloqueando em prófase I <sup>21</sup>.

Seguindo a puberdade, a cada uma vez por mês e com o estímulo de um pico de FSH e LH, um grupo de oócitos bloqueados em prófase I desenvolve no interior de folículos aumentando em tamanho e adquirindo características para poderem ser fecundados assim como garantem o desenvolvimento inicial do embrião<sup>30,31</sup>. Nesta fase, os oócitos ultrapassam eventos subsequentes de maturação nuclear e eventos citoplasmáticos<sup>30,31</sup>. Em termos citoplasmáticos ocorre realocação de organelos citoplasmáticos, aumento do número de mitocôndrias e ribossomas, armazenamento de reservas e estabelecimento da polaridade do oócito<sup>30,31</sup>. Já durante a maturação nuclear ocorre quebra da vesícula germinativa, extrusão do primeiro glóbulo polar, término da primeira divisão meiótica, desenvolvimento até à metáfase II e bloqueio nesta fase até ocorrer fecundação (Fig. 5)<sup>21,30,31</sup>. Assim que se dá a fecundação, ocorre ativação oocitária provocando a extrusão do segundo glóbulo polar<sup>32</sup>.

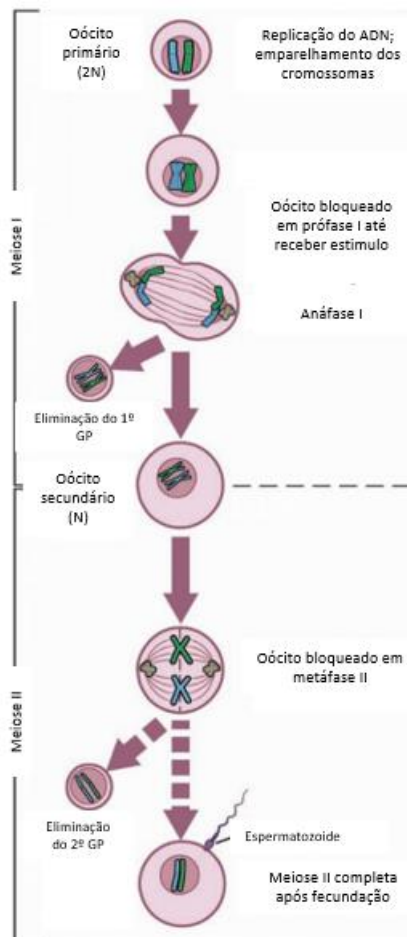


Figura 5. Desenvolvimento e maturação do oócito. Adaptado de Falcone e Hurd, 2017<sup>21</sup>.

### 1.3. O embrião e o seu desenvolvimento até à implantação

O estado de embrião é obtido através do processo de embriogénese, que consiste no desenvolvimento de um oócito fertilizado. Durante o estadio embrionário, nas primeiras oito semanas, ocorrem grandes alterações com o crescimento contínuo e aumento da complexidade dependentes da sinalização, proliferação e diferenciação celular <sup>32,33</sup>. Nessas oito semanas a primeira semana é crucial sendo que surgem uma série de eventos importantes que vão desde a deposição dos gametas até à implantação do embrião: a) Deposição do esperma b) Capacitação; c) Contacto e fusão dos gametas; d) Fertilização; e) Clivagem mitótica dos blastómeros/compactação; f) Formação da mórula; g) Formação do blastocisto; e h) implantação do blastocisto <sup>32</sup>.

#### a) Deposição do esperma

Após a deposição do esperma na vagina durante uma relação sexual os espermatozoides têm um tempo de vida entre 3-7 dias dentro do trato reprodutivo feminino. Nesta fase os espermatozoides ultrapassam um leque de adversidades tais como contrações do trato reprodutivo feminino, alterações de pH no meio, muco e defesas do sistema imunitário feminino <sup>32</sup>. Consequentemente, é neste evento que ocorre uma grande perda de espermatozoides.

#### b) Capacitação

Quando os espermatozoides são depositados na vagina estes encontram-se num estado não capacitado, mas assim que entram no útero ocorre a perda de fatores de decapitação e de esteroides da superfície dos espermatozoides (Fig. 6) <sup>34</sup>. Após a remoção destes componentes da membrana surge um aumento na permeabilidade do espermatozoide a iões de cálcio e bicarbonato <sup>32</sup>. Continuando a sua ascensão, os espermatozoides ao chegarem ao oviduto (trompas de Falópio) ligam-se às células epiteliais entrando num estado de atividade suprimida e formando um reservatório de espermatozoides que pode manter-se entre 2-5 dias (Fig. 6) <sup>34</sup>. No entanto, este reservatório pode ser estimulado por sinais extracelulares coincidentes com a ovulação, o que permite a hiperativação da motilidade dos espermatozoides e a continuação da jornada até ao encontro do oócito nas trompas de falópio <sup>34</sup>. Apesar disso, estes sinais também levam à remodelação da superfície dos espermatozoides para a expressão de recetores que vão interagir com o complexo oócito-*cumulus* (Fig. 6) <sup>34</sup>. Nesta fase os espermatozoides já se encontram capacitados dando-se a reação acrossómica, onde

ocorrem eventos de excitose resultantes da interação com glicoproteínas do complexo oócito-cumulus e do influxo de cálcio <sup>34</sup>.

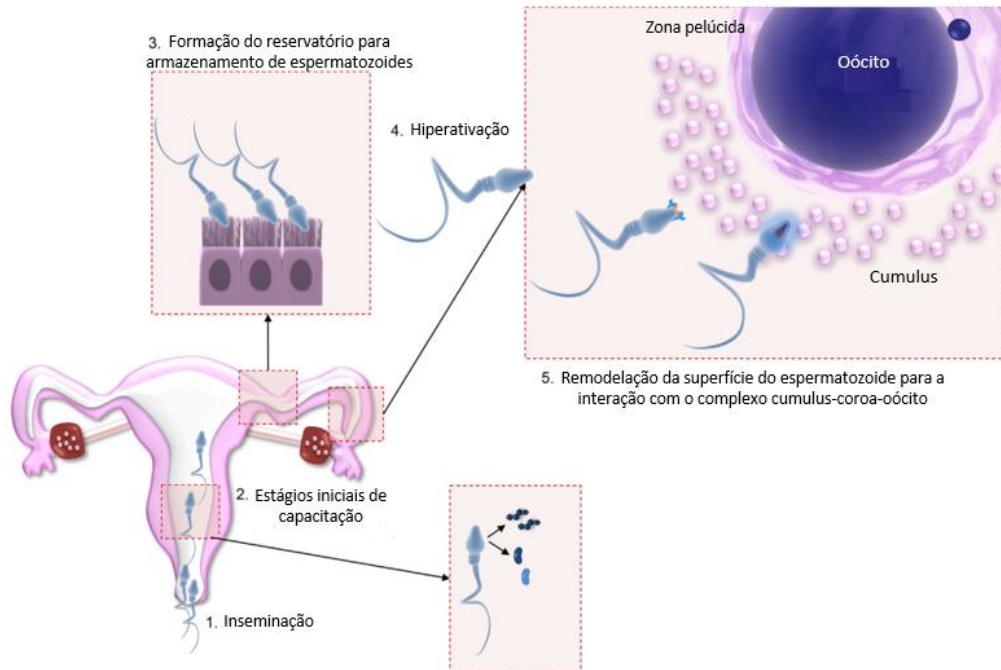


Figura 6. Capacitação dos espermatozoides. (1) No momento da inseminação ocorre a deposição dos espermatozoides, não capacitados, no trato genital feminino. (2) Assim que os espermatozoides se começam a dispersar e a ascender na cavidade uterina ocorrem alterações bioquímicas e biofísicas nos mesmos. Estas alterações consistem na perda de fatores na superfície dos espermatozoides. (3) Na chegada à parte inicial das trompas de Falópio, istmo, os espermatozoides estabelecem ligações com receptores nas células epiteliais e produz-se um reservatório pronto para a ovulação. (4) Ao receberem estímulos apropriados coincidentes com a ovulação, os espermatozoides expressam uma atividade móvel hiperativa, migrando até ao local de fecundação. (5) Apesar disso, os estímulos ainda provocam uma remodelação da superfície dos espermatozoides para interagirem com o complexo *cumulus-coroa-oócito*, indução da reação acrossómica e fecundação. Adaptado de Nixon e Bromfield, 2018 <sup>35</sup>.

### c) Contacto e fusão dos gâmetas

Após a capacitação, na reação acrossómica, ocorre a libertação de hialuronidase, acrosina e outras enzimas que facilitam a penetração do espermatozoide no oócito <sup>36</sup>. O espermatozoide ao aproximar-se do oócito tem de enfrentar 3 barreiras: coroa radiata, zona pelúcida e a membrana vitelina <sup>32</sup>. Em todas essas barreiras existem glicoproteínas aos quais se ligam receptores presentes na membrana do espermatozoide, desencadeando os eventos de excitose da reação acrossómica <sup>37</sup>. Na primeira barreira, células do *cumulus ophorus* e da coroa radiata, ocorre a passagem do espermatozoide devido à libertação de hialuronidase que degrada o ácido hialurónico

responsável pela conexão das células <sup>32,33</sup>. Com a zona pelúcida exposta a acrosina, libertada pelo acrossoma, provoca a sua lise expondo a membrana vitelina <sup>32,33</sup>.

#### d) Fertilização

Após a reação acrossómica, a membrana interna do espermatozoide fica exposta e entra em contacto com a membrana do oócito dando-se assim a fusão entre os gâmetas <sup>37</sup>. Esta fusão desencadeia um aumento de cálcio no oócito levando a uma série de eventos que impedem a penetração de mais espermatozoides, a reação cortical <sup>32,33</sup>. Nesta reação ocorre a excitose de grânulos corticais pelo oócito expelindo enzimas que vão prevenir a polispermia: remover recetores, endurecer a membrana vitelina e zona pelúcida e atrair água para o espaço perivitelino <sup>32,33,37</sup>. Apesar do aumento de cálcio no citosol do oócito provocar a reação cortical, também provoca a formação do pronúcleo do oócito devido ao estímulo da finalização da meiose II, que se encontrava bloqueada na metáfase II (Fig. 7) <sup>32</sup>. Em adição, o núcleo do espermatozoide para fundir com o pronúcleo feminino sofre descondensação da cromatina e formação de um novo envelope nuclear, originando o pronúcleo masculino devido à presença de fatores no citoplasma do oócito <sup>37</sup>. Os pronúcleos, masculino e feminino, apresentam 23 cromossomas cada, e após a sua fusão é gerada uma célula diploide com 46 cromossomas, o zigoto (Fig. 7) <sup>32,33</sup>.

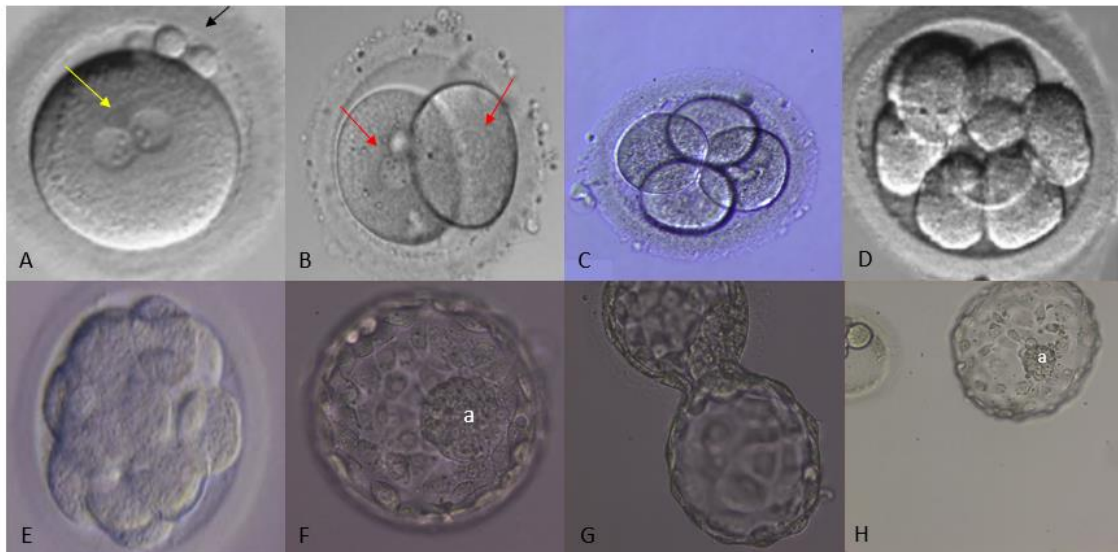


Figura 7. Desenvolvimento embrionário até ao momento de implantação. (A) Horas após a ocorrência de fertilização o zigoto apresenta 2 glóbulos polares (2GP, seta preta) e 2 pronúcleos (2PN, seta amarela). (B) Ao dia 1 é possível a visualização de 2 células, blastómeros, cada uma com o seu núcleo (setas vermelhas). Seguindo a fertilização os embriões ultrapassam uma série de divisões mitóticas, passando pelo estágio de 4 células ao dia 2 (C), 8 células ao dia 3 (D), estágio de mórula na qual ocorre compactação do embrião (E) e de blastocisto aproximadamente ao dia 5/6 (F) com a distinção entre a trofoectoderme e a massa interna (a). O embrião enquanto blastocisto eclode da zona pelúcida (G) e quando totalmente eclodido (H) encontra-se em condições para implantar na cavidade uterina. Imagens obtidas através do software RI Viewer Imaging.

#### e) Clivagem mitótica dos blastómeros/compactação

Inicialmente o zigoto encontra-se num silêncio transcricional e dando-se o seu desenvolvimento sofre uma reprogramação genética e epigenética e divisões de clivagem que promovem a ativação do genoma embrionário<sup>38</sup>. Estas primeiras divisões mitóticas são sincronizadas e a cada divisão as células vão reduzindo o seu citoplasma em relação à célula anterior, ou seja, o embrião não vai alterando o seu volume<sup>32,38</sup>. As células resultantes da segregação/clivagem são denominadas de blastómeros e estão propícias a erros associados a aneuploidias e a uma separação desigual do volume dos blastómeros associada a uma maior probabilidade de multinucleações<sup>39</sup>. Até ao estágio de 8-células as divisões mitóticas são comandadas por ANR, proteínas, organelos e outros fatores maternos (Fig. 8)<sup>32,38,40</sup>. Após este estágio os blastómeros aumentam a sua aderência, compactando, e tornam-se totipotentes demonstrando autonomia ao expressar os seus genes enquanto o ANR maternal vai desaparecendo (Fig. 8)<sup>32,38</sup>. Durante esta fase inicial de desenvolvimento o embrião ultrapassa pelos seguintes estágios: 2-células ao dia 1; 4-células ao dia 2; 8-células ao dia 3, onde se inicia a compactação; e por último 16-células ao dia 4 (Fig. 7; Fig. 8)<sup>32</sup>.

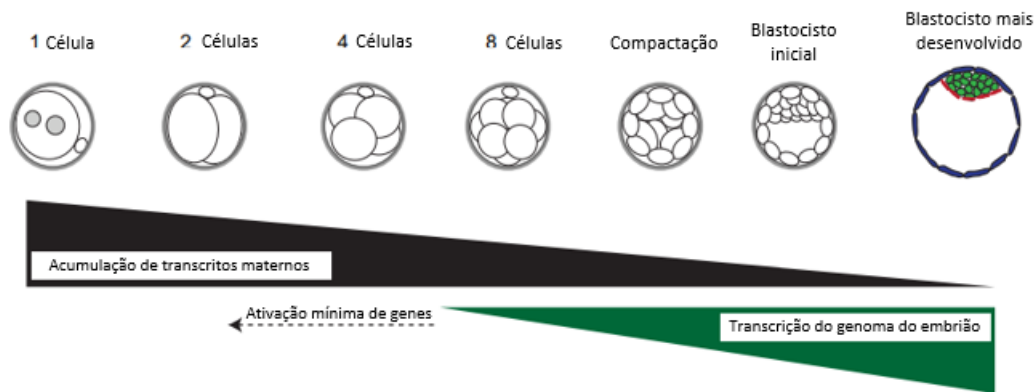


Figura 8. Atividade transcricional durante o desenvolvimento do embrião pré implantação. Nos estágios iniciais o embrião apresenta uma atividade transcricional nula, sendo orientado por transcritos maternos herdados do oócito e através das subsequentes divisões mitóticas estes são degradados. A ativação do genoma do embrião ocorre entre o estágio de 4 e 8 células. Adaptado de Niakan et al., 2012 <sup>41</sup>.

#### f) Formação da mórula

Um embrião entre 16-32 células compactadas encontra-se no estágio de mórula e é considerado de boa qualidade quando todos os blastómeros estão inclusos na compactação, caso contrário pode estar associado a uma probabilidade reduzida de desenvolvimento (Fig. 7) <sup>42</sup>. Na fase final da compactação reaparecem os limites entre as células e as células do interior da mórula vão originar o embrião propriamente dito e as células do exterior vão ser essenciais para a cavitação da mórula <sup>32</sup>. Ao iniciar-se a cavitação, as células do exterior da mórula regulam de forma positiva os transportadores de Na<sup>+</sup> o que provoca uma maior pressão osmótica no interior, aumentando assim a entrada de água e criando uma cavidade de fluido, o blastocele <sup>32,42</sup>.

#### g) Formação do blastocisto

A formação do blastocele e a sua subsequente expansão são essenciais para causar pressão sobre a zona pelúcida e consequentemente rutura da mesma e também para a diferenciação da massa celular interna <sup>32,40</sup>. Durante esta fase ocorre a localização da massa celular interna que corresponde a um grupo de células estaminais embrionárias com desenvolvimento não restrito e que por diferenciação e divisões irão resultar no feto <sup>32</sup>. Já a camada de células exteriores que protege a massa celular interna, trofoectoderme, irá resultar na placenta e tecido extraembrionário <sup>32,40</sup>.

Nesta fase de expansão, ocorre um aumento de volume do embrião que consequentemente causa a rutura da zona pelúcida, permitindo a eclosão do blastocisto (Fig. 7) <sup>40</sup>.

#### h) Implantação do blastocisto

Com a remoção completa da zona pelúcida o blastocisto tem a capacidade para implantar no endométrio (Fig. 7), no entanto, este processo depende de hormonas, tais como estrogénios e progesterona, que influenciam a expressão de citocinas e fatores de crescimento aumentando a recetividade do útero <sup>38</sup>. Apesar disso, a aproximação do blastocisto à parede uterina dá-se por fatores de adesão e sinalização de polaridade, orientando o mesmo com o lado da massa celular interna como primeiro a estabelecer ligação com o endométrio <sup>32</sup>. Este evento acontece aproximadamente ao sétimo dia de desenvolvimento e logo de seguida as células do trofoblasto iniciam a diferenciação para completar a implantação e permitir o subsequente desenvolvimento do embrião

<sup>32,38</sup>

## 1.4. Infertilidade

A infertilidade é uma doença caracterizada pela ausência de gravidez no casal depois de 12 meses de relações sexuais frequentes e desprotegidas, mas também pode ser caracterizada pela presença de problemas na capacidade de reprodução de um indivíduo ou do casal <sup>43,44</sup>. Globalmente suspeita-se que cerca de 48 milhões de casais e 186 milhões de indivíduos sofrem de infertilidade <sup>45-47</sup>. Este problema não é caracterizado pela impossibilidade de obter uma gravidez, uma vez que pode ser contornado e quando é impossível contornar é considerado esterilidade <sup>44,48</sup>. Além disso, a infertilidade pode ser dividida em primária e secundária. Na infertilidade primária não existe histórico de uma gravidez anterior ao diagnóstico de infertilidade, enquanto a infertilidade secundária surge quando ocorreu uma gravidez antes do diagnóstico <sup>44</sup>.

A infertilidade é um problema que coloca em causa alguns direitos humanos como o direito a decidir o número, tempo e espaço para um ser humano ter a sua descendência. Deste modo, o diagnóstico e tratamento da infertilidade é um elemento essencial para o exercer do direito dos casais e indivíduos de ter uma família <sup>48</sup>.

Fatores de infertilidade:

### 1. Planeamento de concepção

É evidente que planear uma relação sexual na janela fértil do ciclo menstrual aumenta a probabilidade de se ter uma gravidez espontânea. No entanto, existe por vezes uma falta de informação ou de gestão nos casais para planear a altura certa para uma concepção, sendo esse um dos principais fatores que afeta o surgimento de uma gravidez espontânea <sup>44</sup>. Contudo, existem casais cujo planeamento não tem resultados. Nos casos onde não ocorre gravidez nos primeiros 12 ciclos com relações sexuais frequentes durante o período fértil são definidos como inférteis, contudo ainda existe uma probabilidade razoável de desenvolverem uma gravidez espontânea. Após 48 meses sem uma gravidez espontânea metade desses casos têm uma probabilidade muito próxima de zero para a conseguirem <sup>49</sup>.

### 2. Idade

A fertilidade no homem e na mulher varia de forma diferente com a idade, verificando-se um declínio entre os 25-30 anos na mulher, contudo, é a partir dos 35 anos que se inicia um declínio abrupto <sup>50</sup>. Este declínio e o facto de os casais decidirem ter uma gravidez numa fase mais tardia tem resultado em problemas atuais nos países

desenvolvidos, como a diminuição da fertilidade <sup>50,51</sup>. É sugerido que na mulher a diminuição da fertilidade com a idade deve-se à depleção contínua e esgotamento na menopausa de oócitos que se encontram nos ovários <sup>52</sup>. Complementarmente, também se verifica uma diminuição na qualidade dos oócitos, uma menor probabilidade de implantação do embrião assim como maior probabilidade de aborto <sup>53</sup>. Em contraste, o homem só a partir dos 40 anos tem uma redução na produção de testosterona o que resulta numa diminuição do funcionamento das gónadas. Para além disso, ao longo do envelhecimento também é possível verificar uma diminuição no volume, motilidade, e morfologia normal do esperma <sup>54</sup>.

### 3. Infertilidade relacionada com doenças

#### 3.1. Fatores que afetam ambos os sexos

Existem doenças que podem afetar a fertilidade de ambos os sexos como hipogonadismo hipogonadotrófico (1), hiperprolactinemia (2), problemas relacionados com funcionalidade ciliar (3), fibrose cística (4), infeções (5), doenças sistémicas (6) e fatores relacionados com o estilo de vida ou exógenos (7) <sup>44</sup>.

(1) - O hipogonadismo hipogonadotrófico é caracterizado pela estimulação insuficiente da LH e da FSH nas gónadas, o que resulta numa produção anormal dos gâmetas <sup>53</sup>.

(2) - Na hiperprolactinemia a libertação de gonadotrofinas é inibida pela prolactina o que causa anovulação <sup>53</sup>, enquanto no sexo masculino causa baixos níveis de testosterona no sangue, infertilidade e disfunção sexual <sup>55</sup>.

(3) - Os cílios têm uma função importante no transporte dos espermatozoides, oócitos e embriões ao longo das trompas de Falópio. Neste órgão os cílios podem ser afetados por inflamação, agentes patogénicos ou discinesia ciliar primária, comprometendo o transporte nas trompas de Falópio <sup>53</sup>. Por outro lado, no sexo masculino a discinesia ciliar primária causa um movimento flagelar anormal nos espermatozoides <sup>56</sup>

(4) - A fibrose cística no sexo feminino afeta de forma negativa as células epiteliais do trato reprodutivo, levando à produção de muco cervical espesso dificultando a passagem do esperma. Já no sexo masculino normalmente ocorre ausência de canais deferentes e vesícula seminal bilateralmente ou unilateralmente, reduzindo o volume de ejaculado <sup>44</sup>.

(5) - Os agentes infecciosos podem danificar órgãos ou células, criar uma obstrução ou até ligar-se aos espermatozoides no sexo masculino <sup>44</sup>. Já no sexo feminino estes agentes podem causar inflamação pélvica ou uma obstrução tubária <sup>53</sup>.

(6) - As doenças sistémicas normalmente influenciam de forma negativa a implantação do embrião, e as doenças autoimunes podem prejudicar a fertilidade de ambos os géneros <sup>44</sup>.

(7) – Um outro motivo pelo qual existe redução de fertilidade é o estilo de vida e fatores exógenos. A frequência das relações sexuais, hábitos alimentares, exercício exagerado, stress, obesidade, medicamentos, o hábito de fumar e o consumo de cannabis e álcool, são muitos dos fatores que podem influenciar a fertilidade em ambos os sexos <sup>44</sup>.

### 3.2. Fatores que afetam a fertilidade feminina

A infertilidade feminina caracteriza-se por problemas de ovulação, doenças tubárias, endometriose ou fatores uterinos ou cervicais <sup>57</sup>, ou seja, algo que afeta a fecundação, desenvolvimento embrionário e fetal e a implantação. Alguns desses fatores são:

- Insuficiência ovárica prematura: acontece quando os ovários perdem a sua funcionalidade antes dos 40 anos, <sup>43</sup>. Pode ser de origem genética, ambiental, infecciosa, metabólica, autoimune, provocada por terapia ou cirurgia derivada de cancro e em alguns casos desconhecida <sup>44</sup>.
- Síndrome de ovário policístico: afeta cerca de 5-10% do sexo feminino e, para além dos problemas ovulatórios, também causa um decréscimo na probabilidade de implantação dos embriões <sup>44</sup>.
- Obstrução das trompas de Falópio: Nestes casos ocorre a interrupção do encontro dos espermatozoides com o oócito, sendo este problema responsável por aproximadamente 20% dos casos de infertilidade <sup>43</sup>.
- Anomalias uterinas: são anomalias causadas pelo mau desenvolvimento do ducto Müllerian na embriogénese. Este problema é responsável por 7,3% dos casos de infertilidade e tem uma frequência de 6,7% na população em geral <sup>43</sup>.
- Pólipos endométrios: Na presença destes pólipos estimou-se que existe um decréscimo na probabilidade de implantação embrionária e também um aumento na probabilidade de aborto <sup>44</sup>.
- Endometriose: Este problema pode levar a infertilidade ao causar deformações anatómicas devido a adesões e fibroses, mas também pode causar anormalidades endócrinas e distúrbios imunológicos <sup>44</sup>. Cerca de 12,5% dos casos de infertilidade

primária e 11,1% dos casos de infertilidade secundária estão relacionados com endometriose <sup>43</sup>.

### 3.3. Fatores que afetam a fertilidade masculina

Acredita-se que cerca de 7% dos homens sofrem de infertilidade (Krausz, 2011). A qualidade, quantidade de espermatozoides no esperma ou ambos são os fatores responsáveis pela incapacidade para ter uma gravidez espontânea e estes tanto podem ser congénitos (a) ou adquiridos (b) <sup>57,58</sup>:

#### (a) Fatores congénitos

- Anorquia: É caracterizada pela ausência de testículos e consequentemente ausência de esperma, num indivíduo com fenótipo masculino e genótipo 46, XY <sup>59</sup>.

- Criptorquidia: É o defeito congénito à nascença que mais ocorre em crianças do sexo masculino. É definida pela falha da descida de pelo menos um testículo para o escroto fazendo com que este fique exposto à temperatura corporal, o que afeta de forma negativa a qualidade e quantidade espermatozoides no esperma <sup>60</sup>.

- Anormalidades genéticas: Diversas mutações genéticas podem causar doenças que afetam a fertilidade masculina tais como síndrome de Klinefelter, microdeleções no cromossoma Y, síndrome de Kallmann e a síndrome da insensibilidade a andrógenos <sup>58</sup>.

#### (b) Fatores adquiridos

- Trauma testicular: Após a puberdade ou durante a puberdade os traumas testiculares podem levar a alterações na produção do esperma <sup>61</sup>.

- Obstrução ou sub-obstrução do trato urogenital proximal e/ou distal: Apesar dos pacientes terem uma funcionalidade testicular normal, a obstrução ou subobstrução pode causar ausência de espermatozoides no esperma ou apenas uma diminuição na concentração de espermatozoides <sup>58</sup>.

- Varicocele: Este é um dos fatores mais comuns na infertilidade masculina, e é definida pela dilatação das veias que drenam o sangue dos testículos <sup>62</sup>. Este problema pode causar aumento da temperatura testicular, da pressão intra-testicular, hipoxia devido à atenuação do fluxo sanguíneo e refluxo de metabolitos tóxicos <sup>62</sup>. Consequentemente,

ocorrem anormalidades no esperma, diminuição do volume dos testículos e da função das células de Leydig <sup>58</sup>.

- Cirurgias que podem afetar a vascularização dos testículos

- Disfunção erétil ou de ejaculação: São problemas raros na infertilidade. Na ausência de espermatozoides no líquido seminal e presença na urina após masturbação, é diagnosticado ejaculação retrógrada <sup>58</sup>.

## 2. Técnicas laboratoriais de Procriação Medicamente Assistida

### 2.1. Laboratório de Andrologia

#### 2.1.1. Avaliação espermática

O ejaculado consiste numa mistura de secreções com dois componentes principais, os espermatozoides (produzidos pelos testículos) e os fluidos seminais (produzidos pelas glândulas sexuais acessórias), contudo, esta mistura só se dá quando os componentes são expulsos para o exterior<sup>63,64</sup>. Numa avaliação espermática tem-se como objetivo analisar o normal funcionamento dos testículos, assim como avaliar a fertilidade e o sucesso de cirurgias como vasectomias<sup>63</sup>. Para isto, são examinados os dois componentes principais através de atributos quantificáveis: a concentração de espermatozoides e o volume do ejaculado; contudo, existem muitos outros fatores que devem ser avaliados como características físicas do ejaculado, morfologia e motilidade dos espermatozoides<sup>63,64</sup>. Apesar da avaliação espermática ser um dos exames mais importantes no laboratório para avaliar fatores masculinos, permanece um processo complexo e difícil de padronizar<sup>63</sup>. Existem diversas variáveis, tanto de medidas no laboratório como do próprio paciente, que podem influenciar a análise ou composição do sémen: coleta ou não de todo o esperma; a atividade das glândulas sexuais acessórias; o tempo de abstinência ejaculatória; o tamanho dos testículos do paciente; o estado endócrino; medicação do paciente; e suplementos ou medicamentos não prescritos<sup>64</sup>.

Para uma avaliação espermática básica é fundamental procedimentos pré-processamento e procedimentos de processamento:

#### A. Pré-processamento

Estes procedimentos consistem na angariação de informação sobre o paciente e na colheita e entrega da amostra. Antes de tudo é aconselhado ao paciente 2-7 dias de abstinência sexual como é recomendado pelas regras da “*World Health Organization*” (WHO)<sup>64</sup>. Contudo, alguns estudos indicam que períodos de abstinência curtos levam a melhores resultados a nível de motilidade, morfologia e integridade do ADN dos espermatozoides enquanto períodos longos resultam em melhorias no volume do

sémen e na concentração de espermatozoides <sup>65</sup>. Após a receção da colheita esta deve permanecer entre 20-37°C para concluir a liquefação, a qual deverá terminar entre 15-30 minutos <sup>64,65</sup>. Se a colheita não for realizada numa sala privada ao lado do laboratório, é aconselhado a deslocação do frasco de colheita junto ao corpo e de preferência entregue no laboratório num máximo 30-50 minutos <sup>64</sup>.

## B. Processamento

Após a liquefação, ou seja, depois de 30-50 minutos da ejaculação, o sémen deverá ser avaliado, sendo que a exposição *in vitro* duradoura afeta qualidades como a motilidade e morfologia dos espermatozoides <sup>64,65</sup>. Para a avaliação é necessário a utilização de material estéril, guias de segurança e boas práticas de laboratório uma vez que o sémen é uma amostra de risco biológico por ser um possível portador de agentes infecciosos <sup>64,65</sup>.

Nesta fase são avaliadas características macroscópicas e microscópicas do sémen após a liquefação:

### 1) Avaliação macroscópica

- Aspecto e cor do ejaculado: Segundo a WHO (2021) um ejaculado normal deverá ter uma aparência homogénea e uma cor creme/cinzenta opalescente <sup>64</sup>; para além disso, o nível de opacidade está associado à concentração de espermatozoides, ou seja, quanto mais opaco maior será a concentração dos mesmos <sup>64,65</sup>; por outro lado, fora do que poderá ser normal, surgem outras cores como ligeiramente amarelado devido a períodos de abstinência prolongados, vermelho acastanhado pela presença de eritrócitos (hematospermia) ou um amarelo bem visível que sugere doença no fígado ou consumo de determinadas drogas/vitaminas <sup>64,65</sup>.

- Liquefação: A liquefação inicia-se logo a seguir à ejaculação, tornando o ejaculado coagulado num fluido mais aquoso, mas com viscosidade superior à água; a WHO sugere uma temperatura de 37°C e uma agitação suave da colheita para facilitar a liquefação, no entanto, caso não haja agitação durante a liquefação é aconselhado uma agitação suave durante 15-30 segundos antes de analisar a amostra <sup>64</sup>.

- Viscosidade: A viscosidade do sémen pode ser avaliada aspirando-o com uma pipeta e deixando cair devido à gravidade, caso a gota não caia de forma discreta e forme um fio maior que 2cm é considerada uma viscosidade elevada <sup>64,65</sup>; em situações de viscosidade elevada a avaliação da concentração e motilidade dos espermatozoides

são afetadas, podendo ser ultrapassada ao adicionar meio fisiológico ou enzimas proteolíticas <sup>65</sup>.

- Odor: Caso surja um cheiro de urina ou de putrefação é importante ser registado e pode revelar importância clínica, apesar disso, existe uma diversidade na intensidade do cheiro “*sui generis*” do sémen <sup>64</sup>.

- Volume: O volume de uma amostra de sémen permite a determinação do seu número total de espermatozoides e reflecte o funcionamento das glândulas acessórias sexuais <sup>65</sup>. Para a medição do volume a WHO (2021) recomenda pesar o sémen juntamente com o frasco de colheita e de seguida é feita a subtração do peso do frasco ao peso do conjunto resultando no peso/volume do sémen (1 g/ml) <sup>64</sup>; adicionalmente, se o volume registado for entre 1.5-6 ml é considerado um volume normal de ejaculado <sup>65</sup>.

- pH: *In vitro* o ejaculado tem tendência para se tornar cada vez mais alcalino, uma vez que vai perdendo CO<sub>2</sub>, sendo assim, o ideal para a leitura do pH será 30 minutos após ejaculação e nunca ultrapassar 1 hora; a medição do pH consiste na deposição de uma gota de sémen bem misturado no papel medidor de pH e a cor que surge é comparada com a faixa de calibração; os valores obtidos para serem considerados normais devem estar entre o intervalo 6.0-10.0, em contraste, valores abaixo dos 7.2 indicam falta de fluido seminal alcalino e valores acima do normal estão relacionados com atrasos de medição e mau manuseamento da amostra <sup>64,65</sup>.

## 2) Avaliação microscópica

- Aglutinação: A aglutinação consiste na ligação entre espermatozoides móveis afetando a motilidade dos mesmos e a sua gravidade depende da estrutura que aglutina e do número de espermatozoides <sup>64,65</sup>; devido à ligação entre espermatozoides esta característica pode influenciar de forma errática as medições da motilidade e concentração <sup>65</sup>.

- Agregações: Ao contrário da aglutinação, a agregação consiste na ligação de espermatozoides a outras células ou a espermatozoides imóveis e fios de muco; contudo, também afeta as medições da motilidade e concentração de espermatozoides <sup>64</sup>.

- Presença de outras células: Para além de espermatozoides o sémen pode apresentar outras células tais como células epiteliais do trato genital urinário, células germinativas imaturas e leucócitos; contudo, não é possível distinguir leucócitos de células germinativas imaturas sem a utilização de uma técnica de coloração <sup>64,65</sup>.

- Concentração de espermatozoides: a concentração é designada pelo número de espermatozoides numa unidade de volume de sémen e está relacionada com o volume dos testículos, com a funcionalidade dos órgãos reprodutivos, assim como dependente do volume do líquido seminal e prostático <sup>64,65</sup>. A determinação da concentração de espermatozoides numa amostra varia e depende do tipo de material usado assim como do método. Adicionalmente, a calibração dos materiais/aparelhos usados é extremamente importante para assegurar uma medição com precisão <sup>63</sup>.

A WHO (2021)<sup>64</sup> recomenda:

- o uso de uma câmara de contagem, hemocitómetro Neubauer (Fig. 9)
- microscópio ótico de contraste de fase em ampliação x200 ou x400
- uma contagem mínima de 200 espermatozoides em cada réplica para não se ultrapassar um valor aceitável de erro de amostragem
- Na contagem a linha do meio presente nas três linhas que delimitam um quadrado grande (Fig. 9), deve ser considerado o limite de contagem
- Na performance das réplicas contar o mesmo número de redes e quadrados na qual se fez a primeira contagem
- Para os cálculos da concentração a soma das réplicas deve ser dividida por um fator obtido através da diluição e número de redes ou quadrados grandes contados (Fig. 9)

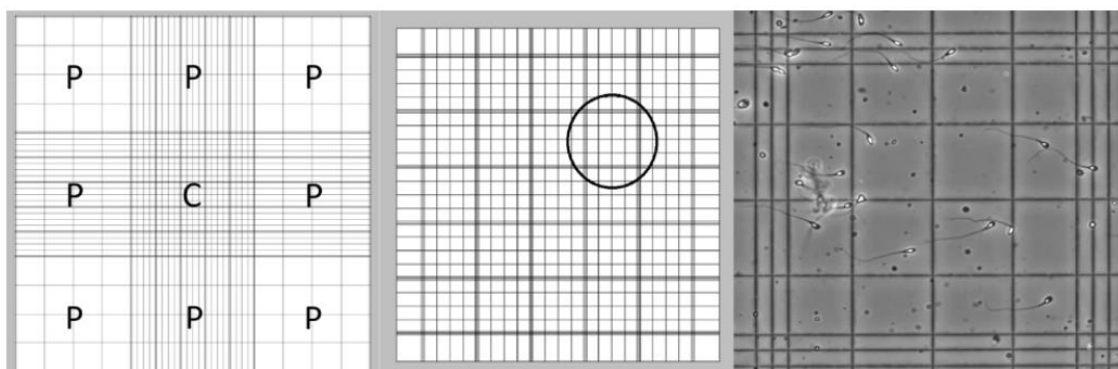


Figura 9. Hemocitómetro Neubauer. No painel da esquerda está representado um esquema da área de visualização do hemocitómetro, onde se encontra um quadrado grande central (C) e oito quadrados grandes na periferia (P). O quadrado central apresenta 25 quadrados médios (painel do meio), sendo possível verificar em cada círculo no painel do meio) 16 quadrados pequenos incorporados (painel da direita). Adaptado de *World Health Organization*, 2021 <sup>64</sup>.

O valor de  $15 \times 10^6$  por mililitro é considerado o limite entre um valor aceitável de espermatozoides e o que é considerado oligozoospermia (abaixo dos  $15 \times 10^6$ ). Por outro lado, o caso de ausência de espermatozoides é definido como azoospermia e para se confirmar o diagnóstico é necessário a análise de pelo menos duas colheitas

realizadas em dias diferentes. Para além disso, ainda na confirmação é necessário a centrifugação e subsequente avaliação do sedimento <sup>65</sup>.

- Número total de espermatozoides: após a determinação da concentração é possível determinar o número total de espermatozoides numa colheita através da multiplicação do volume e concentração de espermatozoides nessa mesma colheita <sup>64</sup>.

- Motilidade dos espermatozoides: Assim que a liquefação se encontra completa deve ser determinada a motilidade do ejaculado, uma vez que este sofre desidratação e alterações no pH e temperatura, o que influencia de forma negativa a motilidade <sup>64,65</sup>. A WHO (2021) para a determinação da motilidade sugere passos semelhantes aos da determinação da concentração de espermatozoides, contudo existem outras recomendações <sup>64</sup>:

- É necessário a contagem de 5 campos por réplica no mínimo, caso nesses 5 campos não existir pelo menos 200 espermatozoides aumentar o número de campos até perfazer 200 espermatozoides
- A escolha dos campos deve ser feita de forma aleatória
- Em cada campo deve ser selecionada uma área para se realizar a contagem
- No final calcular a percentagem de cada categoria de motilidade

A WHO (2021) classifica a motilidade em 4 categorias: progressivos rápidos, espermatozoides com movimento ativo e uma direção delineada; progressivos lentos, espermatozoides com características semelhantes aos anteriores, no entanto, com movimento mais lento; não progressivos, espermatozoides que apresentam movimento flagelar, contudo, não se deslocam do mesmo local ou em círculos muito pequenos; e imóveis, aqueles que não apresentam qualquer movimento <sup>64</sup>. Apesar disso, a WHO estabelece um limite de referência de 32% de espermatozoides progressivos, caso haja menos que esse valor é considerado astenozoospermia <sup>64</sup>.

- Vitalidade dos espermatozoides: Quando a concentração de espermatozoides móveis é inferior a 40%, é importante distinguir entre os espermatozoides imóveis aqueles que estão mortos (necrozoospermia) e os que estão vivos, mas com problemas de motilidade (astenozoospermia) <sup>64,66</sup>. Sendo assim, a vitalidade corresponde à percentagem de espermatozoides imóveis vivos através da avaliação da integridade da membrana dos mesmos numa amostra de sémen <sup>66</sup>. Para além disso, o teste mais usado é o da coloração eosina-nigrosina, onde a eosina penetra células com membrana comprometida, mortas, e não células com membrana intacta, vivas, deste modo, ocorre coloração dos espermatozoides não viáveis (Fig. 10) <sup>64,66</sup>. Uma desvantagem deste

método é o facto de as amostras usadas para o teste não poderem ser usadas de seguida para as técnicas de PMA <sup>66</sup>. Adicionalmente, existe um outro método, menos usado que o teste eosina-nigrosina, que permite o uso das amostras testadas nas técnicas de PMA, o teste hiposmótico. Neste teste os espermatozoides vivos com uma membrana intacta, semipermeável, irão aumentar em volume flagelar na presença de uma solução hipotónica (Fig. 10) <sup>65,66</sup>. Contudo, a WHO (2021) sugere o teste da eosina-nigrosina para testar a vitalidade, não existindo um limite exato, no entanto, caso mais de 25-30% dos espermatozoides forem vivos e imóveis a causa pode ser um problema genético ciliar <sup>64</sup>.

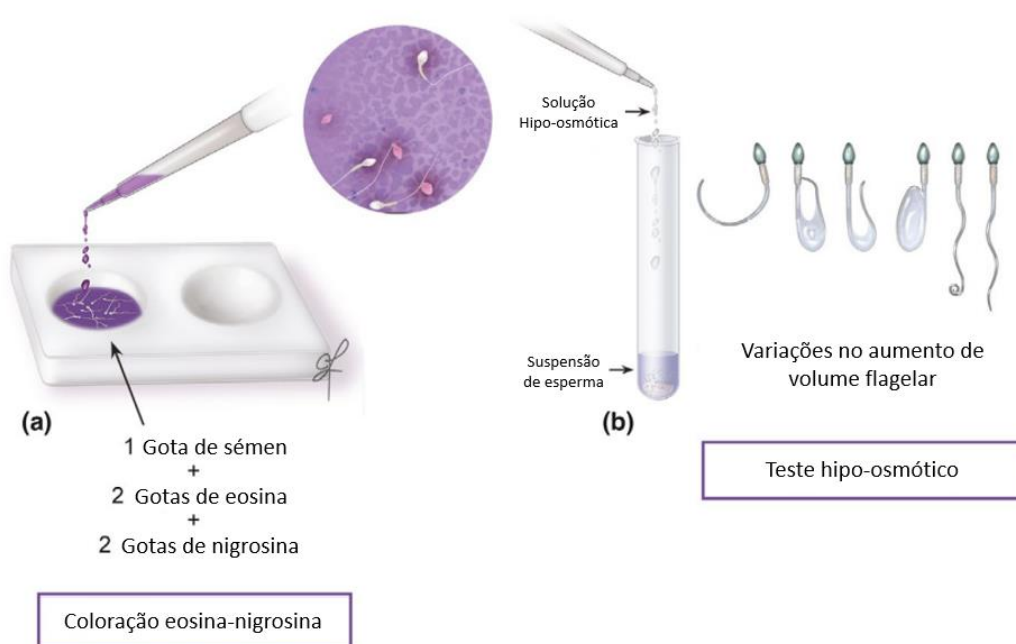
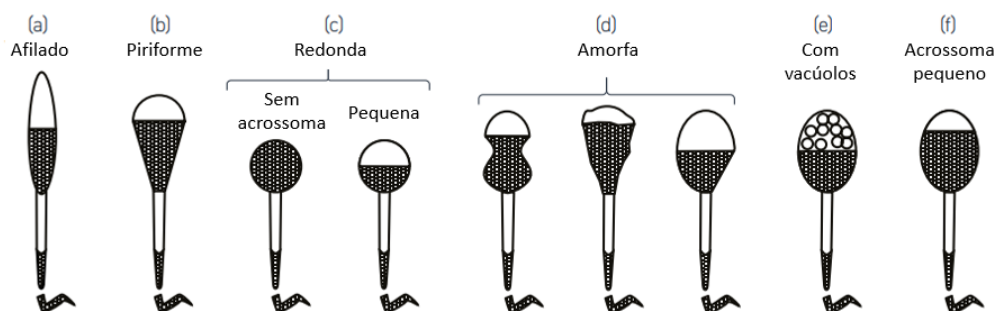


Figura 10. Testes de viabilidade espermática. (a) Coloração com eosina-nigrosina. (b) Teste hipo-osmótico. Adaptado de Baskaran et al., 2020 <sup>67</sup>.

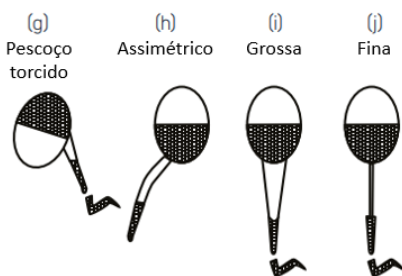
- Morfologia dos espermatozoides: a morfologia, assim como a concentração e motilidade dos espermatozoides, é essencial para a avaliação do funcionamento do sistema reprodutor masculino (principalmente testículos e epidídimos). Na espermatogénese ocorre as principais reorganizações morfológicas que não são homogéneas levando á produção de um ejaculado com espermatozoides de diversas aparências morfológicas <sup>64,68</sup>. Apesar disso, defeitos morfológicos específicos como globozoospermia, caudas múltiplas, sem cabeça e displasia da bainha fibrosa estão associados a doenças genéticas <sup>65,68</sup>. Observações de amostras de espermatozoides recolhidos do trato reprodutor feminino, como mucos endocervical e da superfície da

zona pelúcida, permitiram uma melhor definição de um espermatozoide “normal”, ou seja, com potencialidade de fertilização. Sendo assim, a avaliação da morfologia consiste na análise de anomalias presentes na cabeça, peça intermédia, cauda e a presença de resíduos citoplasmáticos nos espermatozoides (Fig. 11) <sup>64</sup>. Além disso, também é analisada/registada a presença de defeitos específicos nos espermatozoides, células germinativas imaturas e células que não são espermatozoides <sup>64</sup>. A avaliação da morfologia dos espermatozoides consiste nos seguintes passos: esfregaço de uma gota de amostra numa lâmina, secagem ao ar livre, fixação, coloração e análise ao microscópio <sup>65</sup>. Na fase de coloração existem corantes como Papanicolau [sugerido pela WHO, (2021)], Shorr e Diff-Quick, os quais garantem uma coloração diferencial entre a cabeça, acrossoma, cauda e resíduos citoplasmáticos <sup>64,65</sup>. Concluindo, a WHO (2010) estabeleceu um limite mínimo de 4% para espermatozoides de morfologia “normal” para se considerar infertilidade (teratozoospermia), no entanto, na sexta edição, WHO (2021), não se estabelece limite mínimo de morfologia “normal” sendo que esses limites podem não corresponder à realidade de um indivíduo <sup>64</sup>.

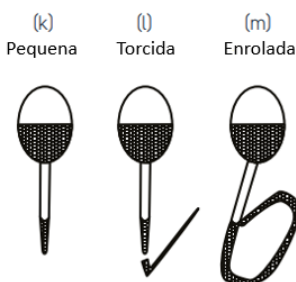
**A. Defeitos na cabeça**



**B. Defeitos na peça intermédia**



**C. Defeitos na cauda**



**D. Excesso de resíduos citoplasmáticos**



Figura 11. Anomalias morfológicas nos espermatozoides. Adaptado de *World Health Organization*, 2021 <sup>64</sup>.

## 2.1.2. Extração de espermatozoides

A infertilidade é um problema com diversas causas e uma grande parte delas pode ser masculina, como é o caso da azoospermia (10-20% dos casos de infertilidade masculina) e este problema pode ter origem obstrutiva ou não obstrutiva (60% dos casos de azoospermia) <sup>69,70</sup>. Para contornar a ausência de espermatozoides no ejaculado surgiram diversas técnicas para recolha de espermatozoides nos testículos ou epidídimos, tais como: aspiração testicular de espermatozoides (TESA), aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo (PESA), extração de espermatozoides testiculares (TESE), microaspiração de espermatozoides do epidídimo (MESA) e micro-TESE. Estas técnicas, para além de serem exercidas em situações de azoospermia não obstrutiva e azoospermia obstrutiva quando a tentativa de reconstrução falhou, são também uma opção para falhas na ejaculação durante um ciclo de ICSI e em asteno-/necrozoospermia total <sup>71</sup>. Contudo, na maioria das situações de azoospermia não obstrutiva só se tornou possível ultrapassar a infertilidade devido ao desenvolvimento das técnicas de recolha de espermatozoides dos testículos e epidídimos, assim como ao desenvolvimento da ICSI, ao contrário do que acontecia no passado onde os pacientes apenas tinham como alternativa a doação de espermatozoides ou adoção <sup>69</sup>.

### **TESA**

A TESA corresponde à aspiração de esperma do testículo não sendo necessário material cirúrgico e pessoal especializado, para além disso desenvolveu-se a partir da biópsia testicular (Fig. 12) <sup>72</sup>. Para este tipo de extração surgiram métodos de aspiração com agulha fina para se recolher os espermatozoides: pistola de biópsia ou agulha entre 19-23 de calibre <sup>72</sup>.

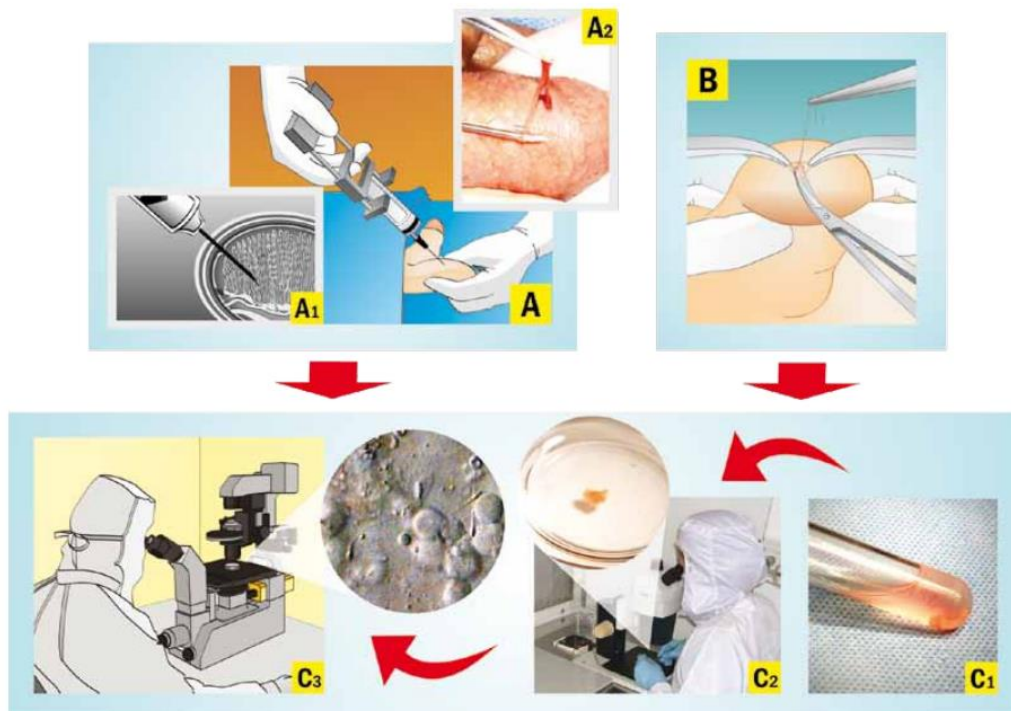


Figura 12. Técnicas de extração de espermatozoides do testículo. A) Aspiração testicular (TESA). Uma agulha associada a uma seringa é inserida no testículo. A seringa é movida dentro do testículo de forma a romper os túbulos seminíferos e aspirar espermatozoides de diferentes áreas (A1). Um pedaço de tecido é aspirado e com a ajuda de pinças é removido (A2). B) Extração convencional de espermatozoides (TESE). As amostras colhidas são mergulhadas em meio de cultura adequado (C1), e o tubo é transferido para o laboratório para processamento posterior (C2). O homogeneizado é no final analisado microscopicamente e confirmada a presença de espermatozoides (C3). Adaptado de Esteves et al. 2011 <sup>73</sup>.

Durante a aspiração do esperma, este é aspirado para um tubo com meio aquecido e logo de seguida transferido para o laboratório, onde se dá a análise microscópica para a presença de espermatozoides, caso estes estejam ausentes pode executar-se aspiração do testículo do lado oposto <sup>74</sup>.

## TESE

Este método consiste em biópsias testiculares para posterior extração dos espermatozoides do tecido recolhido (Fig. 12), apesar disso, nos dias de hoje é considerado o método padrão por ter melhores probabilidades de recolha de espermatozoides (excluindo a micro-TESE) <sup>72</sup>. Esse melhor rendimento na recolha deve-se à maior quantidade de tecido que é removido, contudo, tem taxas de complicações mais elevadas e maior tempo de operação com as múltiplas biópsias. Apesar de tudo, as vantagens deste método sobrepõem-se às suas desvantagens <sup>72</sup>.

Com a TESE conseguem ser extraídos espermatozoides em cerca de 50-60% dos casos de azoospermia não obstrutiva e 100% dos casos de azoospermia obstrutiva <sup>75</sup>.

Concluindo, existem questões que ainda ficam por responder como o melhor local para se recolher tecido no testículo e quantas biópsias devem ser realizadas <sup>72</sup>.

### **Micro-TESE**

A micro-TESE surgiu com o intuito de colmatar problemas que ocorrem da TESE, sendo que nesta última ocorriam interrupções na vasculatura do testículo, devido às múltiplas biópsias exercidas, o que pode resultar em atrofia testicular <sup>72</sup>. Este método, como consiste numa operação com um microscópio (Fig. 13) para a procura de locais de produção no testículo, apresenta melhores taxas de recolha de espermatozoides em comparação com a TESE, contudo, a micro-TESE ainda é recente, não foi totalmente aceite e também apresenta as suas desvantagens <sup>72</sup>.

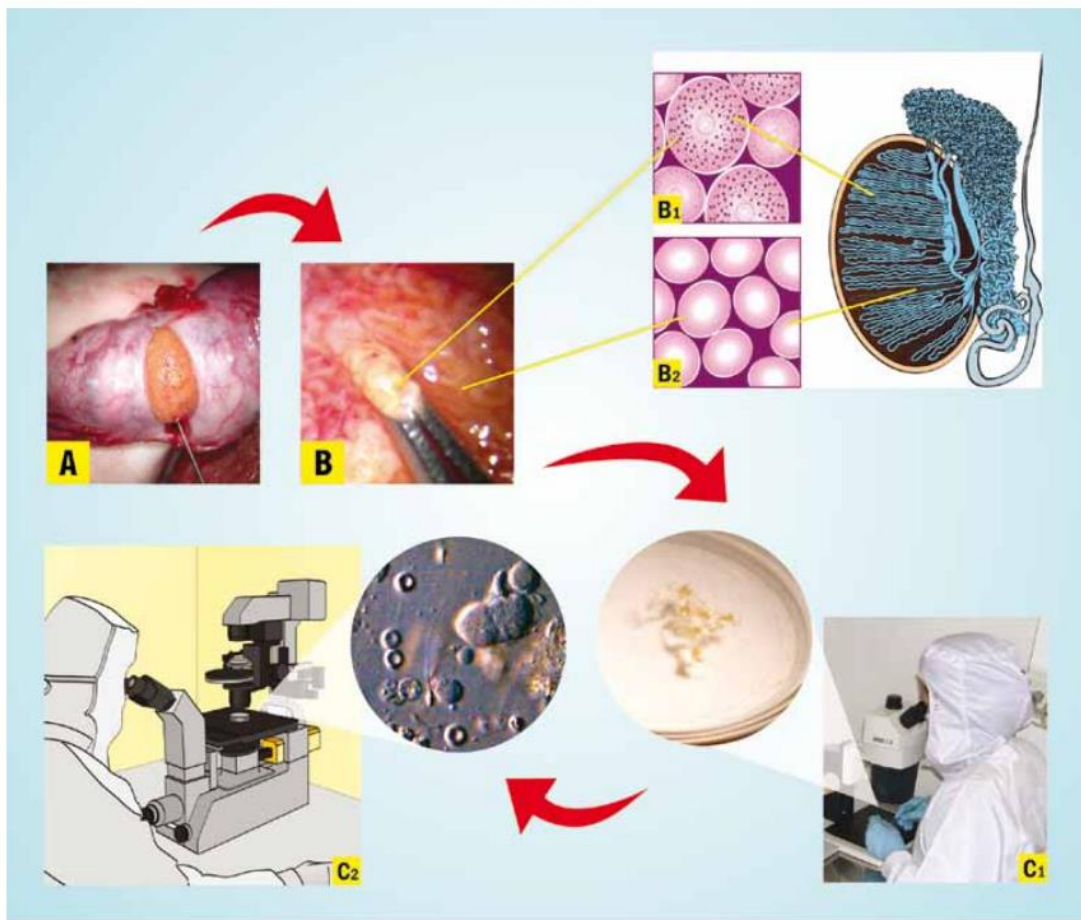


Figura 13. Extração microcirúrgica de espermatozoides (micro-TESE). É realizada uma incisão única e grande numa área avascular da albugínea para expor o parênquima testicular (A). De seguida, é realizada uma microdissecação (B) do túbulo seminífero para identificar e remover grandes túbulos com potencial para ter células germinativas e espermatogênese ativa (B1). Enquanto túbulos pequenos têm menor probabilidade (B2). As amostras testiculares extraídas são transportadas para o laboratório onde são processadas (C1) e posteriormente analisadas (C2). Adaptado de Esteves et al. 2011 <sup>73</sup>.

## PESA

Esta técnica consiste na aspiração de espermatozoides do(s) epidídimo(s) com a ajuda de uma agulha fina que é injetada diretamente no escroto e está conjugada com uma seringa contendo meio de cultura para espermatozoides aquecido (Fig. 14) <sup>74</sup>. Esta aspiração é repetida noutros locais do epidídimo até ser encontrado um número adequado de espermatozoides pelo laboratório <sup>74</sup>. É uma técnica simples, rápida e não exige uma cirurgia aberta, no entanto, não se sabe ao certo o local no epidídimo que contém espermatozoides podendo falhar o seu encontro e para além disso, pode ocorrer mistura de células sanguíneas ao injetar um vaso sanguíneo <sup>71</sup>.

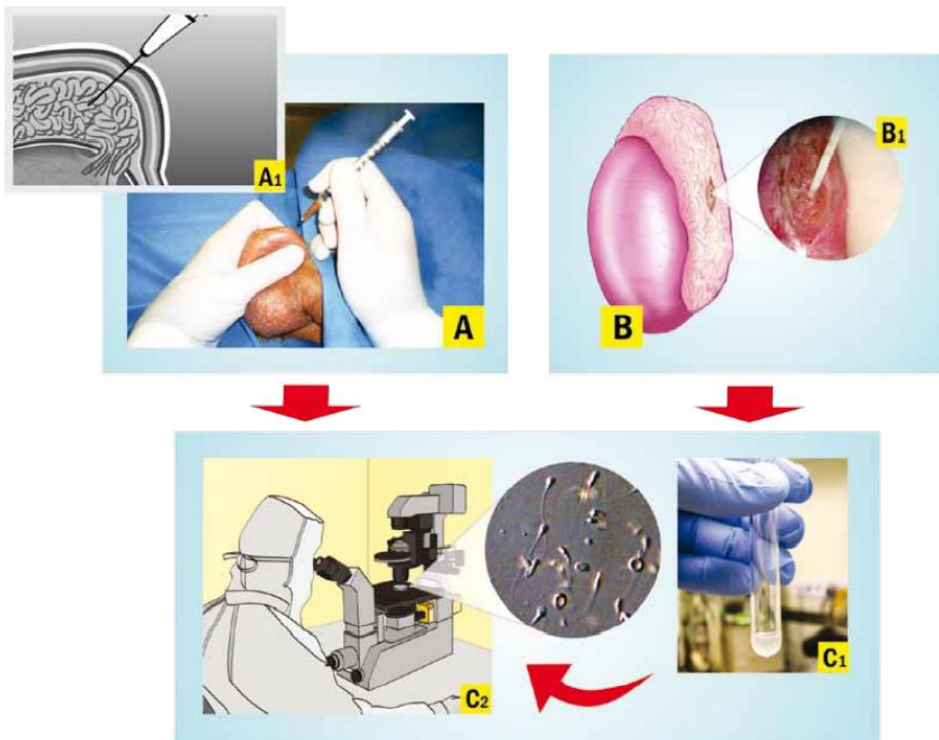


Figura 14. Técnicas de extração de espermatozoides dos epidídimos. A) Aspiração de espermatozoides dos epidídimos (PESA). Os epidídimos são estabilizados com a ajuda das mãos, sendo inserida, através do escroto, uma agulha associada a uma seringa (A1), resultando na aspiração de fluido. B) Aspiração microcirúrgica de espermatozoides dos epidídimos (MESA). Neste procedimento o epidídimo é exposto e um túbulo epididimário é dissecado e aberto. O fluido proveniente do túbulo é aspirado (B1). No final o fluido é mergulhado em meio de cultura adequado (C1), transportado para o laboratório, onde é analisado microscopicamente e confirmada a presença de espermatozoides (C2). Adaptado de Esteves et al. 2011 <sup>73</sup>.

## MESA

Assim como a PESA, a MESA, corresponde à extração de espermatozoides do epidídimo, contudo, a diferença entre estas duas técnicas é que na MESA ocorre uma cirurgia aberta através de um microscópio (Fig. 14) <sup>71</sup>. Para esta técnica é realizada uma excisão no escroto e o epidídimo é aberto, deste modo, o fluido espermático que é libertado é aspirado para uma seringa contendo meio de cultura para espermatozoides <sup>71,74</sup>. Caso não haja espermatozoides suficientes num local identificados no laboratório, é feita nova abertura no mesmo epidídimo ou no outro até serem encontrados suficiente <sup>74</sup>. Esta técnica permite uma extração com ausência de células sanguíneas e extração de um grande número de espermatozoides móveis, contudo, é necessário pessoal especializado, um microscópio e tempo para se realizar a cirurgia aberta <sup>71</sup>.

## Processamento de amostras de epidídimo e testículo

Após o procedimento de extração de espermatozoides, as amostras são recolhidas para um tubo contendo meio de cultura para espermatozoides (evitando aglutinação) a uma

temperatura de 37°C e de seguida o conjunto é encaminhado para o laboratório. No laboratório ocorre a verificação, o mais rápido possível, do número suficiente de espermatozoides móveis para o desencadear da ICSI ou criopreservação <sup>74</sup>. O processamento de amostras de epidídimo e testículo será descrito mais adiante na secção de Preparação de espermatozoide (Secção 2.1.4).

### 2.1.3. Criopreservação de espermatozoides

Os espermatozoides de ser humano foram pela primeira vez criopreservados por Lázaro Spallanzani, contudo, o seu método de congelação não trazia grande rendimento<sup>76,77</sup>. Mais tarde, com a descoberta das propriedades crioprotetoras do glicerol<sup>7</sup>, Bunge e Sherman em 1953 conseguiram obter com sucesso gravidezes e nascimentos através de espermatozoides criopreservados com glicerol em azoto líquido<sup>78</sup>.

Apesar dos espermatozoides apresentarem uma elevada resistência ao congelamento devido à sua baixa quantidade de água intracelular e devido à sua composição de lípidos na membrana plasmática, estes também são prejudicados nas proteínas que estão envolvidas na permeabilidade da membrana, motilidade, metabolismo, apoptose, capacitação e fertilização<sup>64</sup>. Contudo, nos dias de hoje existem diferentes técnicas de criopreservação que foram melhorando conseguindo-se ultrapassar os problemas de criopreservação e manter a motilidade e viabilidade dos espermatozoides durante mais tempo<sup>77</sup>.

Uma das grandes vantagens da criopreservação de espermatozoides é a preservação de fertilidade. Nestas situações os pacientes irão ultrapassar procedimentos que podem comprometer a sua fertilidade como tratamentos citotóxicos (quimioterapia e radioterapia), tratamentos cirúrgicos e ocupação em cargos de risco para a fertilidade<sup>64,76</sup>. Para além disso, a criopreservação de espermatozoides também pode ser utilizada para preservar espermatozoides de dadores e em casos de paciente azoospermicos que passaram por procedimentos de recolha de espermatozoides dos testículos ou epidídimos<sup>79</sup>. Também se pode recorrer à criopreservação dos espermatozoides quando existe dificuldade do paciente para realizar a colheita e para evitar transmissão de infeções<sup>64</sup>.

#### Protocolos para a criopreservação de espermatozoides

Existem riscos na criopreservação e armazenamento dos espermatozoides, tais como os encontrados na segurança das amostras assim como do pessoal, manutenção do local e dos níveis de nitrogénio e ainda riscos de contaminação cruzada<sup>64</sup>. Para isso, são necessárias boas práticas de laboratório de andrologia, algumas delas são: identificação adequada das amostras e armazenamento das mesmas numa sala e tanque seguros, utilização de equipamento de segurança adequado (como luvas e bata) e controlo dos níveis de nitrogénio<sup>64</sup>.

No processo da criopreservação ocorre o risco de formação de cristais de gelo que consequentemente provocam stress oxidativo e osmótico nos espermatozoides <sup>76,80</sup>. Sendo assim, o sucesso da criopreservação de células depende drasticamente da formação de cristais de gelo intracelulares, os quais são evitados com o uso de crioprotetores. Nos dias de hoje, existem dois tipos de crioprotetores: os permeáveis (sulfóxido de dimetilo e glicerol) e os impermeáveis/não permeáveis (albuminas, dextrano e citrato de gema de ovo) <sup>64</sup>. Os crioprotetores permeáveis são aqueles que têm a capacidade de ultrapassar a membrana plasmática e substituir a água intracelular, enquanto os impermeáveis/não permeáveis não conseguem entrar nas células, mas criam um gradiente osmótico desidratando as células <sup>80</sup>.

A WHO (2021) sugere o uso do crioprotetor GEYC (conjunto: glicerol - gema de ovo - citrato), que deve ser adicionado aos poucos e misturado suavemente ao sémen (adicionando metade do volume de crioprotetor em relação ao volume de sémen), após isto, a mistura deve ser incubada por 5 minutos entre 30-35°C. Seguidamente, é realizada a aspiração da mistura de sémen com o crioprotetor para palhetas de criopreservação de espermatozoides, que no final devem ser seladas <sup>64</sup>.

Para além disso, as palhetas depois de preenchidas seguirão um protocolo de congelação: congelação lenta programada, que consiste na diminuição lenta da temperatura; congelação a vapor, onde inicialmente os espermatozoides permanecem em azoto líquido a vapor durante 1-2 horas e posteriormente colocados em azoto líquido; e a vitrificação, quando os espermatozoides são imediatamente submersos em azoto líquido <sup>64,80</sup>.

Nos casos de congelação de espermatozoides provenientes da recolha nos testículos ou epidídimos, o protocolo é o mesmo que para o ejaculado, contudo, nos casos de baixa quantidade de espermatozoides recolhida existem alterações recomendadas <sup>64,79</sup>. Para estes casos a WHO (2021) tem como sugestão criopreservar as amostras de espermatozoides obtidas usando um crioprotetor de glicerol, glucose e solução de tiroide (TGG). É misturado e adicionado cuidadosamente o mesmo volume de crioprotetor ao volume da preparação de espermatozoides, de seguida são executados os mesmos passos que para a congelação do ejaculado <sup>64</sup>.

Por vezes é necessário o transporte das amostras criopreservadas e para isso é utilizado um contentor, disponível comercialmente, arrefecido com nitrogénio líquido e que poderá permanecer com as amostras durante dias mantendo a temperatura <sup>64</sup>.

Na descongelação das amostras as palhetas removidas do azoto líquido são imediatamente colocadas a 37°C, e após descongelação a mistura de sémen e crioprotetor é descarregada para um tudo de centrifuga. Antes de centrifugar a mistura (10 minutos a 500g) é adicionado meio de cultura para espermatozoides. É removido o sobrenadante da amostra resultante e o pellet diluído num volume adequado de meio de cultura para espermatozoides <sup>64</sup>.

### 2.1.4. Preparação de espermatozoides

Após ejaculação, os espermatozoides presentes no sémen têm de passar por diversos passos de maturação para adquirir a capacidade de fertilização, apesar disso, o plasma seminal, depois de 1 hora, pode ter influência negativa sobre os espermatozoides através dos danos provocados por outras células, pelo aumento de osmolaridade e pela inibição da sua maturação<sup>64,80</sup>. Adicionalmente, em condições *in vivo*, ocorre uma seleção dos espermatozoides no trato genital feminino, ou seja, os espermatozoides móveis são separados dos imóveis e do plasma seminal<sup>81</sup>.

A partir das informações descritas acima é evidente a necessidade de separar os espermatozoides do plasma seminal, em condições *in vitro*, para que os espermatozoides adquiram a capacidade de fertilizar os oócitos<sup>64,80,82</sup>. Com isto, surgiram as técnicas de preparação de espermatozoides, que têm como objetivo recuperar uma maior percentagem de espermatozoides de morfologia normal, móveis e com danos reduzidos no ADN, aumentando as probabilidades de fertilização e consequentemente aumentando a eficácia das técnicas de PMA<sup>64,82</sup>.

#### **Diferentes técnicas de preparação de espermatozoides:**

Em aplicações terapêuticas nas técnicas de preparação de espermatozoides é crucial o uso de técnicas e materiais estéreis. Em todas as técnicas de preparação o meio de cultura para espermatozoides sugerido pela WHO (2021) é constituído por uma solução salina, proteínas e um tampão para as condições ambientais<sup>64</sup>.

- Lavagem simples

Esta técnica consiste na diluição do esperma em meio de cultura e posteriormente são realizadas centrifugações com o objetivo de separar os espermatozoides do líquido seminal (Fig. 12), no entanto, juntamente com os espermatozoides são separados outros tipos de células como os leucócitos<sup>64,82</sup>. Sendo assim, é uma técnica que resulta em bom rendimento de concentração em situações de normozoospermia<sup>64,80,82</sup>. As centrifugações são aconselhadas entre os 300-500g e após cada centrifugação é descartado o sobrenadante e o pellet é diluído em novo meio de cultura. Contudo, quando se opta por um menor número de lavagens é aconselhado um aumento do meio de cultura adicionado nas lavagens assim como um aumento da força de centrifugação e tempo da mesma<sup>64</sup>.

Apesar deste método ser simples e barato, a centrifugação repetida das amostras resulta numa suspensão de espermatozoides com motilidade reduzida e pode provocar

a produção de espécies reativas de oxigénio, o que prejudica a competência dos espermatozoides para a fertilização <sup>82</sup>.

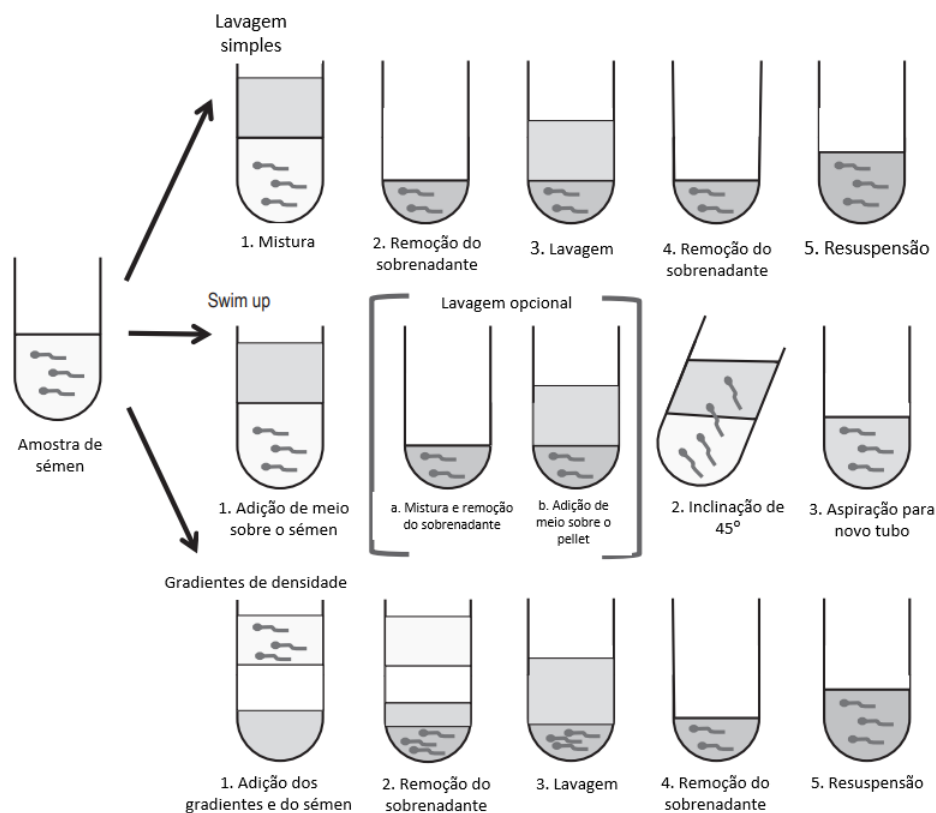


Figura 15. Representação esquemática das técnicas de preparação de espermatozoides. São apresentadas 3 técnicas: uma lavagem simples, o *swim up* e os gradientes de densidade. Adaptado de Montag and Morbeck, 2017 <sup>80</sup>.

- **Swim-up**

O *swim-up* é uma técnica baseada na migração dos espermatozoides e é a mais utilizada para pacientes com normozoospermia e em casos de infertilidade feminina, contudo, não é ideal para sêmen de má qualidade <sup>81,82</sup>. Em comparação com a lavagem simples este método tem um rendimento de concentração menor, no entanto, esse rendimento deve-se à seleção de espermatozoides móveis e conseqüentemente tem como vantagem uma maior percentagem desses mesmos espermatozoides e de melhor morfologia e ainda ausência de espermatozoides imóveis, outras células e fragmentos celulares <sup>64,81,82</sup>.

O *swim-up* consiste na deposição de meio de cultura sobre a amostra de sêmen liquefeito num tubo de centrifuga, ou o contrário (Fig. 12). Apesar disso, é considerada a realização de uma lavagem do sêmen antes do *swim-up*, no entanto, estudos

anteriores demonstraram que esse passo pode resultar em danos de peroxidação nas membranas dos espermatozoides, levando à sugestão de um *swim-up* direto (Fig. 12)<sup>64,80</sup>. Adicionalmente, durante o *swim-up* o rendimento de espermatozoides móveis que irão migrar para o meio de cultura pode ser melhorado aumentando a área de contacto do sémen com o meio de cultura ao inclinar o tubo de centrifuga 45° durante 1 hora a 37°C<sup>64,82</sup>. Após o *swim-up* é recolhido meio de cultura da camada superior, onde se encontra uma grande quantidade de espermatozoides móveis (Fig. 12)<sup>64</sup>.

- Gradientes de densidade

Os gradientes de densidade são normalmente usados em situações de baixa concentração, motilidade e morfologia de espermatozoides, para se seleccionar aqueles de boa qualidade e reduzir a presença de fragmentos celulares e outras células presentes no sémen<sup>64,80</sup>.

Existem dois tipos de gradientes de densidade, os contínuos, que consistem na diminuição gradual da densidade, e os descontínuos, onde se verifica uma separação nítida entre os 2-3 gradientes usados<sup>81,82</sup>. Estes gradientes de densidade são compostos de sílica coloidal revestida com silano que favorece a separação baseando-se na densidade das células, e os gradientes descontínuos são os mais usados e sugeridos pela WHO (2021)<sup>64</sup>.

Esta técnica requer o uso de um tubo de centrifuga na qual são carregados os gradientes na ordem de maior densidade para o de menor densidade e de seguida é depositado o ejaculado sobre o gradiente de menor densidade (Fig. 12). Esta ordem no tubo de centrifuga vai permitir a separação dos espermatozoides após uma centrifugação (300-400g) de 15-30 minutos<sup>80-83</sup>. Por último, poderá ser necessário um passo adicional de lavagem do pellet para remoção do meio de gradientes<sup>83</sup>.

- Amostras infetadas com vírus da imunodeficiência humana (VIH)

O VIH pode ser encontrado no fluido seminal e em células presentes no sémen, contudo não tem como vetor os espermatozoides<sup>64,84</sup>. Deste modo, os espermatozoides de um paciente infetado com VIH podem ser usados para técnicas de PMA sem que a sua descendência seja infetada, no entanto, é necessário o uso de boas técnicas de preparação de espermatozoides para se poder separar de forma eficaz os espermatozoides do resto dos componentes do sémen. O uso de gradientes de densidade descontínuos seguido de *swim-up* pode ser um método eficaz para a descontaminação do VIH no sémen, contudo, após estes passos é necessário uma

análise através da reação em cadeia da polimerase via transcrição reversa (RT-PCR) para garantir que a amostra a ser usada não está contaminada <sup>64</sup>.

- Amostras de espermatozoides recolhidos de testículos ou epidídimos

Existem duas formas de processamento das amostras provenientes do epidídimo: centrifugação com gradientes de densidade ou uma lavagem simples. A decisão entre as duas, ou a utilização de ambas, depende da concentração de espermatozoides esperada e da presença de eritrócitos, detritos celulares e espermatozoides imóveis. Deste modo, uma lavagem simples com meio de cultura para espermatozoides é aconselhada para casos de baixas concentrações de espermatozoides <sup>79</sup>.

Por outro lado, os fragmentos de testículo recolhidos após uma biópsia testicular são colocados numa placa de petri com meio de cultura para espermatozoides para o seu processamento. Cada laboratório opta pelos seus métodos de processamento padrão, contudo, estes métodos consistem em maceração do tecido testicular ou digestão enzimática para provocar a libertação dos espermatozoides, de seguida, a suspensão obtida sofre uma centrifugação com meio de cultura para espermatozoides ou com gradientes de densidade ou lavagens com tampões adequados (Fig. 12). A diferença entre processamento mecânico e digestão enzimática consiste no tempo do processo, onde o processamento mecânico é mais rápido <sup>79</sup>.

Nas amostras provenientes de testículo e epidídimo a diferença existente é a contaminação da amostra com células não germinativas e glóbulos vermelhos, verificando-se maior contaminação nas amostras de testículo recolhidas em biópsia <sup>64</sup>.

#### **Decisão de escolha do método:**

Na consideração do método de preparação de espermatozoides a ser utilizado em cada técnica de PMA é essencial a escolha daquele que tenha a maior quantidade de vantagens: ser rápido e eficaz; isolar o maior número de espermatozoides possível; minimizar os danos possíveis nos espermatozoides isolados (tanto no ADN como morfológicos); separar os espermatozoides móveis dos imóveis, de outras células no esperma e fragmentos celulares; reduzir as substâncias tóxicas ou bioativas; e permitir o processamento de grandes volumes de sémen <sup>64,81</sup>. Para além disso, dependendo da origem da amostra de sémen, da qualidade da amostra e do propósito final da mesma existe uma variedade de métodos de preparação de espermatozoides, sendo que algumas delas foram descritas anteriormente <sup>64,82</sup>.

A lavagem simples do esperma é apenas aconselhada para casos de normozoospermia e totalmente desaconselhado em situações de contaminação. Adicionalmente em situações de normozoospermia também é sugerido o uso de *swim-up*, também podendo ser usado em oligoastenoteratozoospermia moderada. Quando a oligoastenoteratozoospermia deixa de ser moderada e piora até severa o método de escolha preferencial é o dos gradientes de densidade onde também se pode obter uma melhor descontaminação <sup>64,80</sup>. Apesar disso, existem estudos com a combinação de métodos de preparação, por exemplo, a combinação de gradientes de densidade seguido de *swim-up* que pode selecionar os espermatozoides com melhor morfologia e com ausência de fragmentação de ADN <sup>85</sup>.

Concluindo, cada laboratório deve adaptar cada método ou combinação de métodos da melhor forma para obter os melhores resultados de espermatozoides a ser usado para as diferentes técnicas e PMA <sup>64</sup>.

Após isolamento dos espermatozoides

Os espermatozoides obtidos após os métodos de preparação podem encontrar-se em grande parte imóveis, principalmente aqueles que são provenientes da recolha dos testículos ou dos epidídimos <sup>82</sup>. Deste modo, existem compostos como a pentoxifilina que são usados para estimular o movimento flagelar dos espermatozoides tanto em amostras frescas como criopreservadas <sup>81,82</sup>. Contudo, a estimulação excessiva com pentoxifilina pode levar à reação acrossómica precoce, culminando num uso limitado nos ciclos de PMA, havendo programas que apenas consideram o uso de pentoxifilina em amostras recolhidas dos testículos e epidídimos <sup>82</sup>.

### 2.1.5. IIU

A inseminação intra-uterina (IIU) é um tratamento de infertilidade, que consiste na inseminação de uma amostra de espermatozoides após processamento na cavidade uterina superior em sincronização com o tempo de ovulação<sup>86-89</sup>. Esta técnica de PMA é não invasiva e está na primeira linha de tratamento de infertilidade para pacientes com, por exemplo, uma das seguintes causas: fator cervical; fator masculino de leve a moderado; endometriose leve; fator imunológico; impossibilidade de ter relações sexuais via vaginal; mulher solteira; inseminação via doador de esperma; e infertilidade inexplicada, a mais comum a ter como indicação a IIU<sup>86,89</sup>. Contudo, existem condições necessárias para que se consiga realizar IIU como ocorrência de ovulação, presença de pelo menos uma trompa de Falópio e uma concentração de espermatozoides móveis apropriada<sup>86</sup>.

Existe uma variedade de fatores que podem afetar o sucesso da IIU, incluindo: a idade da mulher, quanto mais idade menor será a probabilidade de sucesso; duração da infertilidade; o protocolo de estimulação; o número de folículos pré-ovulatórios; o número total e normal de espermatozoides depois de processamento; o momento e realização da IIU; a frequência de IIUs; e a espessura do endométrio no dia da inseminação<sup>87,90</sup>. Apesar disso, esta grande diversidade de fatores é responsável pelas taxas de sucesso inferiores às encontradas nas outras técnicas de PMA<sup>90</sup>

AS IIUs podem ter uma abordagem com ciclo natural ou um ciclo de estimulação, onde neste último a administração de medicação (como citrato de clomifeno, letrozol ou gonadotrofinas) tem como objetivo o desenvolvimento de múltiplos folículos aumentando as probabilidades de fertilização<sup>86</sup>. No entanto, a abordagem com ciclo natural apresenta taxas de sucesso muito baixas em relação aos ciclos de estimulação, uma vez que existe maior dificuldade na previsão da ovulação, mas pode ser ideal para casais que rejeitam toma de medicação ou evitar uma gravidez múltipla<sup>86</sup>. Adicionalmente, também é bastante discutida a consideração de uma IIU dupla por ciclo, sendo que esta tem como objetivo melhorar a sincronização entre a ovulação e a inseminação aumentando a probabilidade de encontro dos gâmetas e consequentemente melhorar as taxas de sucesso/gravidez<sup>88,90</sup>. Contudo, normalmente é executada uma única IIU, uma vez que uma segunda IIU torna o procedimento mais caro, mais moroso e pode ocorrer perda na qualidade do sêmen porque a segunda colheita é necessária apenas algumas horas depois da primeira<sup>88</sup>.

### **Dia da inseminação**

No dia da inseminação é realizada a colheita de sémen para um frasco de colheita via masturbação, na instituição a ser realizada a IIU ou em casa com prazo de entrega no laboratório até 1 hora e permanecendo sempre à temperatura corporal. Após a receção da colheita pelo laboratório a mesma é deixada a liquefazer, sendo de seguida analisada a concentração e motilidade e também processada através de um protocolo de preparação de espermatozoides mais adequado e selecionado pelo laboratório <sup>86</sup>. No final da preparação dos espermatozoides, a amostra é carregada num cateter que está inserido no canal cervical e cavidade uterina <sup>86</sup>.

## 2.2. Laboratório de Embriologia

### 2.2.1. Manipulação de oócitos

#### i) Punções foliculares

Inicialmente, as punções foliculares eram realizadas através de laparoscopia, no entanto, nos dias de hoje são realizadas por uma técnica transvaginal guiada por ultrassonografia<sup>82,91</sup>. Entre 34 a 38 horas antes de se realizar a punção é necessário a administração de um protocolo de estimulação ovárica<sup>91,92</sup>.

No momento da punção, depois da confirmação dos dados da paciente, os folículos visualizados por ultrassonografia são aspirados para um tubo teste com meio tamponado pré-aquecido (37°C) para a colheita dos oócitos. Este meio tamponado contém agentes químicos orgânicos, meio salino com tampão de fosfato ou meio contendo HEPES, com efeito de tampão para manter o pH fisiológico<sup>80,86,91</sup>. Após colheita das amostras estas são entregues de imediato ao laboratório para posterior análise por embriologistas.

#### **Prática laboratorial**

Aspetos importantes a serem tomados para não causar danos para os oócitos são a baixa exposição luminosa das amostras durante todo o procedimento e um controlo da temperatura, mantendo as amostras à temperatura corporal (37°C)<sup>80,86,91</sup>.

Ao serem recebidas no laboratório, as amostras são transferidas do tubo teste para uma placa de Petri de 100 mm e verificadas pela presença de complexos *cumulus*-oócito, numa lupa binocular (Fig. 3)<sup>80,86</sup>. Os complexos *cumulus*-oócito encontrados são pipetados para uma nova placa de 60 mm, preparadas no dia anterior e nesse mesmo dia incubadas a 37°C e 6% de CO<sub>2</sub>, contendo meio de tampão coberto por óleo mineral (exemplo: óleo de parafina)<sup>80,86</sup>. De seguida, Montag e Morbeck sugerem a remoção do excesso de sangue e de células do *cumulus* com a ajuda de agulhas e com movimentos suaves, após este passo os complexos são lavados ao serem transferidos para uma nova placa contendo meio de cultura coberto por óleo mineral<sup>80</sup>. Estes complexos, depois da lavagem, são transferidos para placas de cultura com gotas de meio de cultura (meio de fluido tubário humano com tampão HEPES ou outro meio para oócitos com bicarbonato) cobertas por óleo mineral, também preparadas no dia anterior e nesse mesmo dia incubadas a 37°C e a 6% de CO<sub>2</sub><sup>80,86</sup>. Por fim, as placas de cultura, com um

máximo aconselhado de 10 oócitos por placa, são incubadas a 37°C e entre 5-6% de CO<sub>2</sub> até ao momento de inseminação ou desnudação e devidamente identificadas <sup>80,86</sup>.

Todo este procedimento de manipulação das amostras deve ser realizado em condições assépticas, realizando-se numa câmara de fluxo laminar, com o uso de luvas e mantendo todas as práticas para garantir tanto a proteção do pessoal do laboratório como dos oócitos <sup>80</sup>. Adicionalmente, a câmara de fluxo laminar deverá ser limpa com um detergente seguro para oócitos antes e depois de ser usada para a colheita de oócitos <sup>80</sup>.

## ii) Desnudação

Com a evolução e surgimento de novas técnicas de PMA instalou-se uma necessidade de classificação, ou seja, avaliação da competência e maturidade do oócito para ser fecundado. Nem todos os oócitos recolhidos das punções foliculares têm as

características essenciais para se obter uma fecundação, no entanto, essas características apenas são visíveis na ausência das células do *cumulus* que envolvem o oócito (Fig. 3) <sup>93</sup>. A ICSI, foi uma técnica que exigiu a remoção das células do *cumulus*, à qual se chama desnudação, uma vez que é essencial a visualização do oócito para ser avaliado, e, se reunir condições, ser selecionado, mas também permitir a visualização e realização da técnica <sup>83,93,94</sup>.

O processo de desnudação combina dois mecanismos importantes, um enzimático e outro mecânico. No mecanismo enzimático o oócito é exposto a uma enzima, a hialuronidase, que é responsável pela digestão do ácido hialurônico que estabelece a ligação entre as células do *cumulus*. Durante essa exposição, os complexos *cumulus*-oócito são repetidamente aspirados com ajuda de pipetas de desnudação, dando-se assim a remoção das células do *cumulus* envolvendo o oócito <sup>83,93</sup>, realizando desta forma o mecanismo mecânico. Durante estes dois mecanismos é essencial ter em atenção ao tempo de exposição e concentração da hialuronidase, sendo que, devem ser mantidos no seu mínimo para evitar danos no oócito. Para além disso, as aspirações do complexo *cumulus*-oócito devem ser realizadas de forma cuidadosa evitando aspirações vigorosas <sup>83,93,95</sup>.

### **Protocolo laboratorial**

Na prática, para a desnudação é necessário a preparação de placas de desnudação. Estas placas são compostas por gotas de meio tamponado HEPES e com pelo menos uma gota de uma solução de hialuronidase cobertas com óleo mineral. Depois de preparadas estas placas devem ser incubadas/equilibradas a 37°C <sup>83</sup>. No momento da desnudação o complexo *cumulus*-oócito é transferido para a gota contendo hialuronidase, presente nas placas equilibradas, e posteriormente aspirados repetidamente durante alguns segundos até se proceder à remoção das células do *cumulus*. Por fim, os oócitos são lavados nas outras gotas de meio tamponado HEPES para proceder à remoção de restos de enzima <sup>83</sup>.

### iii) Criopreservação

A criopreservação de oócitos teve o seu progresso de forma lenta e apenas 30 anos após o primeiro nascimento, com um oócito congelado, tornou-se aceitável, ou seja, as técnicas foram consideradas eficazes e seguras pela Sociedade Americana para a Medicina Reprodutiva (ASRM) e pela Sociedade Europeia da Reprodução Humana e Embriologia (ESHRE), deixando de ser apenas técnicas experimentais e também serem incluídas nos ciclos de PMA <sup>82,96</sup>. Nos dias de hoje a criopreservação de oócitos pode ser solução para congelar oócitos provenientes de doação, preservação de fertilidade (em situações de mulheres que irão passar por tratamentos de cancro, homens transgénero e consideração de uma gravidez mais tardia), quando existe limitações éticas/legais para a criopreservação de embriões, falha na colheita de espermatozoides no dia da FIV, etc. <sup>80,83,86,96</sup>.

Alguns dos problemas relacionados com a criopreservação estão envolvidos com a formação intracelular de cristais de gelo, danos na membrana plasmática, despolimerização dos microtúbulos e o endurecimento da zona pelúcida <sup>96</sup>. Desta forma, as técnicas de criopreservação de oócitos baseiam-se na utilização de crioprotetores, que reduzem a formação de cristais de gelo durante a redução da temperatura para temperaturas abaixo de 0°C. Existem duas técnicas possíveis: congelação lenta ou controlada, que consiste na exposição inicial dos oócitos a uma baixa concentração de crioprotetores permeáveis (como o glicerol, DMSO e PrOH) e não permeáveis (como a glucose, sacarose, frutose e trealose), seguida de uma redução lenta da temperatura; e a vitrificação, que consiste na exposição inicial dos oócitos a uma concentração elevada de crioprotetores permeáveis e em seguida a uma redução ultrarrápida da temperatura <sup>80,83,96</sup>.

Inicialmente, a congelação lenta era a técnica mais utilizada na criopreservação de oócitos, no entanto, apesar de usar uma baixa concentração de crioprotetores levando a uma baixa toxicidade, a baixa concentração ainda permite a formação de cristais de gelo <sup>83</sup>. Com isto, foram surgindo métodos de vitrificação que têm como principal objetivo o impedimento da formação dos cristais de gelo tornando-se uma técnica mais eficaz e consequentemente foi substituindo as técnicas de congelação lenta <sup>80,83</sup>.

#### **Vitrificação de oócitos**

Os protocolos de vitrificação de oócitos são variados e diferem no tipo de crioprotetor, no equipamento usado, mas também na forma de exposição ao azoto líquido (Montag e Morbeck, 2017). Sendo assim, em termos de exposição ao azoto líquido, os protocolos

de vitrificação de oócitos podem apresentar um sistema aberto ou fechado: no sistema aberto as amostras ficam em contacto direto com o azoto líquido, enquanto num sistema fechado as amostras nunca entram em contacto físico com o azoto líquido <sup>80,96</sup>. Na decisão sobre qual o melhor sistema existe um debate, do qual surge a interpretação do sistema aberto como uma possível contaminação das amostras através do azoto líquido, e no sistema fechado a eficácia da congelação ser inferior <sup>80,96</sup>.

Na prática, os oócitos são desnudados entre 1-6 horas após a punção folicular e de seguida podem ser vitrificados sem células do *cumulus*. Os meios de vitrificação antes de serem usados devem encontrar-se à temperatura ambiente ou serem aquecidos. Geralmente os meios de vitrificação e de desvitrificação, têm como solução base tampão HEPES, um substituto sintético de soro, e gentamicina (para controlo do pH e prolongar a validade do meio) <sup>80,83</sup>. Por fim, as palhetas carregadas com o(s) oócito(s) são armazenadas em azoto líquido a -180°C.

Em ambos os processos de vitrificação e de desvitrificação é essencial a verificação e confirmação dos dados da paciente, para a localização dos seus oócitos assim como da identificação presente nas devidas palhetas. Para além do mais, todos os paços devem ser realizados de forma cuidadosa perante a manipulação dos oócitos como do azoto líquido, e nunca serem ultrapassados os valores de tempo limite, estabelecidos nos protocolos, para minimizar os efeitos de toxicidade dos crioprotetores <sup>83</sup>.

#### iv) FIV convencional

Em PMA, a FIV é considerada como a fusão dos gâmetas feminino e masculino fora do corpo humano, ou seja, em condições de laboratório, e existem duas técnicas de FIV a FIV convencional e a ICSI <sup>82</sup>. A partir de várias décadas de estudos na medicina da reprodução foi possível o primeiro nascimento proveniente de FIV em 1978, através da técnica de FIV convencional <sup>97</sup>. Daí em diante, esta técnica tornou-se cada vez mais frequente num laboratório de FIV e permitiu um melhor conhecimento sobre a fisiologia reprodutiva do ser humano <sup>82,97</sup>. Apesar disso, esta técnica ofereceu, a mulheres com ausência ou dano em ambas a trompas de Falópio, a possibilidade de conceberem descendência e com o passar do tempo tornou-se a técnica de escolha para mais causas de infertilidade que não permitiam o encontro entre os gâmetas <sup>82,86,97</sup>.

Ao contrário do que acontece in vivo, na FIV convencional os oócitos colhidos de um ciclo natural ou de estimulação, são colocados numa placa de Petri e posteriormente é realizada a inseminação dos espermatozoides processados. Apesar das diferenças esta técnica tem como objetivo mimetizar aquilo que acontece in vivo <sup>82</sup>. Os gâmetas são co-incubados durante algumas horas, normalmente *overnight*, contudo, por vezes é ignorado o efeito negativo da presença das espécies reativas de oxigénio e outros produtos do metabolismo dos espermatozoides <sup>80</sup>. Sendo assim, existe a consideração da redução do tempo de co-incubação para atenuar esses efeitos negativos melhorando os resultados da FIV. Para isso, é aconselhada a transferência do complexo *cumulus*-oócito para uma nova gota de meio após 1-4 horas de co incubação <sup>80</sup>.

Um ciclo de FIV convencional tem o seu início dentro do laboratório no dia anterior à inseminação, com a preparação das placas de cultura para a co incubação consoante o número de folículos no momento da administração de hCG. Estas placas de cultura são compostas por meio de inseminação (meio de fecundação e 5 % de albumina sérica humana) coberto por óleo mineral. Todas as placas de cultura preparadas devem ser incubadas *overnight* a 37°C e 5% O<sub>2</sub> <sup>80</sup>. No dia da inseminação é realizada em primeiro lugar a punção folicular para a colheita de oócitos, e estes são cultivados nas placas para a co incubação. Após 4 horas da colheita dos oócitos é executada a inseminação com espermatozoides obtidos através de uma técnica de processamento de espermatozoides, onde é necessária uma concentração de espermatozoides progressivos entre 1-5x10<sup>5</sup>/ml para que se consiga obter fecundação. Por fim, as placas de co incubação são incubadas *overnight* ou entre 1-4 horas a 37°C, e só depois de 16-18 horas é analisada a fecundação <sup>95</sup>. Caso o tempo de co incubação seja entre 1-4 horas é necessário a preparação de placas de cultura para oócitos pós inseminação no

dia anterior à FIV, com gotas de meio pós fecundação (meio para o crescimento embrionário e 10% de suplemento substituto sérico) cobertas de óleo mineral. Por outro lado, se a co incubação for *overnight*, no dia de início da mesma são preparadas placas para a cultura de embriões, com o objetivo de serem usadas após análise de fecundação.

### **Avaliação da Fecundação**

No tempo de co incubação vários espermatozoides penetram a massa de células do *cumulus* e devido à presença de recetores na superfície da zona pelúcida, como a glicoproteína ZP3, é induzida a reação acrossómica <sup>82</sup>. Esta reação permite a penetração do espermatozoide na zona pelúcida e a sua fusão com o ooplasma, estimulando assim a reação cortical, que impede a entrada de outros espermatozoides, e a ativação do oócito <sup>82</sup>. Na ativação o oócito termina o ciclo de meiose II libertando um segundo glóbulo polar (GP) e estabelece-se os pronúcleos masculino e feminino <sup>82</sup>. Deste modo, passadas 16-20 horas é analisada a fecundação através da visualização dos GPs e pronúcleos <sup>82,95</sup>. No entanto, é necessária a remoção das células da coroa e do *cumulus* antes da visualização uma vez que elas impossibilitam a mesma <sup>80,82,95</sup>. Após desnudação, os oócitos são transferidos para novas gotas de meio de cultura e é realizada a visualização dos mesmos em alta ampliação num microscópio invertido. Normalmente, são considerados como fecundados os oócitos com 2 GPs no espaço perivitelino e 2 pronúcleos (Fig. 7) <sup>80,82,95</sup>. Contudo, na FIV convencional a presença de apenas um pronúcleo e 2 GPs é aceitável para alguns laboratórios, sendo que a ausência de um pronúcleo pode dever-se a um atraso nos eventos de fecundação <sup>80</sup>. Em contraste, oócitos sem pronúcleos ou com 3 ou mais são considerados como fecundação anormal não sendo recomendados <sup>80,95</sup>. O objetivo da avaliação da fecundação é distinguir fecundação normal e anormal antes da fusão dos pronúcleos, separando zigotos normais dos anormais, mantendo apenas os normais em novo meio de cultura de embriões <sup>80</sup>.

Por fim, as taxas de fecundação na FIV convencional variam de forma ampla e estão diretamente relacionadas com os parâmetros espermáticos (concentração, motilidade e morfologia) <sup>82</sup>.

## v) ICSI

Tornou-se necessário o desenvolvimento de uma técnica mais eficaz que a FIV convencional para casos de baixa qualidade de sêmen e surgiu a ICSI<sup>82,98</sup>. Inicialmente surgiram técnicas para ultrapassar problemas relacionados com baixa qualidade de sêmen, ou seja, havendo dificuldade pelos espermatozoides para ultrapassar a zona pelúcida. Duas dessas técnicas foram a dissecação parcial da zona pelúcida (PZD) e a inserção de um espermatozoide no espaço perivitelino (SUZI), sendo esta última a mais utilizada na altura. Contudo, com o passar do tempo e com os melhores resultados provenientes da ICSI, a SUZI foi abandonada e rapidamente substituída<sup>82</sup>.

A ICSI consiste na injeção de um único espermatozoide diretamente no citoplasma do oócito, sendo desta forma ultrapassadas algumas barreiras ou dificuldades, tais como: a zona pelúcida e as suas irregularidades, a presença de anticorpos anti espermatozoides, anormalidades na reação acrossómica e no movimento dos espermatozoides<sup>83,98-100</sup>. Para além disso, a ICSI é a única opção a ser considerada em casos de espermatozoides provenientes da extração cirúrgica nos testículos ou epidídimos, em oócitos criopreservados, e também pode ser considerada em casos de baixo número de oócitos recolhidos das punções foliculares, e em casais com ocorrência anterior de falha de fecundação em FIV convencional<sup>80,83,99</sup>.

Nos dias de hoje, existem algumas opiniões contraditórias sobre a realização de ICSI. Por um lado, existem estudos que apontam para os riscos associados à técnica, por outro lado alguns estudos afirmam que esses riscos podem dever-se ao risco aumentado de problemas de saúde nos casais e não são risco propriamente associados à técnica<sup>100</sup>.

### **Execução prática**

Tanto os oócitos como os espermatozoides são colhidos da mesma forma que acontece para a FIV convencional, havendo, respetivamente, uma punção folicular e uma técnica de processamento de espermatozoides<sup>80,82,83</sup>. Contrariamente à FIV convencional, na ICSI é essencial a desnudação dos oócitos após preferencialmente 3-4 horas da colheita dos mesmos. Esta desnudação permite avaliar ao microscópio invertido (ampliação 20-40x) a maturação nuclear, as características morfológicas dos oócitos, assim como permite a realização da injeção do espermatozoide no oócito<sup>80,82,83,95</sup>. Depois da desnudação e depois de 3-5 horas da colheita dos oócitos é realizada a ICSI, sendo considerado como o tempo ideal para a sua execução<sup>82</sup>.

Existem algumas informações que devem ser tidas em conta antes da realização da ICSI: apenas oócitos maduros, ou seja, com 1 glóbulo polar e ausência de vesícula germinativa, deverão ser injetados; oócitos com um glóbulo polar de tamanho exagerado não deverão ser injetados; o tempo de execução da técnica deverá ser o mínimo possível; a temperatura e o pH deverão ser mantidos durante todo o processo e para isso o procedimento deve ser realizado num microscópio invertido composto por uma platina de aquecimento; a morfologia do oócito assim como anormalidades durante o processo devem ser registadas; e devem ser selecionados espermatozoides móveis e de morfologia normal <sup>83,95</sup>.

Antes da realização da técnica é necessário preparar placas de ICSI, existem vários designs/configurações para estas placas mas é essencial existirem determinadas características como: haver gotas de meio de injeção, onde vão ser colocados os oócitos a serem injetados; as gotas devem ser carregadas o mais juntas possível, para permitir visualização completa; haver gotas de uma solução viscosa de 7% polivinilpirrolidona (PVP), onde vai ser carregada uma suspensão de espermatozoides; as gotas devem ser cobertas por óleo mineral; depois de preparadas as placas devem ser incubadas a 37°C até serem usadas <sup>80,83</sup>.

### **1. Carregamento dos gâmetas nas placas**

Como dito anteriormente, uma suspensão de espermatozoides é carregada em gotas de PVP e o volume adicionado vai depender da qualidade da amostra de sêmen. O PVP é uma solução viscosa que provoca um movimento mais lento dos espermatozoides assim como a aspiração pela pipeta de injeção, o que consequentemente permite avaliar a morfologia dos espermatozoides e prevenir que os mesmos fiquem presos na pipeta de injeção. Quanto aos oócitos em metáfase II, estes são carregados um em cada gota de injeção, onde também será executada a injeção <sup>80,83</sup>.

### **2. Seleção e imobilização dos espermatozoides**

A seleção dos espermatozoides é baseada na observação morfológica dos mesmos usando uma ampliação de 20-40X. Para além disso, os espermatozoides selecionados devem ser imobilizados para permeabilizar a membrana e permitir a libertação de um fator citosólico que vai induzir a ativação do oócito <sup>83</sup>. Para a imobilização deve ser adotado um método mecânico, como por exemplo o demonstrado na figura 13. Após imobilização o espermatozoide é aspirado pela pipeta de ICSI, sendo realizada primeiro a entrada da cauda <sup>80</sup>.

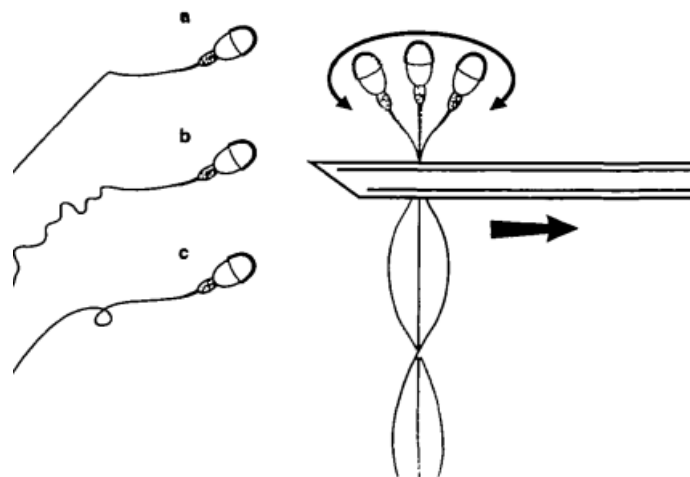


Figura 16. Exemplo de imobilização mecânica de espermatozoides. Os espermatozoides corretamente imobilizados apresentam uma cauda permanentemente torcida (a), enrolada (b) e em *loop*. Adaptado de Palenno et al., 1996 <sup>101</sup>.

### 3. Injeção

A injeção deve ser realizada num microscópio invertido também composto por um sistema de micromanipulação com suportes para as micropipetas, uma pipeta ICSI e uma pipeta de sustentação (*holding*). No momento da injeção o oócito é mantido estável através da sucção exercida pela pipeta de sustentação, adicionalmente, o glóbulo polar deve encontrar-se longe do local de injeção como demonstrado na figura 14 <sup>80,83,95</sup>. De seguida, o espermatozoide é colocado junto à abertura da pipeta de ICSI e esta é levada contra a zona pelúcida penetrando-a e conseqüentemente entrando em contacto com a membrana do oócito (Fig. 14). Ao ser atingida a rutura do oócito o espermatozoide deve ser expelido para o seu citoplasma (Fig. 14) <sup>80,83,95</sup>. Para além disso, este procedimento deve ser realizado de forma rápida para minimizar o tempo de exposição dos oócitos a condições adversas.

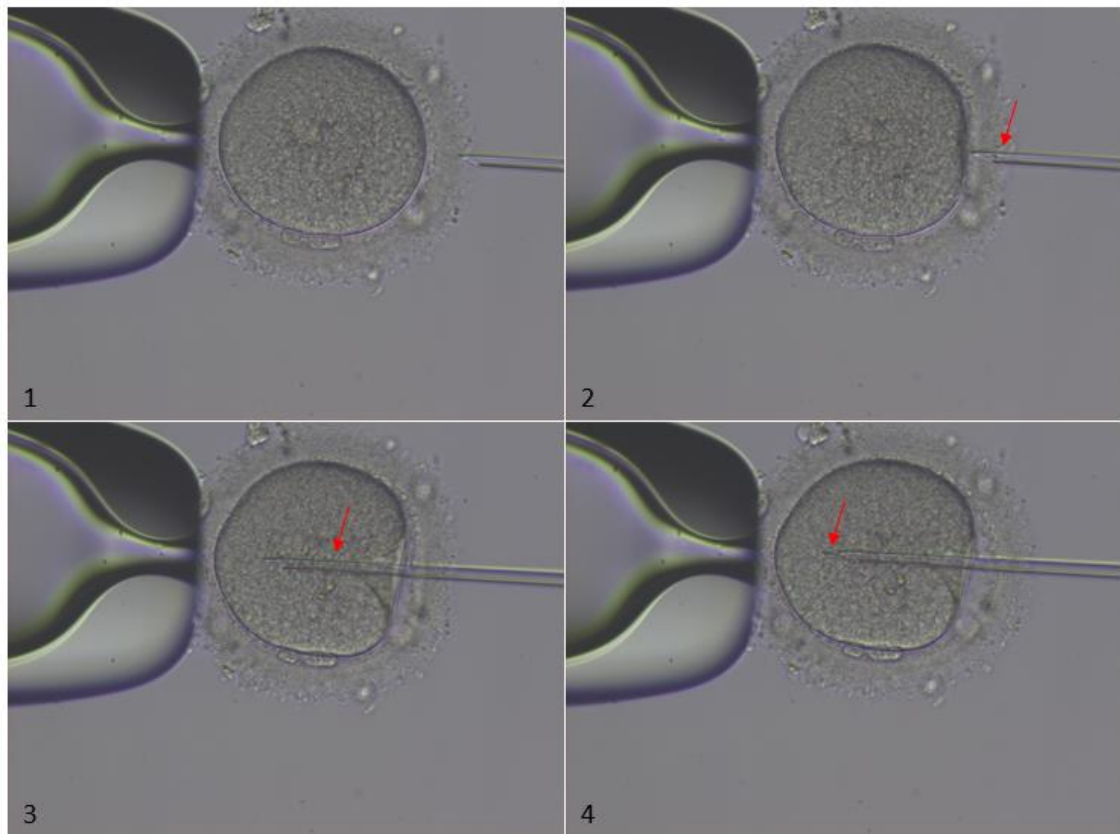


Figura 17. Procedimento de ICSI. No momento da injeção, após o oócito estar estável com a pipeta de sustentação, a pipeta de injeção é encostada à zona pelúcida (1). De seguida, o espermatozoide que se encontra na pipeta de injeção é colocado na extremidade da pipeta (2, seta vermelha) e é realizada a injeção (3). Assim que é causada a rutura da membrana do oócito o espermatozoide é expelido para o seu citoplasma (4, seta vermelha). Enquanto é realizado o procedimento de ICSI o glóbulo polar deve ser orientado às 12 horas ou 6 horas segundo o ponteiro dos relógios. Imagens obtidas através do software RI Viewer Imaging.

#### 4. Avaliação da fecundação

A avaliação da fecundação resultante de ICSI é realizada de forma semelhante à FIV convencional, no entanto, os tempos de avaliação podem acontecer mais cedo (16-18 horas após injeção), uma vez que, a ativação do oócito, o desenvolvimento dos pronúcleos assim como o seu desaparecimento acontecem mais cedo que na FIV convencional <sup>80,82</sup>. Além disso, as taxas de degeneração podem ser superiores na ICSI, em relação à FIV convencional, sendo que existem mais fatores que afetam os oócitos <sup>82</sup>. Por fim, na avaliação, apenas os oócitos com 2 pronúcleos e 2 glóbulos polares são aceites para continuar o seu desenvolvimento (Fig. 7) <sup>80,86,95</sup>.

## 2.2.2. Manipulação de embriões

### i) Cultura de embriões

Inicialmente, a cultura *in vitro* de embriões era comprometida devido às fracas condições de cultura, o que resultava num desenvolvimento de má qualidade e finalizando após 1,2 ou 3 dias da fecundação. Consequentemente, existia a necessidade para transferir os embriões o mais cedo possível, para que estes não perdessem qualidade com as fracas condições de cultura <sup>82</sup>. No entanto, depois de vários anos de desenvolvimento de novos sistemas de cultura e através do conhecimento da fisiologia do embrião, foi possível manter *in vitro* o desenvolvimento e viabilidade dos embriões durante mais tempo, assim como melhorar as suas taxas de implantação e subseqüentemente as taxas de gravidez <sup>82</sup>. Além disso, o prolongamento do tempo de cultura até ao 5º dia de desenvolvimento permitiu selecionar os embriões de melhor qualidade, aqueles que estão mais aptos a implantar <sup>82,86</sup>. Com esta seleção e o melhoramento das técnicas de criopreservação surgiu a vantagem de transferir apenas um embrião que apresenta a melhor probabilidade de implantar e originar um nado vivo.

### Fatores da cultura de embriões

Um sistema de cultura de embriões está relacionado não só com a interação do embrião e o seu meio físico envolvente, mas também com todos os parâmetros dentro do laboratório (Fig. 18) <sup>83</sup>. Apesar dos embriões humanos pré-implantados serem dos mais resilientes de todas as espécies de mamíferos, existe uma diversidade de fatores *in vitro* que podem afetar o sucesso de implantação e de uma gravidez:

- Incubadoras

As incubadoras são sem dúvida um dos equipamentos mais importantes num laboratório de FIV, uma vez que estas são responsáveis pela manutenção do ambiente *in vitro*. Existe uma variedade de incubadoras disponíveis no mercado atual com características para controlar o seu ambiente interno e permitir aquilo que é considerado como condições ótimas para a cultura de embriões <sup>102</sup>. As variáveis ambientais controladas pelas incubadoras afetam o desenvolvimento dos embriões para além de que também podem agir como agentes de stress: temperatura, concentração de gases, e humidade (fatores estes que influenciam o pH do meio de cultura, osmolaridade e a qualidade do ar) <sup>102</sup>. A temperatura pode ser prejudicial quando em temperatura ambiente sendo aconselhado 37°C

para a cultura de embriões <sup>82,102</sup>. Associado à temperatura surgem valores apropriados de humidade para assegurar uma estabilidade da cultura ao controlar o risco de evaporação, o qual afeta a osmolaridade, contudo existe algum debate sobre os resultados da cultura a seco e húmida <sup>102</sup>. Para além do mais, os gases mais importantes na cultura de embriões são o oxigénio (O<sub>2</sub>) e o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), os dois tendo um papel fundamental na regulação do pH do meio de cultura <sup>82,102</sup>. O O<sub>2</sub> é necessário ao metabolismo do embrião, o que resulta na produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e uma quantidade exagerada destes compostos pode causar danos no ADN e em proteínas do embrião <sup>82,102</sup>. Esta pode ser a razão pela qual uma tensão de oxigénio reduzida (5%) está associada a uma melhor viabilidade embrionária <sup>54,82</sup>, ao haver uma reduzida produção de ROS e ao exercer influencia num aumento da expressão de enzimas antioxidantes e transportadores de glucose <sup>102</sup>. Já a concentração de CO<sub>2</sub> está intimamente associada ao pH do meio o que levou à adoção dos 5% de CO<sub>2</sub> atmosféricos por vários laboratórios <sup>82,102,103</sup>

Um problema bem evidente sobre as incubadoras é a abertura das mesmas, ou seja, quantas mais vezes a incubadora é aberta acontecem mais flutuações nas suas variáveis ambientais prejudicando o desenvolvimento embrionário <sup>82</sup>. Sendo assim, surgem novas características que têm como objetivo colmatar e controlar as flutuações como a presença de sensores das variáveis ambientais capazes de restaurar as condições em pouco tempo e a presença de câmaras múltiplas numa única incubadora <sup>82</sup>. Para além disso, atualmente existem incubadoras que incluem a capacidade de *time-lapse* que proporciona uma monitorização constante dos embriões sem que estes sejam removidos do seu ambiente de cultura <sup>82</sup>. Em conclusão, é essencial a consideração de uma abertura mínima das câmaras que contém embriões em cultura, sendo aconselhado ter diferentes câmaras para o equilíbrio de meios e para a cultura de embriões assim como ter atenção no número e tipo de incubadoras <sup>82,95</sup>.

- Luz

Através de estudos anteriores, foi possível demonstrar o efeito da luminosidade sobre o desenvolvimento embrionário, tanto em modelos animais como no ser humano, demonstrando-se que ocorre um melhor desenvolvimento em condições de baixa luminosidade <sup>82</sup>. Sendo assim, é evidente que a execução

de todos os procedimentos de manipulação e de cultura dos embriões devem ser mantidos em baixa luminosidade.

- Volume de incubação/Cultura em grupo

Em condições fisiológicas do trato genital feminino os embriões encontram-se expostos a quantidades muito reduzidas de fluido (microlitros), enquanto em condições *in vitro*, os embriões desenvolvem-se em quantidades de meio superiores (até 1 ml) <sup>82</sup>. Nestas condições *in vitro* os fatores produzidos pelo próprio embrião serão diluídos perdendo o seu efeito e as diferenças com o ambiente fisiológico levaram ao surgimento de estratégias como a redução da quantidade de meio de cultura ou o agrupamento de embriões numa mesma gota de meio, o que demonstrou melhorar o desenvolvimento embrionário <sup>82</sup>. Uma redução do meio ou o agrupamento de embriões numa mesma gota de meio aumenta a concentração de fatores produzidos pelos embriões o que conseqüentemente melhora a ação destes tanto de uma forma autocrina ou paracrina <sup>82</sup>. Apesar disso, este tópico será mais explorado na Componente de investigação desta dissertação.

- Meio de cultura

O meio de cultura tem influência no desenvolvimento embrionário e conseqüentemente na implantação dos embriões e eficácia das técnicas de FIV. Esta influência pode ser explicada pelas diferenças na expressão de genes envolvidos na apoptose, degradação de proteínas, metabolismo e regulação do ciclo celular, para além disso também pode ser explicada pelas alterações nos padrões de metilação e regulação epigenética <sup>104</sup>. Atualmente, existe uma competição de mercado na venda de meios de cultura para embriões pré-implantação, o que complica o esforço científico para otimizar os meios de cultura ao haver por exemplo a omissão da concentração dos seus ingredientes

<sup>104</sup>.

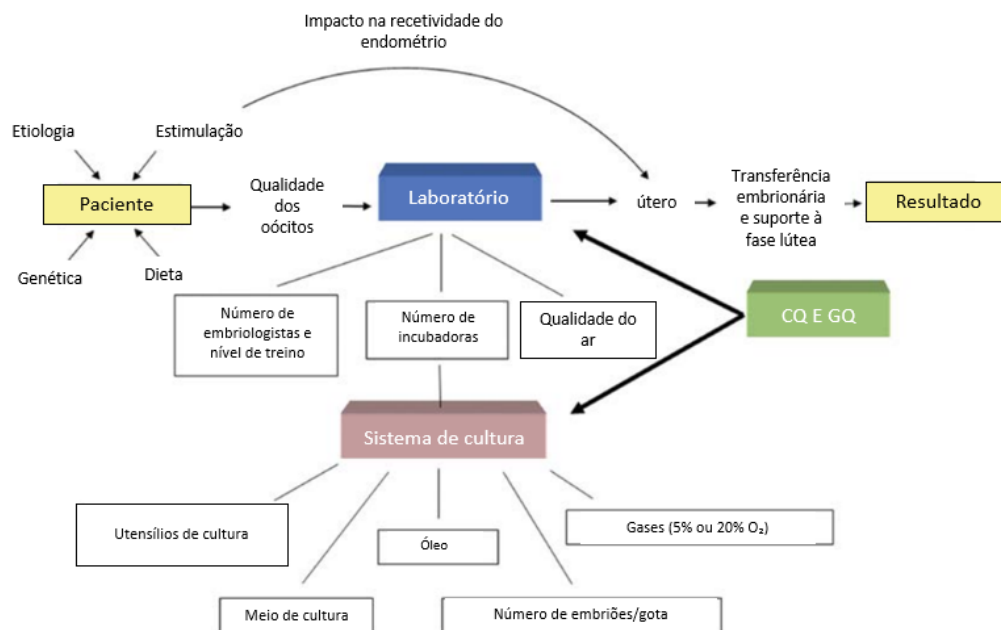


Figura 18. Ilustração da complexidade e interação entre fatores que afetam um tratamento de FIV. Para além dos diversos fatores presentes num laboratório de embriologia, um dos principais componentes do sucesso de um laboratório e sistema de cultura é o nível de controlo de qualidade (CQ) e garantia de qualidade (GQ). Adaptado de Gardner e Simón, 2017<sup>82</sup>.

### Meio de cultura e necessidades metabólicas do embrião

Os meios de cultura são essenciais para manter as necessidades metabólicas dos embriões, mimetizando o fluido presente no trato genital feminino tendo as mesmas funções, contudo, por vezes torna-se complicada a otimização dos meios. Apesar da diversidade de meios disponíveis no mercado estes consistem em dois tipos:

- 1) Meio sequencial: Este meio foi desenvolvido especificamente para a cultura de embriões humanos baseando-se na disponibilidade de nutrientes no seu ambiente in vivo<sup>82</sup>. Para além disso, este meio tem em conta as necessidades metabólicas dos embriões em cada estágio de desenvolvimento, havendo necessidade de renovação de meio, uma vez que componentes essenciais em estadios mais tardios da cultura de embriões podem ser prejudiciais em estadios iniciais do desenvolvimento embrionário<sup>82,103</sup>. Do dia 1 ao dia 3, fase de clivagem, a glucose deve encontrar-se em baixas quantidades ou ausente na presença de aminoácidos e EDTA, e devem ser incluídos lactato e piruvato<sup>82,103</sup>. Quanto aos aminoácidos não essenciais podem estar presentes, mas os essenciais devem ser retirados, contudo, o aminoácido taurina deve estar

no seu mínimo <sup>82,103</sup>. Concluída esta fase, é indispensável uma fonte de proteína podendo ser albumina pura ou maioritariamente albumina <sup>82,103</sup>. Já do dia 3 ao dia 5, estágio de mórula e blastocisto, a concentração de glucose deve ser aumentada, devem estar presentes todos os aminoácidos e a fonte de proteína deve ser semelhante à do estadio anterior <sup>82,103</sup>.

- 2) Meio único / “one step”: O surgimento de um microscópio *time-lapse* exigiu uma cultura não interrompida. Sendo assim, este meio foi desenvolvido de forma a suportar a acumulação de amónia derivada do metabolismo de aminoácidos e balancear a concentração de nutrientes necessária entre as diferentes necessidades de cada fase (fase de clivagem e de blastocisto) <sup>82</sup>.

Para além dos meios de cultura consistirem em dois tipos, existem componentes que devem ser tidos em conta e até devem ser mais bem estudados para garantir uma satisfação das necessidades metabólicas dos embriões. Os principais componentes com importância metabólica para os embriões são os seguintes:

- Água: A água é o componente maioritário nos meios para a cultura de embriões, havendo grande importância no seu grau de pureza para a qualidade do meio <sup>82</sup>.
- Iões: A concentração extracelular de iões pode ter uma importância elevada na concentração intracelular e, portanto, pode afetar também a regulação dos processos celulares normais. Contudo, ainda se sabe pouco sobre o papel dos iões durante o desenvolvimento dos embriões pré-implantação <sup>82</sup>.
- Carboidratos: No trato genital feminino, o embrião é submetido a um gradiente de carboidratos durante o seu desenvolvimento, nas trompas de Falópio existem uma elevada concentração de piruvato e lactato e baixa concentração de glucose, enquanto no útero ocorre uma inversão. Para além disso, estes componentes apresentam ser a fonte principal de energia para o embrião juntamente com os aminoácidos <sup>82</sup>. Inicialmente, existe uma preferência no embrião por piruvato/lactato e também é sugerido que a glucose é tóxica durante a cultura *in vitro* antes da ativação do genoma <sup>30,31,82,105</sup>. Com o desenvolvimento do embrião a necessidade metabólica pela glucose aumenta, sendo a preferência nutritiva do embrião após a compactação, assim que existe ativação do genoma <sup>30,31,82,105</sup>. Deste modo, é exigido nos meios de cultura de embriões a

inclusão de piruvato, lactato e glucose, para que estes interajam e permitam um normal metabolismo do embrião em cada estadio específico <sup>82</sup>.

- Aminoácidos: Os aminoácidos alanina, aspartato, glutamato, glicina e serina (aminoácidos não essenciais) encontram-se em elevadas concentrações no trato genital feminino, assim como o aminoácido taurina <sup>30,31,82</sup>. Apesar disso, ao longo do trato genital feminino existem todos os aminoácidos e são essenciais no metabolismo dos embriões, no entanto, também têm um papel na regulação do pH e como agentes quelantes <sup>82,105</sup>. Os aminoácidos não essenciais e a glutamina estimulam as taxas de clivagem, a formação de blastocistos e a eclosão, já os aminoácidos essenciais, que estão em menor concentração, apenas estimulam as taxas de clivagem a partir do estadio de 8 células e aumentam o desenvolvimento da massa de células interna no blastocisto <sup>82,105</sup>. No meio de cultura o rácio entre os diferentes aminoácidos parece ser mais importante que a concentração dos mesmos, sendo que estes competem pelo transporte na membrana plasmática do embrião <sup>30,31</sup>. Sendo assim, fica evidente que a presença de aminoácidos no meio de cultura é critica para o desenvolvimento normal do embrião em cultura *in vitro* <sup>82</sup>.
- Amónia: Em condições *in vitro*, a metabolização de aminoácidos pelo embrião, assim como a quebra espontânea dos aminoácidos, leva à produção de amónia, a qual é tóxica para o embrião, provocando alterações na diferenciação, metabolismo e expressão genética do embrião e reduzindo a sua probabilidade de implantação e desenvolvimento fetal <sup>82</sup>. Dois dos métodos para reduzir as concentrações deste composto em condições *in vitro* é a renovação do meio de cultura a cada 48 horas ou o uso de concentração mínima eficaz de aminoácidos <sup>82</sup>.
- Vitaminas: As vitaminas estão presentes nos meios de cultura, apesar de não se saber ao certo as suas ações no desenvolvimento embrionário <sup>82</sup>. Em contrapartida, sabe-se que a vitamina B12 e o ácido fólico são necessárias para processos de metilação e as vitaminas C e E podem agir como reguladores redox <sup>30,31</sup>. Além disso, as vitaminas do grupo B são fulcrais para o metabolismo de carboidratos e aminoácidos, demonstrando assim que algumas vitaminas possam ter uma ação importante no desenvolvimento embrionário <sup>82</sup>.
- Nucleótidos: Nos estádios iniciais os embriões são capazes de produzir nucleótidos, que são essenciais durante o desenvolvimento para os processos

de reparação de ADN<sup>30,31</sup>. Deste modo, a adição destes componentes no meio de cultura não é essencial<sup>82</sup>.

- Agentes quelantes: Um agente quelante que demonstrou ter benefício sobre o desenvolvimento embrionário foi o ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA), porém este apenas demonstrou benefício nos estádios anteriores à compactação<sup>82</sup>.
- Antibióticos: O uso de antibióticos no meio de cultura de embriões tem vindo a ser praticado, contudo, o seu uso ainda é questionável<sup>82</sup>. Uma das considerações de grande importância clínica é o facto de a lavagem de embriões em meio com antibióticos poder remover contaminações por bactérias<sup>82</sup>.
- Proteínas: No meio de cultura para embriões humanos é possível a adição de albumina sérica humana como fonte proteica, estas macromoléculas podem facilitar a manipulação dos embriões assim como atenuar o efeito de toxinas<sup>82</sup>. Todavia, existe dúvidas sobre o uso de albumina sérica humana devido à sua pureza, eficácia e pela produção de compostos que podem afetar o desenvolvimento embrionário<sup>82</sup>. Deste modo, surgiu uma substituição, a albumina recombinante, cuja eficácia clínica foi validada, mas serão necessários mais estudos para comprovar a sua segurança<sup>82</sup>.
- Glicosaminoglicanos: O glicosaminoglicano mais estudado na cultura de embriões é o ácido hialurônico, que tem vindo a demonstrar aumentar as taxas de gravidez e implantação ao ser usado no meio de transferência de embriões<sup>82</sup>.
- Hormonas, citocinas e fatores de crescimento: Nos dias de hoje existem algumas limitações de informação sobre o efeito das hormonas no desenvolvimento embrionário não sendo atualmente justificada a sua adição no meio de cultura<sup>82</sup>. Quanto às citocinas e fatores de crescimento, foram detetados vários tipos destes compostos no trato genital feminino e, apesar de já existirem dados do efeito de alguns fatores de crescimento no desenvolvimento embrionário, estes compostos continuam ausentes nos meios de cultura para embriões<sup>30,31,82</sup>. Para além do mais, os fatores de crescimento parecem não atuar de forma individual, mas sim de forma interativa, o que exige mais estudos sobre a sobre o seu efeito no desenvolvimento embrionário<sup>30,31,82</sup>.

- Sistema de tamponação: Para manter o pH do meio de cultura entre os 7.2/7.4 é utilizado um sistema de tamponação bicarbonato/ $\text{CO}_2$ , no entanto, este sistema depende do uso de uma incubadora de  $\text{CO}_2$  para manter este gás entre 5-6%, e da utilização de óleo para cobrir o meio minimizando as trocas gasosas quando o meio estiver fora da incubadora <sup>82</sup>. Um outro sistema de tamponação que tem vindo a demonstrar sucesso na cultura de embriões é o sistema HEPES <sup>82</sup>.

## ii) Eclosão assistida

As taxas de implantação em procedimentos de FIV/ICSI apresentam uma baixa percentagem, e estão intimamente relacionadas com a qualidade dos gâmetas e características intrínsecas do embrião, no entanto, por vezes embriões com bom desenvolvimento falham a implantação por dificuldades em eclodir <sup>14</sup>. Das diversas técnicas adotadas para melhorar as taxas de implantação surge a eclosão assistida, que consiste na rutura/remoção da zona pelúcida de forma mecânica, química ou através de laser <sup>14,106,107</sup>. Apesar das contradições sobre os benefícios da eclosão assistida existentes entre os vários estudos publicados, este procedimento é normalmente aconselhado em casos de pacientes mais velhas (acima dos 38 anos), em embriões que foram criopreservados ou em recorrentes falhas de transferência embrionária <sup>14,106</sup>. A eclosão assistida através de laser é a técnica mais usada com vantagens em relação às outras: poupança de tempo, os embriões estão fora da incubadora por menos tempo e o aumento de temperatura provocado pelos choques de laser é mínimo <sup>107</sup>. Contudo, esta técnica também está associada a um aumento nas taxas de gravidezes múltiplas <sup>107</sup>. Finalizando, ainda existe uma necessidade extrema para o desenvolvimento de mais estudos sobre os benefícios da eclosão assistida e das suas diferentes técnicas <sup>106</sup>.

### iii) PGT

O PGT foi primeiramente executado no ser humano em 1990, ao serem selecionados embriões do sexo feminino para prevenir o nascimento de descendência masculina afetada com uma doença genética recessiva ligada ao cromossoma X<sup>15,86,108,109</sup>. Após este evento, o uso do PGT, para prevenir o nascimento de descendência com uma doença genética começou a expandir, contudo, a sua aplicação apresenta riscos e controvérsias associadas<sup>109</sup>. Sendo assim, o objetivo do PGT é identificar de forma antecipada, ou seja, antes da implantação do embrião, embriões geneticamente anormais ou normais, o que torna esta técnica incluída nas técnicas de PMA<sup>15</sup>.

Com o avanço da tecnologia do PGT surgiu associado um aumento nas indicações desta técnica: doenças associadas aos cromossomas sexuais, mutações num único gene autossómico, risco de aneuploidias cromossómicas, idade materna avançada, rearranjos cromossómicos, falhas repetidas na implantação com FIV, abortos recorrentes e por vezes fator de infertilidade masculino severo<sup>86,110</sup>. Apesar disso, ainda existem discussões para consideração de futuras indicações a serem incluídas em ciclos de PGT, tais como em situações de embriões provenientes de doação de oócitos e mais tarde eventualmente a inclusão deste teste em todos os ciclos de PMA<sup>86</sup>.

Um procedimento de PGT, requer múltiplos passos de manipulação para se obter vários embriões de forma a serem testados e, conseqüentemente, serem transferidos aqueles que não se apresentem afetados. Para isso, é necessária obtenção de embriões a partir da fecundação de oócitos por FIV convencional ou através de ICSI<sup>109</sup>. Para este teste é essencial a obtenção de células provenientes do embrião para amplificação de uma quantidade reduzida de ADN, através da reação em cadeia da polimerase (PCR), para posterior análise da presença de uma doença genética em particular<sup>109</sup>. Conseqüentemente, para a obtenção destas células é necessário a realização de uma biópsia:

- Biópsia de glóbulo polar: Os glóbulos polares, que são gerados da divisão meiótica dos oócitos, podem ser removidos sem afetarem o desenvolvimento embrionário, porém, esta técnica apenas providencia informação genética materna e não considera anomalias paternas<sup>86,110</sup>.

- Biópsia de blastómeros: Esta técnica consiste na remoção de um ou dois blastómeros num embrião de 6-10 células após abertura da zona pelúcida de forma química, mecânica ou a laser<sup>86,110</sup>. Nesta fase as células totipotentes ainda não passaram pelo processo de compactação, todavia, este método não é tão comum porque a viabilidade

do embrião pode ser comprometida, exigindo um embriologista com muita experiência<sup>86,110</sup>. Para além disso, existe uma elevada taxa de resultados não conclusivos ou com elevada taxa de erro devido ao número reduzido de células recolhidas<sup>86,110</sup>.

- Biópsia de trofoectoderme: O embrião no seu estado de blastocisto é composto por dois tipos de células, a massa de células interna (a qual irá originar o feto) e a trofoectoderme (que irá originar a placenta)<sup>110</sup>. Sendo assim, a remoção de células da trofoectoderme tem como vantagens ter uma menor probabilidade de comprometer o embrião, é possível uma análise mais precisa sendo que é recolhida uma maior quantidade de material genético e ocorre uma perda mínima de células do blastocisto<sup>86,110</sup>. Esta técnica é realizada no dia 5 ou 6 de desenvolvimento do embrião. Antes disso, pode ser efetuada eclosão assistida no dia 3, contudo, ocorre o risco de, no dia da biópsia, a massa interna estar a sair pela zona pelúcida<sup>110</sup>. Na prática, a biópsia da trofoectoderme é iniciada num microscópio invertido composto por um sistema de micromanipulação com suportes para as micropipetas, orientando o blastocisto com a pipeta de sustentação (*holding*) de forma que a massa de células interna permaneça afastada do local de biópsia (Fig. 16), de seguida, é executada uma rutura na zona pelúcida, caso não tenha sido realizada eclosão assistida no dia 3 ou caso seja a massa interna a sair pelo orifício efetuado na zona pelúcida<sup>110</sup>. Subsequentemente, são aspirados um pequeno número de células da trofoectoderme e transferidas para um tubo para a análise genética (Fig. 16)<sup>110</sup>.

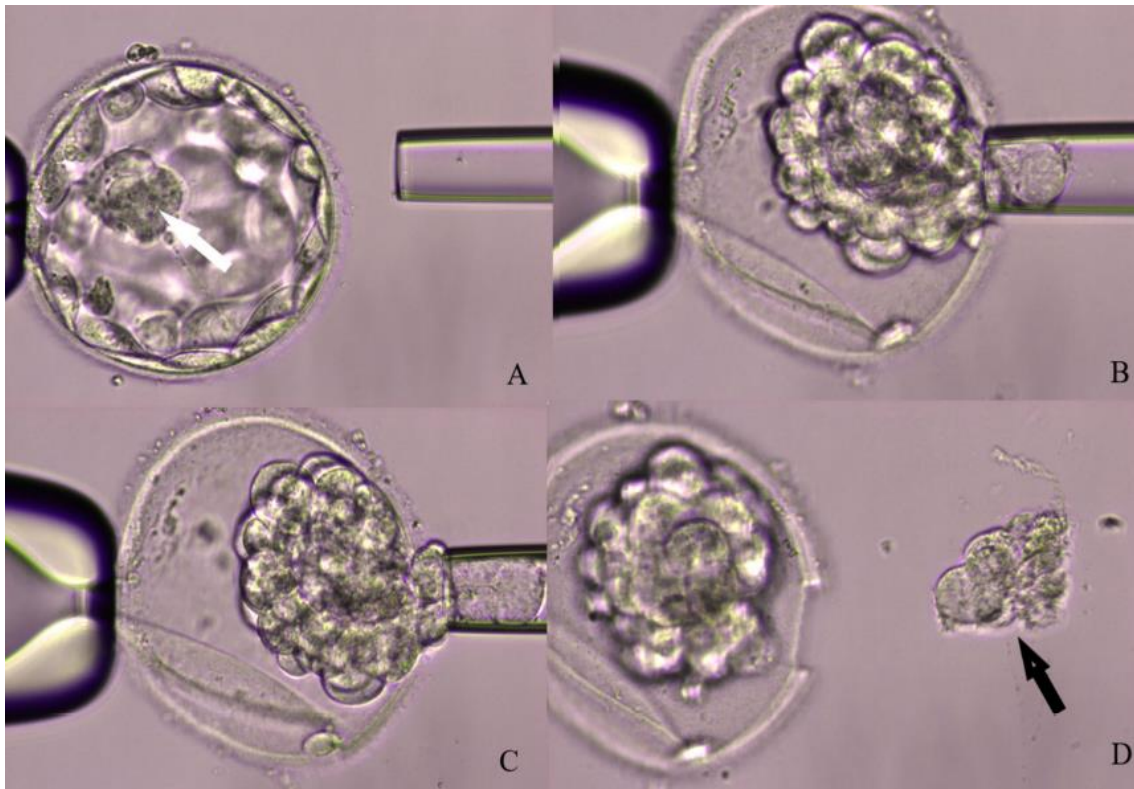


Figura 19. Procedimento de uma biópsia a blastocisto com assistência de laser. Como primeiro passo o blastocisto é orientado com a pipeta de sustentação de forma a manter a massa interna (seta branca) o mais longe possível do local de biópsia (A). De seguida, a pipeta de biópsia é introduzida através da abertura na zona pelúcida provocada com a assistência de laser e são gentilmente aspiradas poucas células da trofoectoderme (B, C). Por último, as células aspiradas (seta preta) são transferidas para um tubo para a análise genética (D). Adaptado de Greco et al., 2020 <sup>110</sup>.

Das técnicas de biopsias utilizadas para o PGT, a biópsia da trofoectoderme é considerada como a mais apropriada para garantir um impacto mais reduzido na viabilidade do embrião, visto que existe uma quantidade de material celular adequada de forma a assegurar uma precisão elevada da composição genética do embrião <sup>86,110</sup>. Concluindo, também existe a vantagem da biópsia da trofoectoderme ser realizada em embriões de dia 5, e não de dia 3, evitando um gasto monetário e de tempo em embriões de desenvolvimento de baixo potencial <sup>86</sup>.

#### iv) Criopreservação

A criopreservação de embriões humanos iniciou o seu sucesso em 1983 com a primeira gravidez confirmada e o primeiro nascimento em 1984<sup>80,111</sup>. Com o passar dos anos, o melhoramento das técnicas de criopreservação permitiu a transferência de um menor número de embriões (normalmente apenas um embrião), mas também permitiu o adiamento da data de transferência por motivos de risco ao ser possível criopreservar todos os embriões derivados de um ciclo em curso (*freeze all / elective frozen embryo transfer*) (Montag e Morbeck, 2017). Subsequentemente, as indicações atuais para a criopreservação de embriões são ciclos *freeze all / elective frozen embryo transfer* e ciclos de PGT<sup>111,112</sup>.

Atualmente, existem diversos protocolos para criopreservação de embriões que variam no tipo e concentração de crioprotetores usados, tempo de equilíbrio, taxas de congelação e nos aparelhos de criopreservação<sup>112</sup>. Assim como acontece com a criopreservação de oócitos, existem duas abordagens: a congelação lenta e a vitrificação<sup>112</sup>. Estas duas abordagens apresentam os mesmos princípios tanto na criopreservação de oócitos como na criopreservação de embriões, uma vez que os problemas relacionados com a criopreservação são semelhantes<sup>82,112</sup>. Para além disso, assim como acontece com a criopreservação de oócitos, a abordagem de vitrificação é a mais eficaz para preservar embriões<sup>112</sup>.

#### **Vitrificação de embriões**

Os protocolos de vitrificação de embriões existentes permitem a vitrificação dos mesmos em quaisquer estádios de desenvolvimento, não havendo diferenças nas taxas de sucesso, contudo, os estádios de desenvolvimento mais comuns são ao dia 3 e em estádio de blastocisto<sup>82</sup>. Além disso, o procedimento de vitrificação é o mesmo independentemente do estágio de desenvolvimento do embrião. De forma adicional, os protocolos de vitrificação de embriões são semelhantes aos protocolos de vitrificação de oócitos, onde os meios apresentam os mesmos componentes.

## v) Transferência

Inicialmente, a transferência embrionária era considerada como uma variável com pouca ou nenhuma importância no sucesso dos ciclos de PMA<sup>82</sup>. Em contraste, nos dias de hoje é considerado como um dos principais fatores que afeta a implantação do embrião<sup>80,82,113</sup>. A transferência embrionária pode ser feita ao dia 3, no estágio de clivagem, ou ao dia 5, no estágio de blastocisto, dependendo da necessidade de seleção por embriões de melhor qualidade<sup>86</sup>. As transferências que ocorrem ao dia 5 de desenvolvimento são possíveis nos dias de hoje devido à disponibilidade de melhores sistemas de cultura, e têm como vantagens uma melhor seleção pelos embriões de melhor qualidade e conseqüentemente permitir uma redução no número de embriões transferidos<sup>16,86,113</sup>. Por outro lado, nem todos os embriões conseguem adaptar-se ao ambiente *in vitro* de cultura de blastocisto e, portanto, podem apresentar um melhor desenvolvimento no útero em relação à incubadora<sup>86</sup>. Além disso, o número de embriões recomendados a serem transferidos depende da idade da paciente, da qualidade dos embriões e do estágio de desenvolvimento dos embriões<sup>16,86</sup>.

A transferência embrionária consiste na seleção de um embrião, ou mais, transferência do(s) selecionado(s) para uma placa de transferência, carregamento do cateter de transferência com o(s) embrião(ões) (Fig.17) e finalizando com a transferência do(s) embrião(ões) para a cavidade uterina da paciente<sup>80</sup>. Deste modo, existem determinados fatores no momento da transferência que influenciam o sucesso da mesma, tais como a experiência do embriologista, o material utilizado (exemplo: o tipo de cateter) e o tempo do procedimento<sup>80,82</sup>. Para além disso, existem algumas atenções que devem ser prestadas pelo embriologista: os embriões não devem ser carregados no cateter até o embriologista ser alertado de que a visualização do útero via ultrasonografia está pronta; o embrião deve ser devolvido à placa de cultura depois de algumas tentativas falhadas e nunca permanecer indefinidamente no cateter; durante a manipulação dos embriões é necessário muito cuidado para não danificar o embrião; depois de realizada a transferência o cateter deve ser revisto para confirmar a transferência; o volume de meio usado para carregar o embrião no cateter nunca deve ser inferior a 10µL ou superior a 60 µL e dependendo do cateter pode ser necessário o carregamento de fases de ar<sup>80,82</sup>.

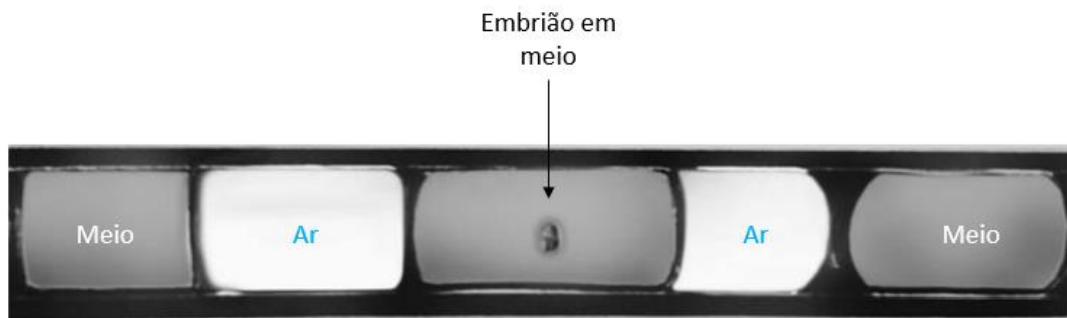


Figura 20. Cateter de transferência carregado com embrião. O blastocisto é carregado com meio de cultura entre 2 bolhas de ar. Adaptado de Gardner e Simón, 2017<sup>82</sup>.

## vi) Qualidade embrionária

Nas suas fases iniciais as taxas de sucesso das técnicas de PMA estavam associadas à transferência simultânea de múltiplos embriões, porém, essa abordagem levanta um leque de riscos tanto para a mãe como para os bebês<sup>83</sup>. Sendo assim, com estes riscos e havendo a necessidade de reduzir o número de embriões a serem transferidos, surge a exigência de métodos mais sensíveis e não invasivos para a seleção de embriões antes da transferência<sup>114</sup>. Apesar disso, as taxas de sucesso das técnicas de PMA também estão dependentes de outros fatores para além do número de embriões transferidos, como da qualidade dos embriões, as condições da paciente e da dinâmica do laboratório<sup>114</sup>.

A avaliação da qualidade embrionária é um fator que ajuda na redução do número de embriões a serem transferidos não reduzindo as taxas de sucesso das técnicas de PMA, uma vez que permite a seleção do embrião que apresenta as características consideradas como melhores para implantar<sup>83,114</sup>. Na avaliação da qualidade embrionária a morfologia do embrião demonstrou ser o critério de seleção mais adequado ao haver uma associação entre melhor aparência morfológica com maior probabilidade de provocar uma gravidez<sup>80,83,115</sup>. Com o passar dos anos surgiram diversos sistemas de classificação embrionária baseando-se na morfologia, onde são considerados alguns parâmetros como número de células, simetria, multinucleação e fragmentação<sup>80,83</sup>. Exemplos de sistemas de classificação foram o de Scott et al. com a importância de classificar zigotos e o de Gardner et al. com a importância de classificar blastocisto<sup>116,117</sup>. Mais tarde, surgiu o sistema de classificação da Sociedade Espanhola dos Estudos da Biologia da Reprodução (ASEBIR) categorizando os embriões com base na sua avaliação sequencial em diferentes estágios de desenvolvimento<sup>115</sup>. Contudo, a diversidade de sistemas levou à impossibilidade de se realizarem estudos multicêntricos com a mesma avaliação da qualidade embrionária, má interpretação de resultados provenientes de outros laboratórios, e a dificuldade de comparação de resultados entre centros<sup>115</sup>. Deste modo, ocorreu a necessidade por um consenso global para a divulgação do conjunto de características mínimas a uma classificação precisa do desenvolvimento embrionário, surgindo daí o consenso de Istambul<sup>118</sup>

### **Classificação ASEBIR**<sup>115</sup>

O sistema de classificação de embriões ASEBIR é aplicado nos estádios iniciais de embrião, e tem como base a avaliação de parâmetros que estão diretamente associados com as probabilidades de implantação, no entanto, alguns parâmetros não estão

incluídos no sistema, mas podem fazer a diferença entre embriões de uma mesma categoria. Este sistema está dividido em 4 categorias: embriões de categoria A são os mais aptos, categoria B são considerados sub-ótimos, C os intermédios e os de categoria D os menos aptos a implantar.

- Dia 0: Antes dos oócitos serem injetados estes devem ser selecionados e analisados por possíveis alterações na sua morfologia. Neste passo são analisadas algumas características no citoplasma: o agrupamento de organelos; a granulosidade; presença de agregados de retículo endoplasmático liso; presença de vacúolos; e a presença de inclusões citoplasmáticas. São também analisadas características extracitoplasmáticas: presença de detritos celulares no espaço perivitelino; comparência de um espaço perivitelino aumentado; e o tamanho do oócito assim como do seu glóbulo polar, os quais se forem aumentados deve-se evitar a inseminação. Apesar destas características serem registadas e terem alguma influência negativa sobre o futuro embrião, não são incluídas no sistema de pontuação.

- Dia 1: Na confirmação da fecundação, entre 16-18 horas após inseminação, é analisada a presença de dois pró-núcleos e de dois glóbulos polares. Na análise de ploidia o número de glóbulos polares tem um grande papel, descartando-se zigotos com apenas 1 glóbulo polar. É também analisada a simetria, posição e localização dos pronúcleos, assim como o número, simetria e localização dos corpos precursores nucleares. Depois de 25-27 horas da inseminação, é avaliada a primeira clivagem mitótica sendo registado o momento, similaridade de tamanho dos blastómeros, multinucleação e fragmentação. Embora a primeira clivagem mitótica poder servir como um parâmetro de diferenciação entre embriões da mesma categoria de qualidade, mais uma vez nesta fase os parâmetros analisados não são incluídos no sistema de pontuação.

- Dia 2 e 3: Neste estadio de desenvolvimento inicia-se a aplicação do sistema de pontuação segundo vários fatores (Tabela 1):

- a) **Número de blastómeros e taxa de clivagem:** No dia 2 os embriões devem ser observados após as 43-45 horas da inseminação e ao dia 3 após as 67-69 horas. No dia 3 a classificação da qualidade depende da taxa de clivagem comparativamente com o dia 2, para além disso, embriões que têm uma divisão mais lenta ou mais rápida, em comparação com embriões de ótima taxa de clivagem, apresentam menor possibilidades de implantação assim como maior taxa de aneuploidias.

- b) **Tamanho dos blastómeros em estado específico:** Em estado específico o tamanho dos blastómeros é compatível com o ciclo de clivagem. O tamanho dos blastómeros deve ser comparado nos estádios de 2, 4, 8 e 16 células. Na observação os blastómeros devem apresentar o mesmo tamanho, contudo, alguns embriões encontram-se em estágios intermédios (não tendo especificamente 2, 4, 8 ou 16 células) e com células de diferentes tamanhos, devido à divisão assíncrona dos blastómeros que pode ser confirmada pela simetria entre células. Nestes dois casos os embriões são considerados em estado específico. Por outro lado, quando existem clivagens desequilibradas, ou seja, divisões assimétricas, os embriões apresentam blastómeros de tamanhos diferentes e se a diferença entre o maior e menor blastómero for de 20% estes embriões não são considerados em estado específico e apresentam reduzida probabilidade de implantação.
- c) **Fragmentação celular:** se a fragmentação apresentar uma percentagem elevada ou se os fragmentos forem de grande tamanho, pode comprometer a formação de blastómeros assim com a implantação. Esta característica consiste na presença de corpos anucleados formados de porções de citoplasma e membrana celular de blastómeros. A ASEBIR divide 4 grupos de fragmentação, de forma decrescente em qualidade:  $\leq 10\%$ ,  $>10\% - 25\%$ ,  $>25\% - 35\%$  e  $>35\%$ . Além disso, todos os embriões que apresentem fragmentação superior a 50% devem ser descartados.
- d) **Núcleo e multinucleação:** A presença de 2 ou mais núcleos em pelo menos um blastómero do embrião é considerado multinucleação. Este fator está associado a um aumento em anormalidades cromossómicas e na probabilidade de aborto, assim sendo, é aconselhado a cultura de embriões com multinucleação até ao dia 5 e transferência dos mesmos apenas quando estes apresentam boa qualidade e não há disponível mais nenhum embrião.
- e) **Presença de vacúolos:** Embriões que contenham um grande número e/ou vacúolos de grandes dimensões podem ser prejudicados quanto ao desenvolvimento espacial, porém, uma reduzida presença de vacúolos não afeta o desenvolvimento embrionário.
- f) **Zona pelúcida:** Anormalidades na zona pelúcida, como espessura aumentada, presença de septo, forma oval e cor escura, podem reduzir as probabilidades de implantação de um embrião ao dificultarem a eclosão do mesmo. Consequentemente, estas anormalidades reduzem embriões de categoria A para embrião de categoria B.

Tabela 1. Classificação embrionária ao dia 2 e 3 de desenvolvimento. (bn) binucleada(s), (ZP) zona pelúcida. Adaptado de Saiz et al. 2018<sup>115</sup>.

Categoria	Dia	Nº células ("→" do dia 2 para o dia 3)	Fragmentação %	Simetria	Multinucleação	Outras
A	2	4	≤10%	Estágio especifico	Ausência	Normal
	3	8				
B	2	5	>10-25%	Estágio especifico	Ausência	≤50% das células com vacúolos pequenos, ou ZP anormal
	3	5→7-10 4→7,9,10				
C	2	2, 3, 6	>25-35%	2, 4, 8 células em estágio não específico	De categoria A mas com 1 célula bn no dia 2 ou 2 células bn no dia 3	≤50% das células com vacúolos grandes
	3	2,3→6-9				
		6→8-10				
		6, 11, 12				
D	2	3 (estágio não específico), >6	>35%	2, 4, 8 células em estágio não específico	Outro tipo de multinucleação	>50% das células com vacúolos, ou anormalidades citoplasmáticas severas
	3	3-5, 1 a mais em relação ao dia 2				

Embriões não classificados com uma probabilidade de implantação próxima de 0: ausencia de clivagem após 24h, >50% de fragmentação, vacúolos grandes em mais de 50% das células, embriões com mais que 2 anormalidades de categoria D

- Dia 4 (mórula): Neste estadio de desenvolvimento existe uma falta de parâmetros morfológicos que possam ser preditivos para a probabilidade de implantação. Apesar disso, são avaliados determinados critérios como o início da quarta ronda de divisões mitóticas (>8 blastómeros), a adesão, a compactação celular, fragmentação, presença de vacúolos e a cavitação intracelular (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação embrionária ao dia 4 de desenvolvimento. Adaptado de Saiz et al. 2018 <sup>115</sup>.

Dia 3	Características morfológicas ao dia 4	Dia 4
A	Cavitação inicial	A
	Compactação total e >8 células	
	Compactação parcial (1-2 células excluídas)	B
	Compactação parcial (>2 células excluídas)	C
	Ausencia de compactação (>8 células)	
B	Cavitação inicial	B
	Compactação total e >8 células	
	Compactação parcial (1-2 células excluídas)	
	Compactação parcial (>2 células excluídas)	C
	Ausencia de compactação (>8 células)	
C	Cavitação inicial	C
	Compactação total e >8 células	
	Compactação parcial	D
	Ausencia de compactação (>8 células)	
D	Qualquer característica	D
Embriões que mostrem qualquer uma das características seguintes ao dia 4: >35% de fragmentação; Vários vacúolos; <50% compactado; ≤8 células sem compactação		D

- Dia 5 e 6 (blastocisto): Na última fase de desenvolvimento é avaliado o grau de expansão do blastocélio, as características da trofoectoderme e da massa celular interna, dando-se maior importância à morfologia da trofoectoderme (Tabela 3).

Tabela 3. Classificação embrionária ao dia 5 de desenvolvimento. Adaptado de Saiz et al. 2018 <sup>115</sup>.

Dia 4	Dia 5						
	Grau de expansão	Massa de células interna			Trofoectoderme		Classificação final
		Tamanho (µm <sup>2</sup> )	Aspecto	Categoria	Descrição	Categoria	
Mórula compacta	Da expansão inicial à eclosão	3800-190	Compacta	A	Homogénea, coesiva, muitas células	A	A
					Homogénea, não muitas células	B	B
					Poucas células	C	C
					Degeneração	D	D
		3800-190	Solta	B	Homogénea, coesiva, muitas células	A	A
					Homogénea, não muitas células	B	B
					Poucas células	C	C
					Degeneração	D	D
		1900	Nenhuma das duas anteriores	C	Homogénea, coesiva, muitas células	A	A
					Homogénea, não muitas células	B	B
					Poucas células	C	C
					Degeneração	D	D
		Degeneração	Nenhuma das duas anteriores	D	Homogénea, coesiva, muitas células	A	D
					Homogénea, não muitas células	B	D
Poucas células	C				D		
Degeneração	D				D		
Blastocisto inicial ou cavitação (zona pelúcida espessa)							C
Mórula não compactada	Morula						D

## CAPÍTULO III

### **Componente de investigação**

# 1. Resumo

O conceito de cultura em grupo surgiu com o objetivo de melhorar as condições de cultura, apresentando benefícios, mas também prejuízos para o desenvolvimento embrionário. Para além disso, as taxas de fecundação podem ser um fator preditivo para o sucesso de um ciclo de PMA, sendo assim, ao melhorar as condições de fecundação, através da cultura em grupo, também se pode melhorar o sucesso dos ciclos. Este estudo teve como principal objetivo avaliar a influencia da cultura em grupo de oócitos após ICSI sobre as taxas de fecundação e de embriões utilizados. Complementarmente, também foi feita uma avaliação da interação das mesmas taxas com o tipo de cultura e outros fatores, como a qualidade espermática, o número de oócitos obtidos da punção folicular e ainda a idade materna. A partir dos resultados verificou-se que neste estudo a cultura em grupo não resultou em qualquer vantagem ou desvantagem, contudo, o tamanho de amostra pode ter sido reduzido. Numa perspetiva futura, existem outros fatores que devem ser estudados com potencial para influenciar as taxas de fecundação. Em caso de estudos com cultura em grupo é sugerida a utilização de placas de cultura que permitam a cultura em grupo e simultaneamente monitorização individual.

Palavras-chave: cultura em grupo; taxa de fecundação; taxa de embriões utilizados; qualidade espermática; número de oócitos recolhidos; idade materna

## 2. Abstract

The concept of group culture emerged with the aim of improving the culture conditions, presenting positive, but also negative influences over the embryonic development. Besides that, the fertilization rates can also be a predictive factor for the success of a MAP cycle, therefore, by improving the fertilization conditions, through group culture, it is also possible to improve the cycles success. In this study, the main goal was to evaluate the influence of group culture over the fertilization and the embryo utilization rates. In addition to that, it was made an evaluation of the interaction between the same rates with other factors, like the sperm parameters, the number of retrieved oocytes through follicular puncture and the maternal age. The results showed that group culture didn't bring any advantages or disadvantages, however, the sample sized may was too small. In a future perspective there are also other factors that should be studied with the potential to influence the fertilization rates, moreover, in case of group culture studies it is suggested the adoption of culture plates that allows simultaneously, group culture and individual monitorization.

Key-words: group culture; fertilization rate; embryo utilization rate; sperm quality; retrieved oocytes; maternal age.

### 3. Introdução

Atualmente existem diversas técnicas para enfrentar os problemas de infertilidade, e foi com o aumento da viabilidade *in vitro* dos gâmetas e embriões que surgiram novas técnicas de PMA. Entre essas novas técnicas estão a criopreservação de embriões e de gâmetas <sup>119</sup> e a microinjeção intracitoplasmática <sup>120</sup>. Apesar das condições *in vitro* terem melhorado ao ponto de prolongar o tempo de cultura dos embriões <sup>82</sup>, existe sempre a possibilidade de melhorar cada vez mais adotando novas estratégias, daí surgir o conceito de cultura em grupo.

Os primeiros estudos sobre o efeito da cultura em grupo de embriões utilizaram embriões de rato <sup>121,122</sup>, ovelha <sup>123</sup> ou de bovino <sup>124</sup>, demonstrando um efeito benéfico desta cultura sobre o desenvolvimento embrionário. Estes artigos, subsequentemente levaram ao estudo da cultura em grupo de embriões humanos, primeiramente descrita com efeitos positivos por Moessner e Dodson <sup>125</sup>. Neste estudo a cultura em grupo demonstrou melhorar as taxas de clivagem e qualidade embrionária, mas não o grau morfológico. Devido a estas vantagens é previsível que as taxas de implantação e gravidez também sejam melhoradas, sendo isto depois comprovado por outros estudos <sup>126,127</sup>. Por outro lado, alguns estudos não verificaram diferenças significativas nas taxas de implantação e gravidez entre a cultura individual e em grupo <sup>128-130</sup>. Contudo, na maioria destes estudos ocorreu uma maior viabilidade de embriões da cultura em grupo. Após estes resultados, um outro estudo com embriões humanos, verificou efeitos positivos da cultura em grupo na compactação, blastulação e qualidade embrionária <sup>127</sup>.

Ao longo dos tempos, tem sido discutido o motivo pelo qual poderá existir benefício da cultura em grupo de embriões, um destes motivos poderá ser a acumulação ou depleção de vários fatores no meio de cultura produzidos pelos próprios embriões <sup>131,132</sup>. Stoddart et al. identificaram um fator produzido por embriões de rato que estimula o desenvolvimento embrionário, o fator de ativação plaquetária, podendo este ser um dos fatores do qual a cultura em grupo beneficia <sup>121</sup>.

Porém, também é inferido um efeito negativo da cultura em grupo de embriões. Lane e Gardner <sup>133,134</sup> descreveram a influência negativa da presença de amônio no meio de cultura para o desenvolvimento de blastocistos de rato, sendo um exemplo de como a acumulação de produtos tóxicos libertados para o meio pelos embriões pode prejudicar o seu desenvolvimento. Outro exemplo, são os radicais livres derivados de oxigênio <sup>135</sup>. Para além disso, Salahuddin et al. sugeriu que células degeneradas ou oócitos não fertilizados podem libertar fatores que afetam de forma negativa o desenvolvimento dos

embriões normais, sendo assim, o agrupamento destes pode levar a uma qualidade embrionária indesejável <sup>136</sup>.

Apesar da variedade existente nos resultados dos estudos deste tema, a origem dela pode dever-se às diferentes condições de cultura, como volume de incubação, densidade do número de embriões, diferentes períodos de agrupamento e diferentes estágios embrionários <sup>137</sup>.

Contudo, a cultura em grupo de embriões pode não ser vantajosa quando se pretende monitorizar o desenvolvimento dos embriões, com informação de estágios iniciais, para posterior seleção de um embrião com finalidade de transferência <sup>131</sup>. Devido a esta desvantagem e ao facto da cultura em grupo poder trazer benefício para o desenvolvimento embrionário, surgiram novos sistemas de cultura. Um deles foi o Sistema WOW (*Well-of-the-well*), em que consiste no uso de placas de cultura convencionais e nas quais são feitos micropoços para cada embrião <sup>138</sup>. Consequentemente, têm sido disponibilizadas comercialmente novas placas de cultura que permitem cultura em grupo com possível monitorização individual dos embriões <sup>139</sup>.

Neste estudo, pretendeu-se estudar principalmente a influencia da cultura em grupo de oócitos após ICSI sobre as taxas de fecundação. Se existir influencia positiva e com o facto de as taxas de fecundação poderem ter um grande potencial como fator preditivo dos resultados de um ciclo de tratamento com ICSI, pode surgir uma nova condição de melhoramento para as condições de fecundação. De forma complementar também foi estudada a influencia desta cultura em grupo sobre as taxas de utilização de embriões (vitricificação ou transferência). Finalmente, foi pretendido analisar se a cultura em grupo traria vantagens ou desvantagens nas taxas acima referidas perante os diferentes grupos de qualidade espermática, idade materna e número de oócitos recolhidos.

## 4. Material e métodos

O estudo desenvolvido teve como foco analisar o efeito da cultura em grupo de oócitos após ICSI sobre as taxas de fecundação, assim como no subsequente desenvolvimento embrionário e na taxa de embriões utilizados, caso ocorresse fecundação, ou seja, presença de 2 pronúcleos e 2 glóbulos polares. Para isso, e em função de se obter informação sustentada sobre o tema a ser estudado, foi realizada uma pesquisa bibliográfica no PubMed, *Group Embryo Culture/embryo density*. Os artigos resultantes da pesquisa foram analisados e selecionados segundo a utilização de embriões de mamíferos, especialmente embriões humanos, e deles foi recolhida informação pertinente para a realização deste estudo. Para além disso, foi analisada e servida como base uma revisão, na qual são apresentadas sugestões de cultura em grupo (Reed, 2012).

Para a realização prática deste estudo foram selecionados casais cujos ciclos incluíam procedimento de microinjeção intracitoplasmática entre novembro de 2021 a julho de 2022 no CHUSJ. Contudo, nem todos estes ciclos foram selecionados, uma vez que foi estabelecido um mínimo de 7 oócitos em metáfase II, obtidos da punção folicular, para se poder ter número suficiente e equilibrado de oócitos após ICSI para cultura em grupo e individual num mesmo ciclo. Para além disso, não foram selecionados casos de espermatozoides provenientes de biópsia testicular para não introduzir mais fatores que possam interferir com as variáveis em estudo.

Em preparação para a punção folicular foram prescritos a cada paciente dos ciclos selecionados um protocolo de estimulação ovárica com antagonistas da Hormona Libertadora de Gonadotrofinas (GnRH) ou com agonistas da GnRH (protocolo longo), dependendo de cada caso.

Os oócitos colhidos foram desnudados 3,5h após a punção através da incubação dos complexos *cumulus*-oócitos num meio com hialuronidase, seguida de aspiração dos complexos com uma pipeta de 155µl. Subsequentemente, foi realizada a microinjeção-intracitoplasmática num microscópio invertido com placa aquecida. Em cada ciclo os oócitos injetados foram cultivados em grupos de 4 (para a cultura em grupo) e individualmente (para a cultura individual), em placas de cultura convencionais de 60mm com a ajuda de uma micropipeta automática calibrada (Fig. 21; Tabela 5 em anexo). Para esquematização das placas foi tida em conta alguma informação proveniente do artigo de Reed (Reed, 2012), como o volume de meio de cultura e o número de oócitos após ICSI para a cultura em grupo (é sugerido 3/4 embriões por gota de 50µl).

Importante referir que as micropipetas automáticas utilizadas eram calibradas de acordo com a lei em vigor e que os operadores estariam devidamente validados pelo laboratório.

Adicionalmente, o sistema de meio de cultura que foi usado neste estudo para os embriões foi um sistema de meio sequencial.

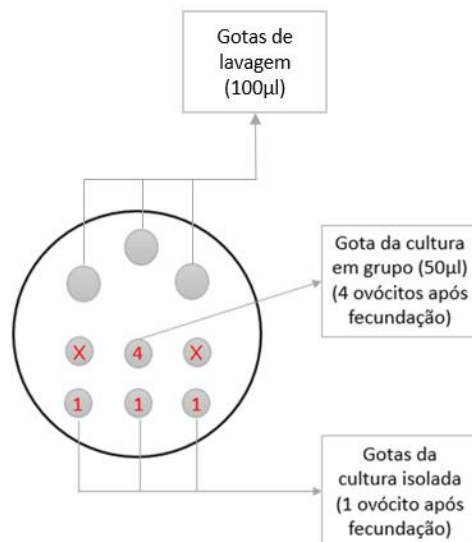


Figura 21. Organização de placas de cultura após microinjeção-intracitoplasmática de espermatozoides. Placas com máximo de 7 oócitos, na qual 4 estão cultivados em grupo na mesma gota e 3 cultivados de forma isolada/individual em gotas diferente. Tanto as gotas de cultura em grupo e isolada são gotas de 50µl de meio.

As amostras seminais foram provenientes de ejaculado a fresco ou congelado. Os espermatozoides foram submetidos a gradientes de densidade (40% e 80%) e swim-up, antes de se realizar a ICSI.

Após incubação entre 16-20h (a 37°C em 6% de CO<sub>2</sub>) foi avaliada a presença de 2 pronúcleos e de 2 glóbulos polares, e os oócitos que os apresentaram foram todos de seguida cultivados de forma individualizada, ou seja, 1 em cada gota de meio de cultura. Em todos os dias seguintes do desenvolvimento foi avaliada a qualidade embrionária segundo a Sociedade Espanhola dos Estudos da Biologia da Reprodução (ASEBIR) (Saiz et al., 2018), exceto para os casos de PGT, onde só foi avaliada ao 3º e 5º dia de desenvolvimento. Segundo a qualidade dos embriões estes foram posteriormente selecionados para transferência, vitrificação ou para biopsia embrionária (quando em ciclo de PGT). Em casos de ciclos de ICSI onde ocorreu transferência embrionária, esta ocorreu ao 2º, 3º ou 5º dia de desenvolvimento, enquanto para os casos de PGT, todos

os embriões foram mantidos em cultura até ao 5º dia de desenvolvimento, sendo biopsados e vitrificados os embriões que apresentavam qualidade para tal.

Terminando cada ciclo, foi recolhida a informação pertinente para a análise estatística. Nesta análise foram verificadas as diferenças estatisticamente significativas ( $\alpha < 0.05$ ) das taxas de fecundação de oócitos e de utilização de embriões entre oócitos após ICSI cultivados em grupo e individualmente utilizando o teste Mann-Whitney através do software SPSS. Auxiliariamente, também foi estudada a influencia de outros fatores sobre as taxas em estudo da cultura em grupo e da individual, como a qualidade espermática, idade da mulher e o número de oócitos colhidos da punção folicular. Para análise do fator da qualidade espermática foram criados dois grupos, um grupo de qualidade normal e outro de qualidade alterada (presença de uma, duas ou três das anomalias segundo a WHO<sup>64</sup>: oligozoospermia, astenozoospermia e teratozoospermia). Enquanto foram divididos em 4 grupos o fator idade da mulher (<30; 31-34; 35-37; 38-40) e número de oócitos colhidos da punção folicular (7-11; 12-16; 17-24; >25). Para esta última análise foi adotado o teste Kruskal-Wallis.

## 5. Resultados

Este estudo inclui 67 ciclos, que resultaram num total de 947 oócitos obtidos das punções foliculares e desses 784 eram maduros, ou seja, encontravam-se em estado de metáfase II (Tabela 4). A realização do procedimento de ICSI foi estabelecida nesses mesmos oócitos maduros. Na execução do objetivo principal deste estudo foram determinadas as taxas de fecundação e as taxas de embriões utilizados de cada ciclo de PMA. Cada taxa de fecundação consiste na percentagem de oócitos de um ciclo que no momento da análise da fecundação apresentavam 2 pró-núcleos e 2 glóbulos polares em relação ao total de oócitos microinjectados em metáfase II. Já a taxa de embriões utilizados corresponde à percentagem de embriões que foram vitrificados e transferidos em relação ao número de oócitos fecundados. Por cada ciclo foram determinadas duas taxas de fecundação e duas taxas de embriões utilizados (cultura em grupo e individual) para que se pudesse realizar a comparação entre as duas culturas. Na determinação das taxas de embriões utilizados verificou-se uma grande diferença no número total de embriões que foram transferidos e nos que foram vitrificados (Tabela 4).

Tabela 4. Informação recolhida dos ciclos incluídos neste estudo consoante o tipo de cultura (cultura individual ou em grupo).

	Cultura Individual	Cultura em Grupo	Total
<b>Nº de ciclos (n)</b>	67	67	67
<b>Idade materna</b>	-	-	35 ± 3.8 (mediana)
<b>Idade paterna</b>	-	-	36 ± 5.5 (mediana)
<b>Nº de oócitos recolhidos</b>	-	-	947
<b>Nº de oócitos maduros</b>	383	392	784
<b>Nº de oócitos fecundados (2PN e 2GP)</b>	239	247	486
<b>Taxa de fecundação (mediana)</b>	66.7 ± 24.1	75 ± 27	66.7 ± 25.7
<b>Nº de embriões transferidos</b>	19	19	38
<b>Nº de embriões vitrificados</b>	69	62	131
<b>Taxa de embriões utilizados (mediana)</b>	33.3 ± 33.1	33.3 ± 31.8	33.3 ± 32.4

2PN: 2 pronúcleos  
2GP: 2 glóbulos polares

Em termos de medianas, as medianas das taxas de fecundação e de embriões utilizados não diferiram muito entre a cultura individual e em grupo (Tabela 4). Apesar disso, nos ciclos incluídos ocorreu uma grande variação de valores de taxa de fecundação e de embriões utilizados, apresentando taxas nulas e de 100% (Fig. 22 e 23). Dos ciclos apresentados, a taxa de fecundação da cultura em grupo apresentou uma grande

concentração entre os 71-80%, enquanto na cultura individual houve uma grande discrepância de valores (Fig. 22, G e I). Já nas taxas de embriões utilizados as variações dos valores foram semelhantes na cultura em grupo e individual, havendo uma maior concentração entre os 0-10% (Fig. 23, G e I).

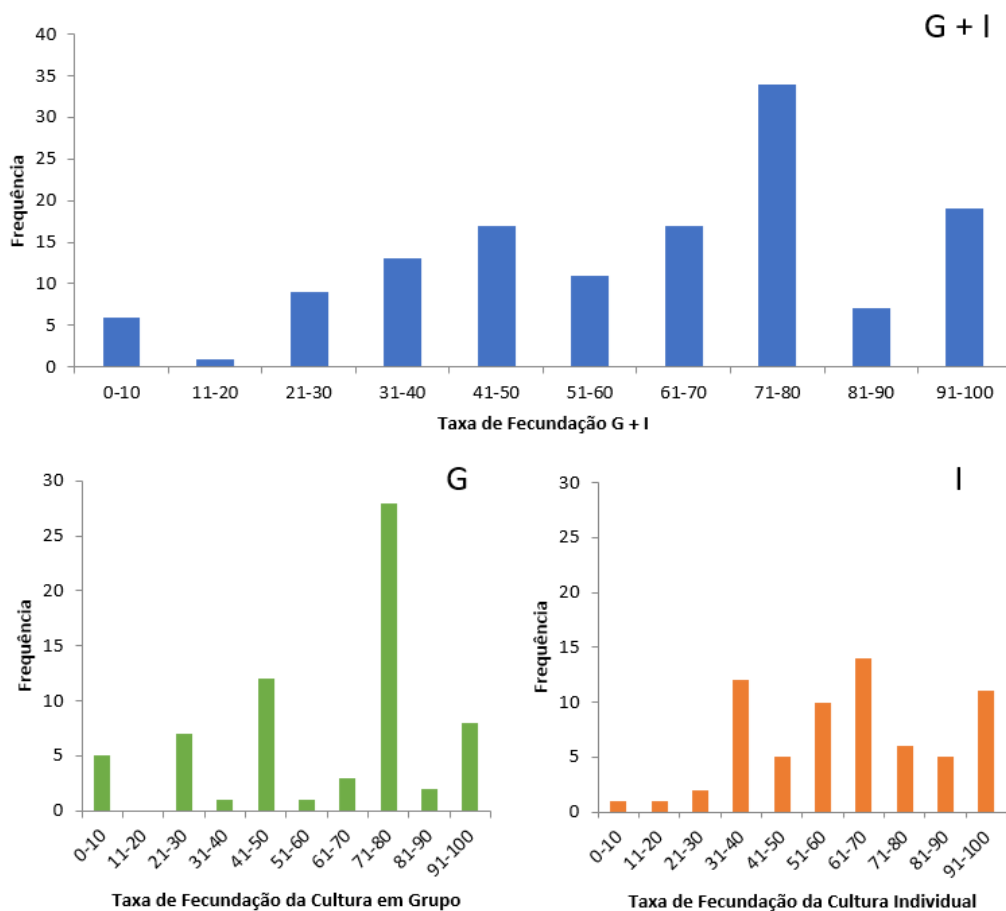


Figura 22. Histogramas da frequência das taxas de fecundação (%) da cultura em grupo(G) e da cultura individual(I) em conjunto (G + I) e de forma separada.

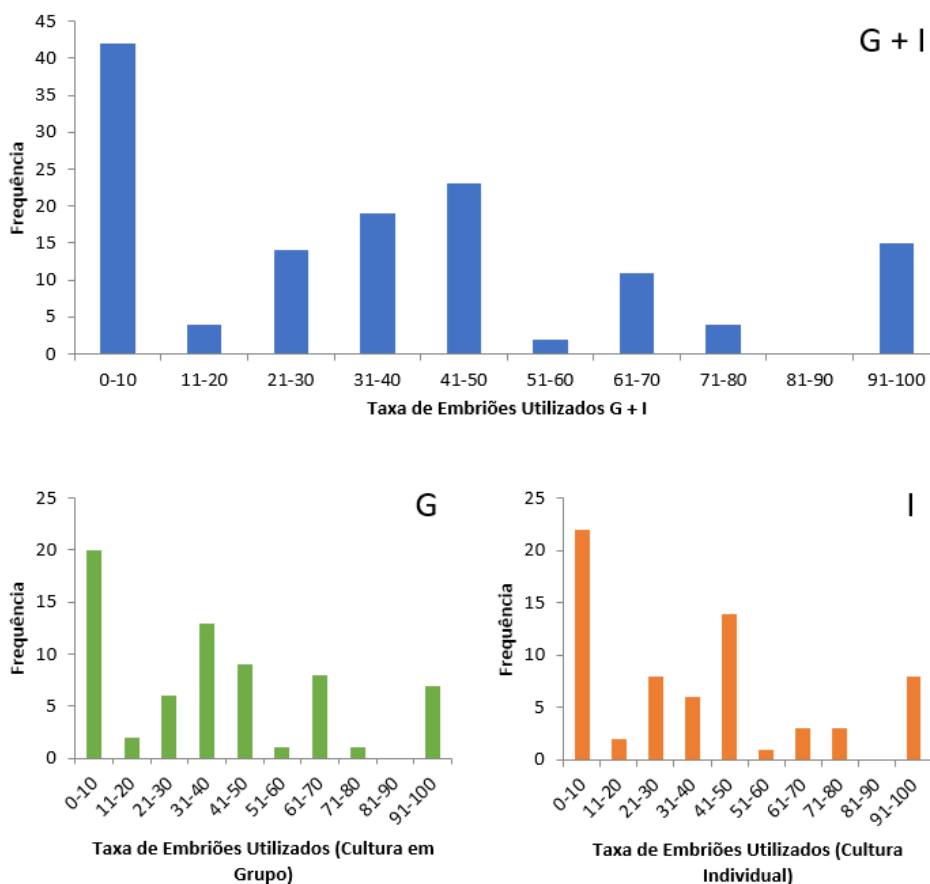


Figura 23. Histogramas da frequência das taxas de embriões utilizados (%) da cultura em grupo(G) e da cultura individual(I) em conjunto (G + I) e de forma separada.

Na tentativa de verificar as diferenças significativas das taxas de fecundação e de embriões utilizados entre os diferentes grupos de cada fator a ser avaliado, iniciou-se uma avaliação da normalidade da distribuição dos dados. Da avaliação feita pelo teste de Shapiro-wilk os resultados não seguiam essa distribuição (Fig. 22 e 23), sendo necessário a adoção de um teste não paramétrico para avaliar as diferenças existentes. Desta forma, foi utilizado o teste Mann-Whitney (quando na comparação de 2 grupos) e o teste Kruskal-Wallis (quando na comparação de mais que 2 grupos), para testar as diferenças significativas entre as taxas em estudo.

Da comparação das medianas das taxas de fecundação entre a cultura em grupo e individual apenas se verificou uma diferença de aproximadamente 8% (Fig. 24, Tabela 4). E depois de realizado o teste de Mann-Whitney, o p-value foi superior a 0.05 (p-value=0.77) o que leva à anulação da hipótese de que existe diferença significativa das taxas de fecundação entre a cultura em grupo e individual.

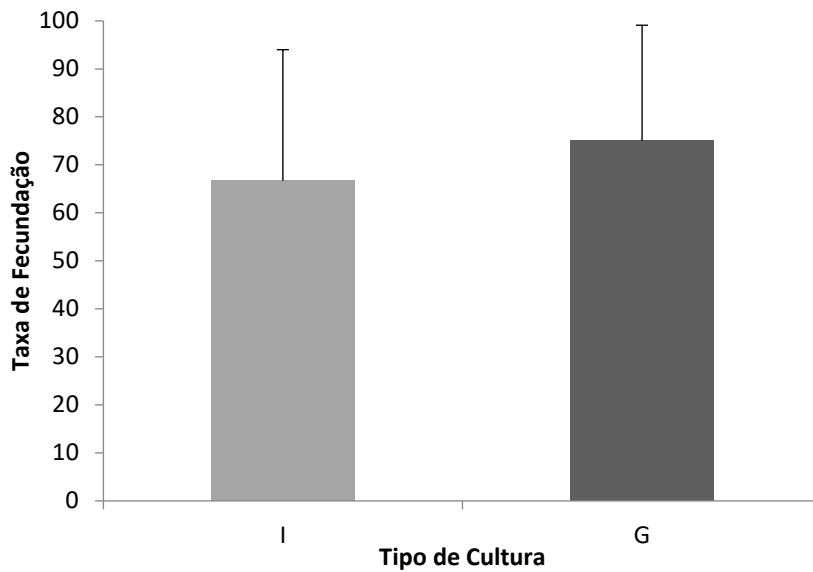


Figura 24. Mediana das taxas de fecundação (%) da cultura individual (I) e da cultura em grupo (G) e respetivos desvios padrão. Do teste de Mann-Whitney  $p\text{-value} = 0.77 > 0.05$ , não existindo diferenças significativas entre as taxas de fecundação da cultura individual e da cultura em grupo.

Já na comparação das taxas de embriões utilizados entre estas duas culturas verificou-se uma mediana igual entre ambas as culturas, 33.3% (Fig. 25, Tabela 4). Sendo assim, segundo o teste de Mann-Whitney, o valor de  $\alpha$  foi superior a 0.05 ( $p\text{-value}=0.86$ ) o que leva à anulação da hipótese de que existe diferença significativa entre as taxas de embriões utilizados da cultura em grupo e individual.

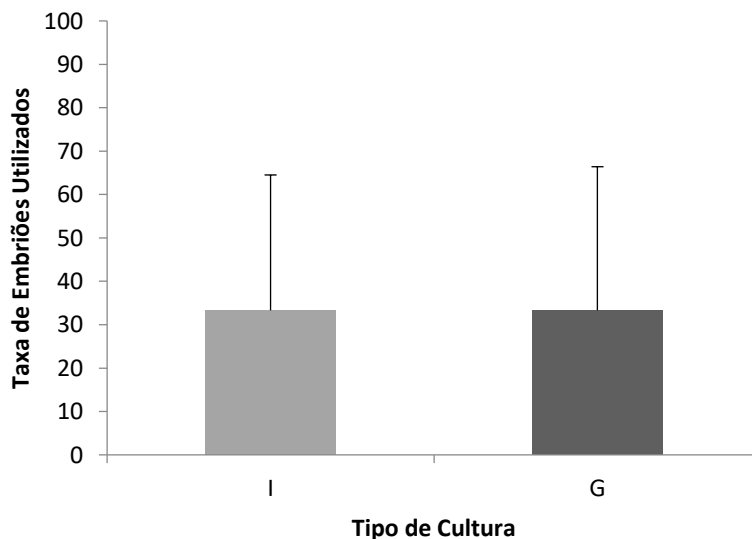


Figura 25. Mediana das taxas de embriões utilizados (%) da cultura individual (I) e da cultura em grupo (G) e respetivos desvios padrão. Do teste de Mann-Whitney  $p\text{-value} = 0.86 > 0.05$ , não existindo diferenças significativas entre as taxas de embriões utilizados da cultura individual e da cultura em grupo.

Para além desta análise foi estudada a influencia da cultura em grupo sobre as taxas em estudo perante os diferentes grupos de qualidade espermática, idade materna e número de oócitos recolhidos.

Quanto à qualidade espermática, verificou-se que as medianas das taxas de fecundação entre todos os grupos foram próximas (Fig. 26, a), verificando-se o mesmo nas taxas de embriões utilizados (Fig. 26, b). Como resultado do teste de Kruskal-Wallis não se verificou diferenças significativas da comparação entre os diferentes grupos tanto nas taxas de fecundação como nas taxas de embriões utilizados ( $p\text{-value} > 0.05$ ).

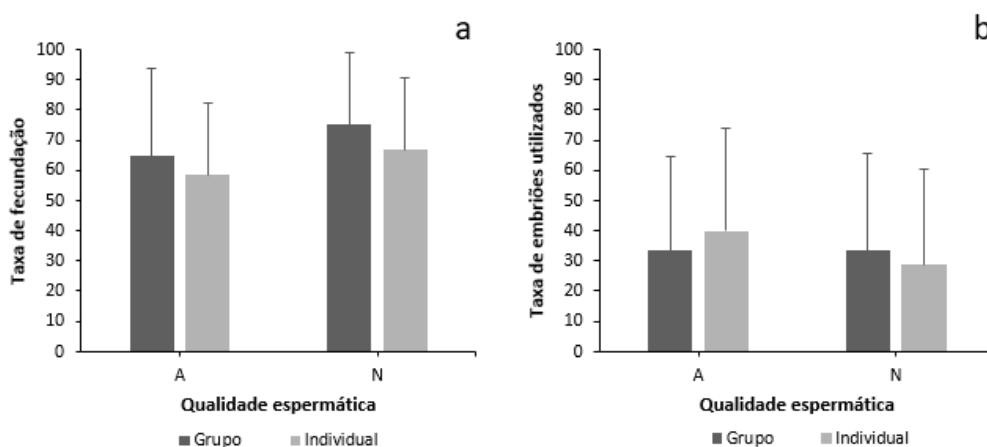


Figura 26. Comparação do efeito da qualidade espermática nas taxas de fecundação (a) e de embriões utilizados (b) da cultura em grupo e da cultura individual. Os valores de cada grupo estão representados com as medianas e os seus respetivos desvios padrões. Através do teste Kruskal-Wallis não se verificou diferenças significativas entre os diferentes grupos ( $p\text{-value}>0.05$ ). (A) anormal/alterada; (N) normal.

Na idade materna, as taxas de fecundação foram muito semelhantes na cultura em grupo dos diferentes grupos de idade, acontecendo o mesmo na cultura individual (Fig. 27, a). Além disso, as taxas de fecundação da cultura em grupo foram superiores às da cultura individual nos diferentes grupos de idades exceto no grupo de idades 31-34. Já nas taxas de embriões utilizados ocorreu uma estabilidade de valores na cultura em grupo dos diferentes grupos de idade e maiores flutuações na cultura individual (Fig. 27, b). Contudo, nas duas taxas em estudo não se verificou diferenças estatisticamente significativas entre os vários grupos ( $p\text{-value} > 0.05$ ).

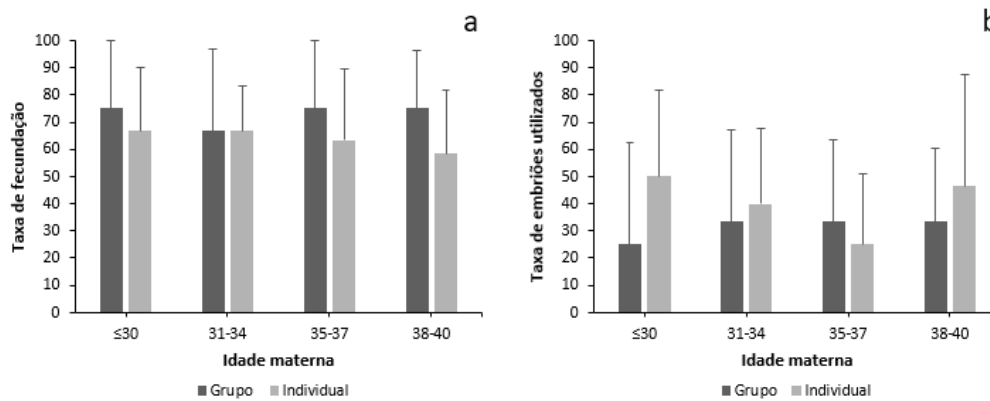


Figura 27. Comparação do efeito da idade materna nas taxas de fecundação (a) e de embriões utilizados (b) da cultura em grupo e da cultura individual. Os valores de cada grupo estão representados com as medianas e os seus respetivos desvios padrões. Através do teste Kruskal-Wallis não se verificou diferenças significativas entre os diferentes grupos ( $p$ -value > 0.05).

Por último, foi analisado o efeito do número de oócitos recolhidos das punções foliculares nas taxas de fecundação e de embriões utilizados da cultura em grupo e individual. Nas taxas de fecundação verificou-se que entre os diferentes grupos de nº de oócitos as taxas foram muito estáveis na cultura em grupo, mas também na cultura individual (Fig. 28, a). A maior diferença verificada foi entre a cultura em grupo e a individual nos casos de nº de oócitos 16-24, não havendo grande diferença nos outros grupos de nº de oócitos (Fig. 28, a). Quanto às taxas de embriões utilizados, novamente, a cultura em grupo nos diferentes grupos de nº de oócitos permaneceu estável, no entanto, a maior diferença verificada foi entre a cultura em grupo e a individual nos casos de nº de oócitos  $\geq 25$  (Fig. 28, b). Depois de utilizado o teste estatístico de Kurskal-Wallis concluiu-se que nas duas taxas em estudo não se verificou diferenças significativas entre os diferentes grupos ( $p$ -value > 0.05).

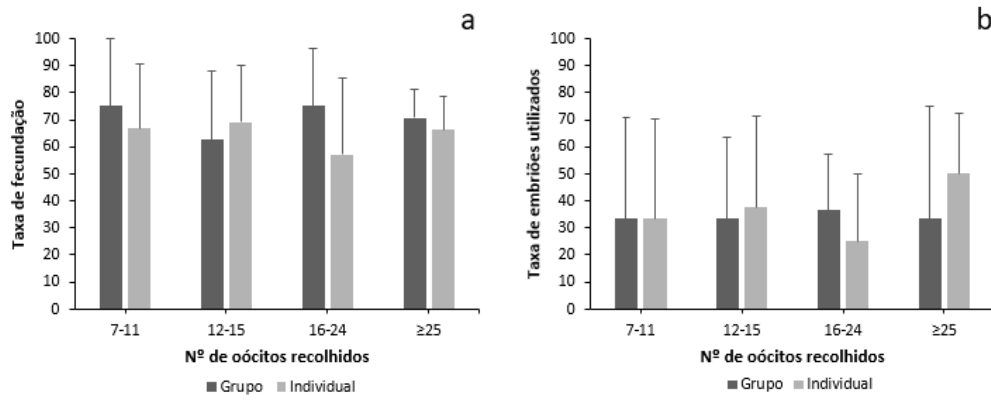


Figura 28. Comparação do efeito do nº de oócitos recolhidos nas taxas de fecundação (a) e de embriões utilizados (b) da cultura em grupo e da cultura individual. Os valores de cada grupo estão representados com as medianas e os seus respetivos desvios padrões. Através do teste Kruskal-Wallis não se verificou diferenças significativas entre os diferentes grupos (p-value>0.05).

## 6. Discussão

No desenvolvimento embrionário os embriões segregam vários fatores de crescimento que podem ter uma ação reduzida em condições *in vitro* devido à diluição provocada pelas quantidades de meio de cultura utilizadas, o que não acontece no trato genital feminino pelas quantidades reduzidas de fluido <sup>82</sup>. No sentido de solucionar esta ação reduzida surgiu a cultura em grupo, a diminuição de meio utilizado ou a suplementação do meio com fatores de crescimento <sup>82</sup>.

A cultura em grupo de embriões foi descrita por vários autores, onde se anunciou os benefícios, mas também os seus efeitos prejudiciais no desenvolvimento embrionário <sup>125-127,133,134</sup>. Tendo em conta os benefícios da cultura em grupo, neste estudo teve-se como objetivo estudar o efeito da mesma sobre a taxa de fecundação de oócitos após ICSI. Scaravelli et al. demonstraram que a taxa de fecundação pode ser uma nova ferramenta para prever os resultados de um ciclo de FIV <sup>140</sup>. Englobando e convergindo estas informações, partimos do princípio de que um ciclo com melhor taxa de fecundação também irá apresentar melhores resultados no final, sendo assim, se as condições de fecundação forem aprimoradas, como beneficiar da cultura em grupo de oócitos após ICSI, podemos ter melhores resultados num ciclo de FIV. Adicionalmente, a cultura em grupo dos oócitos após ICSI também pode acarretar benefícios a nível de qualidade embrionária, sendo que esta cultura já foi anteriormente associada a esse benefício <sup>125</sup>, o que subsequentemente provoca um aumento nas taxas de embriões utilizados.

Com os resultados deste estudo verificou-se ausência de diferença significativa entre as taxas de fecundação de oócitos após ICSI em cultura em grupo e individualizados e também nas taxas de utilização dos mesmos. Apesar dos resultados apresentados, a ausência de influência da cultura em grupo pode ser justificada pelo tempo de exposição reduzido (16-20h), mas também pelo pequeno tamanho de amostra que pode levar a uma interpretação enviesada da influência. Na maioria dos estudos do efeito da cultura em grupo anteriormente desenvolvidos, o período de exposição em grupo foi superior, permitindo a atuação dos fatores libertados pelos embriões, o que pode não ter acontecido neste estudo. Um dos objetivos do estudo aqui presente era avaliar o efeito da cultura em grupo, durante o período entre o procedimento de microinjeção e avaliação da fecundação (16-20h), sobre as taxas de fecundação e de embriões utilizados o que foi motivo para não aumentar o tempo de exposição a essa cultura. Suplementarmente, ocorreu a necessidade de seleção dos embriões para transferência

embrionária exigindo uma monitorização individual dos mesmos após avaliação da fecundação, não permitindo cultura em grupo após esta etapa.

Um outro estudo com o objetivo de avaliar fatores que afetam as taxas de fecundação também avaliou o efeito da cultura em grupo dando também em ausência de diferença significativa entre cultura de oócitos em grupo e individual <sup>141</sup>. Para além disso, esse mesmo estudo detetou que os principais fatores que podem afetar as taxas de fecundação num procedimento de ICSI são os operadores e a motilidade dos espermatozoides <sup>141</sup>. Contudo, por vezes, uma redução nestas taxas pode ser justificada pela qualidade dos espermatozoides da amostra e que consequentemente são injetados, da disfunção oocitária, falha na ativação oocitária, e à incapacidade do oócito para descondensar e processar o espermatozoide <sup>142</sup>. Sendo assim, com o estudo de Shen et al. (2003), de Javed e Michael (2012) e o estudo aqui apresentado podemos afirmar que existem outros fatores, para além da cultura em grupo, que podem ter um papel mais importante no melhoramento das condições de fecundação sendo um bom motivo para estudos futuros.

Na pesquisa bibliográfica sobre a cultura em grupo ocorreu alguma dificuldade uma vez que foi bem visível uma ausência de artigos recentes que abordassem o tema. Esta ausência provavelmente tem origem no surgimento e aumento de ciclos com necessidade de biópsia embrionária para teste genético pré-implantação (PGT), do uso da tecnologia timelapse e também porque esta cultura pode exigir ao laboratório a adoção de novas placas de cultura que permitam a proximidade dos embriões e monitorização individual. Vajta et al. surgiram com um sistema para a cultura em grupo, o sistema WOW <sup>138</sup>, que não exige a encomenda de novas placas de cultura, contudo, a realização dos micropoços nas placas de cultura convencionais leva a consumo de tempo, o que não é benéfico para ambiente clínico. Quando em ciclos de biópsia embrionária ocorre uma necessidade após a avaliação da fecundação para classificar e consequentemente selecionar embriões para biópsia, mas também existe o risco de 2 embriões eclodidos fundirem <sup>143</sup>.

Villani et al. confirmaram uma relação direta entre os parâmetros espermáticos e as taxas de fertilização, havendo um maior peso da morfologia dos espermatozoides num procedimento de ICSI <sup>144</sup>. Apesar disso, neste estudo em nenhuma das culturas, em grupo ou individual, houve influência da qualidade espermática sobre as taxas de fecundação. Para além disso, um estudo demonstrou que a qualidade embrionária é afetada pela qualidade espermática <sup>145</sup>, sendo assim, assume-se que em caso de má qualidade espermática existe uma menor disponibilidade de embriões para

transferência e/ou vitrificação. Efeito este que não aconteceu tanto na cultura em grupo como na cultura individual do estudo aqui apresentado.

Um outro fator analisado foi o efeito da idade materna. O impacto deste fator no sucesso de um ciclo de PMA já é bem reconhecido, havendo um efeito negativo na expressão de genes envolvidos na regulação do ciclo celular em oócitos em metáfase II, o que poderá afetar a fecundação <sup>146</sup>. No entanto, existem estudos anteriores onde não ocorreu influencia deste fator sobre as taxas de fecundação <sup>147-150</sup>. Para além do mais, a redução da qualidade dos oócitos com a idade materna <sup>151</sup> pode prejudicar a qualidade embrionária e conseqüentemente o número de embriões com qualidade para serem transferidos ou vitrificados. Apesar disso, um estudo demonstrou ausência de deterioração na qualidade embrionária com a idade materna <sup>152</sup>. Segundo estas informações torna-se incerto o efeito da idade materna nas taxas de fecundação e de embriões utilizados, no entanto, neste estudo não se verificou efeito deste fator, concluindo-se que a cultura em grupo dos oócitos após ICSI não apresenta qualquer vantagem nessas mesmas taxas com o aumento da idade materna.

Por último, também não foi comprovada a influencia do número de oócitos recolhidos da punção folicular nas taxas de fecundação e de embriões utilizados da cultura em grupo e da individual. Em contrapartida, Hsu et al. demonstrou que um maior número de oócitos obtidos resulta numa menor taxa de fecundação, mas é onde existe maior disponibilidade de embriões de boa qualidade e para vitrificação <sup>153</sup>.

Dos resultados deste artigo pode-se concluir que a cultura em grupo de oócitos após ICSI não influencia as taxas de fecundação, mas é preferível manter os oócitos individualizados, uma vez que Salahuddin et al. afirmou que oócitos não fecundados podem libertar fatores que afetam o desenvolvimento de oócitos fertilizados/embriões <sup>136</sup>. De forma adicional, este estudo também sugere que apenas o período entre o procedimento de microinjeção e avaliação da fecundação (16-20h) não influencia a taxa de embriões utilizáveis, contudo, não permite inferir se um período mais extenso de cultura em grupo influencia esta taxa.

Como última conclusão deste estudo, a cultura em grupo não apresentou qualquer vantagem nas taxas em estudo perante os diferentes grupos de qualidade espermática, idade materna e número de oócitos recolhidos.

Num futuro estudo em ambiente clínico, de forma a ser avaliado se períodos mais longos da cultura em grupo influenciam as taxas de embriões utilizados, a utilização de novas placas de cultura que permitam a cultura em grupo e simultaneamente a monitorização

individual dos embriões durante o seu desenvolvimento seria uma boa opção. De forma complementar, é aconselhado para futuros estudos uma melhor uniformização perante os ciclos incluídos, como a finalização de todos os ciclos no mesmo estágio de desenvolvimento, para uma avaliação mais fidedigna das taxas de embriões utilizados, mas também para introduzir uma avaliação da qualidade embrionária em condições de cultura em grupo.



## Conclusões do estágio

De uma forma resumida, este estágio permitiu-me acompanhar todos os processos existentes num ciclo de PMA, ou seja, desde a recolha de gâmetas até à transferência embrionária, mas também analisar todos os parâmetros existentes num centro de PMA público (CHUSJ). Para além do mais, foi possível acompanhar ciclos de PGT, tendo a possibilidade de seguir os processos e dinâmica no momento das biópsias embrionárias, assim como mais tarde no momento de desvitrificação e transferência de embriões saudáveis.

Para além do acompanhamento consegui observar e interpretar a atitude crítica necessária num embriologista para avaliar as diversas condições expostas num ciclo de PMA, como alguns exemplos: a idade do casal, os anos de infertilidade, o histórico de ciclos realizados pelo casal, a qualidade espermática e dos oócitos. Dessa forma, cada ciclo deve ser analisado e avaliado de forma individual para ser executada a melhor decisão para o casal, por exemplo na decisão entre um procedimento de FIV convencional e de ICSI, mas também na avaliação da qualidade embrionária, na decisão do dia de desenvolvimento para transferência, assim como na seleção de embriões para transferência, vitrificação ou desvitrificação.

Num laboratório de embriologia existem diversos fatores que podem afetar a qualidade embrionária assim como as taxas de sucesso das técnicas PMA, desde a condições de meio de cultura a fatores que envolvam a dinâmica do laboratório. Deste modo, é importante a consideração de todos os fatores existentes no momento da tomada de decisões. Para além disso, segundo a bibliografia é possível concluir que por vezes as condições adequadas para um laboratório de embriologia podem não ser as melhores para outros, sendo assim, cada laboratório deve encontrar e adotar as melhores condições para aumentar e manter as suas melhores taxas de sucesso.

Apesar da existência do consenso de Istambul, o qual permitiu o estabelecimento de regras/características obrigatórias para uma classificação embrionária, durante o processo de desenvolvimento do projeto de investigação deparei-me com a necessidade para uma melhor uniformização do sistema de classificação embrionária entre centros de PMA e de estudos no tema, para se poder facilitar a comparação de resultados de qualidade embrionária. O sistema de classificação da ASEBIR foi aquele em que foquei o meu estudo, uma vez que é usado na unidade de PMA do CHUSJ. Com este estudo percebi que a adoção deste sistema de classificação poderá ser uma boa opção uma vez que consiste numa classificação alfabética, o que, em condições

clínicas, pode trazer a vantagem de uma melhor perceção dos casais pela qualidade embrionária.

Através do projeto de investigação foi possível alargar os meus conhecimentos na área da embriologia, assim como perceber o nível de investigação para o melhoramento das condições de cultura dos embriões e oócitos. Para além do mais, falando especificamente da cultura em grupo de oócitos após ICSI, foi possível concluir que neste estudo a cultura em grupo não trouxe vantagens para as taxas de fecundação e de embriões utilizados. Sendo assim, também se chegou à conclusão que existem outros fatores da cultura que podem ter um papel mais importante nas taxas de fecundação em relação à cultura em grupo.

Finalizando, sinto que este estágio permitiu-me desenvolver um sólido conhecimento das técnicas de PMA, assim como deu-me a conhecer o ambiente que é proporcionado. Deste modo, com o treino que tenho em algumas técnicas, com a familiarização do ambiente e pelo gosto aumentado na área sinto que estou preparado para continuar o meu percurso na mesma.



## Referências Bibliográficas

1. Howards S. *Moments in Reproductive Medicine Antoine van Leeuwenhoek and the Discovery of Sperm*. Vol 67.; 1997.
2. JOHNSTON DR. The history of human infertilit. *Fertil Steril*. 1963;14(3):261-272. doi:10.1016/s0015-0282(16)34860-9
3. Foote RH. The history of artificial insemination: Selected notes and notables1. *J Anim Sci*. 2002;80(E-suppl\_2):1-10. doi:10.2527/animalsci2002.80E-Suppl\_21a
4. Hezavehei M, Sharafi M, Kouchesfahani HM, et al. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reprod Biomed Online*. 2018;37(3):327-339. doi:10.1016/j.rbmo.2018.05.012
5. Sharma RS, Saxena R, Singh R. Infertility & assisted reproduction: A historical & modern scientific perspective. *Indian Journal of Medical Research*. 2018;148(7):10-14. doi:10.4103/ijmr.IJMR\_636\_18
6. Curry M. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev Reprod*. 2000;5(1):46-52. doi:10.1530/ror.0.0050046
7. POLGE C, SMITH AU, PARKES AS. Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. *Nature*. 1949;164(4172):666-666. doi:10.1038/164666a0
8. Eskew AM, Jungheim ES. A History of Developments to Improve *in vitro* Fertilization. *Mo Med*. 2017;114(3):156-159.
9. Brinsden PR, Brinsden PR. Thirty years of IVF: the legacy of Patrick Steptoe and Robert Edwards. *Hum Fertil (Camb)*. 2009;12(3):137-143. doi:10.1080/14647270903176773
10. Steinbock B. *Part of the Ethics and Political Philosophy Commons Recommended Citation Recommended Citation THE MOUNT SINAI*. Vol 71.; 2004. [https://scholarsarchive.library.albany.edu/cas\\_philosophy\\_scholar](https://scholarsarchive.library.albany.edu/cas_philosophy_scholar)
11. Chen C. PREGNANCY AFTER HUMAN OOCYTE CRYOPRESERVATION. *The Lancet*. 1986;327(8486):884-886. doi:10.1016/S0140-6736(86)90989-X
12. Lanzendorf SE, Maloney MK, Veeck LL, Slusser J, Hodgen GD, Rosenwaks Z. A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human

- spermatozoa into human oocytes. *Fertil Steril*. 1988;49(5):835-842. doi:10.1016/S0015-0282(16)59893-8
13. Rosenwaks Z, Pereira N. The pioneering of intracytoplasmic sperm injection: historical perspectives. *Reproduction*. 2017;154(6):F71-F77. doi:10.1530/REP-17-0308
  14. Hammadeh ME, Fischer-Hammadeh C, Ali KR. Assisted hatching in assisted reproduction: A state of the art. *J Assist Reprod Genet*. 2011;28(2):119-128. doi:10.1007/s10815-010-9495-3
  15. Parikh FR, Athalye AS, Naik NJ, Naik DJ, Sanap RR, Madon PF. Preimplantation genetic testing: Its evolution, where are we today? *J Hum Reprod Sci*. 2018;11(4):306-314. doi:10.4103/jhrs.JHRS\_132\_18
  16. Lee AM, Connell MT, Csokmay JM, Styer AK. Elective single embryo transfer- the power of one. *Contracept Reprod Med*. 2016;1(1). doi:10.1186/s40834-016-0023-4
  17. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. Garland Science; 2002.
  18. Dcunha R, Hussein RS, Ananda H, et al. Current Insights and Latest Updates in Sperm Motility and Associated Applications in Assisted Reproduction. *Reproductive Sciences*. 2022;29(1):7-25. doi:10.1007/s43032-020-00408-y
  19. Avidor-Reiss T, Zhang Z, Li XZ. Editorial: Sperm Differentiation and Spermatozoa Function: Mechanisms, Diagnostics, and Treatment. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8. doi:10.3389/fcell.2020.00219
  20. Peña FJ. Molecular biology of spermatozoa. *Int J Mol Sci*. 2020;21(9). doi:10.3390/ijms21093060
  21. Falcone T, Hurd WW, eds. *Clinical Reproductive Medicine and Surgery*. Springer International Publishing; 2017. doi:10.1007/978-3-319-52210-4
  22. Neto FTL, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin Cell Dev Biol*. 2016;59:10-26. doi:10.1016/j.semcd.2016.04.009
  23. Gilbert S. *Developmental Biology*. 6th ed. Sinauer Associates; 2000.

24. Guimarães RM, Ribeiro LM, Sasaki LP, Nakagawa HM, Cabral IO. Oocyte morphology and reproductive outcomes-case report and literature review. *J Bras Reprod Assist.* 2021;25(3):500-507. doi:10.5935/1518-0557.20210001
25. Virant-Klun I, Knez K, Tomazevic T, Skutella T. Gene expression profiling of human oocytes developed and matured in vivo or *in vitro*. *Biomed Res Int.* 2013;2013. doi:10.1155/2013/879489
26. Rienzi L, Balaban B, Ebner T, Mandelbaum J. The oocyte. *Human Reproduction.* 2012;27(SUPPL .1). doi:10.1093/humrep/des200
27. Motta PM, Nottola SA, Famuiari G, Macchiarelli G, Correr S, Makabe S. *Structure and Function of the Human Oocyte-Cumulus-Corona Cell Complex before and after Ovulation.* Vol 206.; 1999.
28. Wissing ML, Sonne SB, Westergaard D, et al. The transcriptome of corona radiata cells from individual MII oocytes that after ICSI developed to embryos selected for transfer: PCOS women compared to healthy women. *J Ovarian Res.* 2014;7(1). doi:10.1186/s13048-014-0110-6
29. Wassarman P, Chen J, Cohen N, et al. Structure and function of the mammalian egg zona pellucida. *J Exp Zool.* 1999;285(3):251-258.
30. Elder K, Dale B, Ménézo Y, Harper J, Huntriss J. *In-Vitro Fertilization.* Cambridge University Press; 2010. doi:10.1017/CBO9780511984761
31. Elder K, Dale B. *In-Vitro Fertilization.* 4th ed. Cambridge University Press; 2020.
32. Khan YS, Ackerman KM. *Embryology, Week 1.*; 2022.
33. Oliver R, Basit H. *Embryology, Fertilization.*; 2022.
34. Nixon B, Bromfield EG. Sperm capacitation. In: *Encyclopedia of Reproduction.* Elsevier; 2018:272-278. doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.64464-1
35. Nixon B, Bromfield EG. Sperm capacitation. In: *Encyclopedia of Reproduction.* Elsevier; 2018:272-278. doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.64464-1
36. Brucker C, Lipford GB. *The Human Sperm Acrosome Reaction: Physiology and Regulatory Mechanisms. An Update.* Vol 1. Oxford University Press; 1995. <http://humupd.oxfordjournals.org/>

37. Georgadaki K, Khoury N, Spandidos DA, Zoumpourlis V. The molecular basis of fertilization (Review). *Int J Mol Med.* 2016;38(4):979-986. doi:10.3892/ijmm.2016.2723
38. Niakan KK, Han J, Pedersen RA, Simon C, Pera RAR. Human pre-implantation embryo development. *Development.* 2012;139(5):829-841. doi:10.1242/dev.060426
39. Firmin J, Maître JL. Morphogenesis of the human preimplantation embryo: bringing mechanics to the clinics. *Semin Cell Dev Biol.* 2021;120:22-31. doi:10.1016/j.semcd.2021.07.005
40. Elder K, Dale B, Ménézo Y, Harper J, Huntriss J. *In-Vitro Fertilization.* Cambridge University Press; 2010. doi:10.1017/CBO9780511984761
41. Niakan KK, Han J, Pedersen RA, Simon C, Pera RAR. Human pre-implantation embryo development. *Development.* 2012;139(5):829-841. doi:10.1242/dev.060426
42. Coticchio G, Lagalla C, Sturmey R, Pennetta F, Borini A. The enigmatic morula: Mechanisms of development, cell fate determination, self-correction and implications for ART. *Hum Reprod Update.* 2019;25(4):422-438. doi:10.1093/humupd/dmz008
43. Direkvand-Moghadam A, Delpisheh A, Khosravi A. Epidemiology of female infertility; a review of literature. *Biosci Biotechnol Res Asia.* 2013;10(2):559-567. doi:10.13005/bbra/1165
44. vander Borcht M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem.* 2018;62:2-10. doi:10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012
45. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLoS Med.* 2012;9(12):e1001356. doi:10.1371/journal.pmed.1001356
46. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod.* 2007;22(6):1506-1512. doi:10.1093/humrep/dem046
47. Rutein S, Shah I. *DHS Comparative Reports Infecundity, Infertility, and Childlessness in Developing Countries.*; 2004. <http://www.measuredhs.com>

48. Zegers-Hochschild F, Dickens BM, Dughman-Manzur S. Human rights to *in vitro* fertilization. *Int J Gynaecol Obstet.* 2013;123(1):86-89. doi:10.1016/j.ijgo.2013.07.001
49. Gnoth C, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Friol K, Tigges J, Freundl G. Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Human Reproduction.* 2005;20(5):1144-1147. doi:10.1093/humrep/deh870
50. Eijkemans MJC, van Poppel F, Habbema DF, Smith KR, Leridon H, te Velde ER. Too old to have children? Lessons from natural fertility populations. *Human Reproduction.* 2014;29(6):1304-1312. doi:10.1093/humrep/deu056
51. Ombelet W, Cooke I, Dyer S, Serour G, Devroey P. Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. *Hum Reprod Update.* 2008;14(6):605-621. doi:10.1093/humupd/dmn042
52. te Velde ER, Pearson PL. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update.* 2002;8(2):141-154. doi:10.1093/humupd/8.2.141
53. Hart RJ. Physiological Aspects of Female Fertility: Role of the Environment, Modern Lifestyle, and Genetics. *Physiol Rev.* 2016;96:873-909. doi:10.1152/physrev.00023.2015.-Across
54. Elder K, Cohen Jacques. *Human Preimplantation Embryo Selection.* Informa Healthcare; 2007.
55. Colao A, de Rosa M, Zarrilli S, et al. *Hyperprolactinemia in Men Clinical and Biochemical Features and Response to Treatment.*; 2003.
56. Damseh N, Quercia N, Rumman N, Dell SD, Kim RH. Primary ciliary dyskinesia: Mechanisms and management. *Application of Clinical Genetics.* 2017;10:67-74. doi:10.2147/TACG.S127129
57. Jose-Miller AB, Boyden JW, Frey KA. *Infertility.*; 2007. www.aafp.org/afp.
58. Krausz C. Male infertility: Pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25(2):271-285. doi:10.1016/j.beem.2010.08.006
59. Brauner R, Neve M, Allali S, et al. Clinical, biological and genetic analysis of anorchia in 26 boys. *PLoS One.* 2011;6(8). doi:10.1371/journal.pone.0023292
60. Leslie SW, Sajjad H, Villanueva CA. *Cryptorchidism.*; 2022.

61. Kukadia AN, Ercole CJ, Gleich P, Hensleigh H, Pryor NL. *TESTICULAR TRAUMA: POTENTIAL IMPACT ON REPRODUCTIVE FUNCTION*. Vol 156.; 1996.
62. Kantartzi PD, Goulis CD, Goulis GD, Papadimas I. Male infertility and varicocele: myths and reality. *Hippokratia*. 2007;11(3):99-104.
63. Tanga BM, Qamar AY, Raza S, et al. Semen evaluation: Methodological advancements in sperm quality-specific fertility assessment - A review. *Anim Biosci*. 2021;34(8):1253-1270. doi:10.5713/ab.21.0072
64. WHO. *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen Sixth Edition.*; 2021.
65. Baskaran S, Finelli R, Agarwal A, Henkel R. Diagnostic value of routine semen analysis in clinical andrology. *Andrologia*. 2021;53(2). doi:10.1111/and.13614
66. Agarwal A, Sharma RK, Gupta S, et al. Sperm vitality and necrozoospermia: diagnosis, management, and results of a global survey of clinical practice. *World Journal of Men's Health*. 2021;39. doi:10.5534/wjmh.210149
67. Baskaran S, Finelli R, Agarwal A, Henkel R. Diagnostic value of routine semen analysis in clinical andrology. *Andrologia*. 2021;53(2). doi:10.1111/and.13614
68. Gatimel N, Moreau J, Parinaud J, Léandri RD. Sperm morphology: assessment, pathophysiology, clinical relevance, and state of the art in 2017. *Andrology*. 2017;5(5):845-862. doi:10.1111/andr.12389
69. Janosek-Albright KJC, Schlegel PN, Dabaja AA. Testis sperm extraction. *Asian J Urol*. 2015;2(2):79-84. doi:10.1016/j.ajur.2015.04.018
70. Siadati S, Shafi H, Ghorbani H. Testicular Biopsy in Males With Infertility: A Longitudinal Study. *JOURNAL OF PATHOLOGY Iranian Journal of Pathology*. 2017;12(2):177-182.
71. Shah R. Surgical sperm retrieval: Techniques and their indications. In: *Indian Journal of Urology*. Vol 27. ; 2011:102-109. doi:10.4103/0970-1591.78439
72. Enatsu N, Chiba K, Fujisawa M. The development of surgical sperm extraction and new challenges to improve the outcome. *Reprod Med Biol*. 2016;15(3):137-144. doi:10.1007/s12522-015-0228-2

73. Esteves SC, Miyaoka R, Agarwal A. Sperm retrieval techniques for assisted reproduction. *Int Braz J Urol.* 2011;37(5):570-583. doi:10.1590/s1677-55382011000500002
74. Esteves SC, Varghese AC. Laboratory handling of epididymal and testicular spermatozoa: What can be done to improve sperm injections outcome. *J Hum Reprod Sci.* 2012;5(3):233-243. doi:10.4103/0974-1208.106333
75. Dohle GR, Elzanaty S, van Casteren NJ. Testicular biopsy: Clinical practice and interpretation. *Asian J Androl.* 2012;14(1):88-93. doi:10.1038/aja.2011.57
76. Hezavehei M, Sharafi M, Kouchesfahani HM, et al. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reprod Biomed Online.* 2018;37(3):327-339. doi:10.1016/j.rbmo.2018.05.012
77. Estudillo E, Jiménez A, Bustamante-Nieves PE, Palacios-Reyes C, Velasco I, López-Ornelas A. Cryopreservation of gametes and embryos and their molecular changes. *Int J Mol Sci.* 2021;22(19). doi:10.3390/ijms221910864
78. BUNGE RG, SHERMAN JK. Fertilizing Capacity of Frozen Human Spermatozoa. *Nature.* 1953;172(4382):767-768. doi:10.1038/172767b0
79. Esteves SC, Varghese AC. Laboratory handling of epididymal and testicular spermatozoa: What can be done to improve sperm injections outcome. *J Hum Reprod Sci.* 2012;5(3):233-243. doi:10.4103/0974-1208.106333
80. Montag M, Morbeck D. *Principles of IVF Laboratory Practice: Optimizing Performance and Outcomes.* Cambridge University Press; 2017. doi:10.1017/9781316569238
81. Henkel RR, Schill WB. *Sperm Preparation for ART.* Vol 1.; 2003. <http://www.rbej.com/content/1/1/108><http://www.rbej.com/content/1/1/108>
82. Gardner DK, Simón C, eds. *Handbook of In Vitro Fertilization.* CRC Press; 2017. doi:10.1201/9781315157269
83. Gardner DavidK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques.* Vol 1. CRC Press; 2012. doi:10.3109/9781841849713
84. Zafer M, Horvath H, Mmeje O, et al. Effectiveness of semen washing to prevent human immunodeficiency virus (HIV) transmission and assist pregnancy in HIV-

- discordant couples: A systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2016;105(3):645-655.e2. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.11.028
85. Yamanaka M, Tomita K, Hashimoto S, et al. Combination of density gradient centrifugation and swim-up methods effectively decreases morphologically abnormal sperms. *J Reprod Dev*. 2016;62(6):599-606. doi:10.1262/jrd.2016-112
  86. Bayer S. *The Boston IVF Handbook of Infertility*. (Bayer SR, Alper MM, Penzias AS, eds.). CRC Press; 2017. doi:10.4324/9781351241496
  87. Allahbadia GN. Intrauterine Insemination: Fundamentals Revisited. *Journal of Obstetrics and Gynecology of India*. 2017;67(6):385-392. doi:10.1007/s13224-017-1060-x
  88. Arab-Zozani M, Nastri CO. Single versus double intrauterine insemination (IUI) for pregnancy: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*. 2017;215:75-84. doi:10.1016/j.ejogrb.2017.05.025
  89. Kandavel V, Cheong Y. Does intra-uterine insemination have a place in modern ART practice? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018;53:3-10. doi:10.1016/j.bpobgyn.2018.08.003
  90. Wang X, Zhang Y, Sun HL, et al. Factors affecting artificial insemination pregnancy outcome. *Int J Gen Med*. 2021;14:3961-3969. doi:10.2147/IJGM.S312766
  91. D'Angelo A, Panayotidis C, Amso N, et al. Recommendations for good practice in ultrasound: oocyte pick up†. *Hum Reprod Open*. 2019;2019(4). doi:10.1093/hropen/hoz025
  92. Hornstein MD, Racowsky C. Assisted reproduction. In: *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology: Expert Consult - Online and Print*. Elsevier; 2009:725-757. doi:10.1016/B978-1-4160-4907-4.00029-2
  93. de Moura BRL, Gurgel MCA, Machado SPP, et al. Low concentration of hyaluronidase for oocyte denudation can improve fertilization rates and embryo quality. *J Bras Reprod Assist*. 2017;21(1):27-30. doi:10.5935/1518-0557.20170008
  94. de Vos A, van Landuyt L, van Ranst H, et al. Randomized sibling-oocyte study using recombinant human hyaluronidase versus bovine-derived Sigma

- hyaluronidase in ICSI patients. *Human Reproduction*. 2008;23(8):1815-1819. doi:10.1093/humrep/den212
95. ESHRE. *ESHRE Guideline Group on Good Practice in IVF Labs Revised Guidelines for Good Practice in IVF Laboratories (2015) Guideline of the European Society of Human Reproduction and Embryology 2 Disclaimer.*; 2015.
  96. Pai H, Baid R, Palshetkar N, Pai A, Pai R, Palshetkar R. Oocyte cryopreservation-current scenario and future perspectives: A narrative review. *J Hum Reprod Sci*. 2021;14(4):340-349. doi:10.4103/jhrs.jhrs\_173\_21
  97. Wang J, Sauer M v. *In vitro* fertilization (IVF): a review of 3 decades of clinical innovation and technological advancement. *Ther Clin Risk Manag*. 2006;2(4):355-364. doi:10.2147/tcrm.2006.2.4.355
  98. Zheng D, Zeng L, Yang R, et al. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus conventional *in vitro* fertilisation (IVF) in couples with non-severe male infertility (NSMI-ICSI): Protocol for a multicentre randomised controlled trial. *BMJ Open*. 2019;9(9). doi:10.1136/bmjopen-2019-030366
  99. Palermo GD, O'Neill CL, Chow S, et al. Intracytoplasmic sperm injection: State of the art in humans. *Reproduction*. 2017;154(6):F93-F110. doi:10.1530/REP-17-0374
  100. Simopoulou M, Giannelou P, Bakas P, et al. Making ICSI Safer and More Effective: A Review of the Human Oocyte and ICSI Practice. *In Vivo*. 2016;30(4):387-400.
  101. Palenno GD, Schlegel PN, Colombero LT, Zaninovic N, Moy F, Rosenwaks Z. *Aggressive Sperm Immobilization Prior to Intracytoplasmic Sperm Injection with Immature Spermatozoa Improves Fertilization and Pregnancy Rates*. Vol 11.; 1996. <https://academic.oup.com/humrep/article/11/5/1023/667437>
  102. Simopoulou M, Sfakianoudis K, Rapani A, et al. Considerations regarding embryo culture conditions: From media to epigenetics. *In Vivo (Brooklyn)*. 2018;32(3):451-460. doi:10.21873/invivo.11261
  103. Pool TB. An Update on Embryo Culture for Human Assisted Reproductive Technology: Media, Performance, and Safety. *Semin Reprod Med*. 2005;23(04):309-318. doi:10.1055/s-2005-923388

104. Tarahomi M, Vaz FM, van Straalen JP, et al. The composition of human preimplantation embryo culture media and their stability during storage and culture. *Human Reproduction*. 2019;34(8):1450-1461. doi:10.1093/humrep/dez102
105. Sunde A, Brison D, Dumoulin J, et al. Time to take human embryo culture seriously. *Human Reproduction*. 2016;31(10):2174-2182. doi:10.1093/humrep/dew157
106. Alteri A, Viganò P, Maizar AA, Jovine L, Giacomini E, Rubino P. Revisiting embryo assisted hatching approaches: a systematic review of the current protocols. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(3):367-391. doi:10.1007/s10815-018-1118-4
107. Li D, Yang DL, An J, et al. Effect of assisted hatching on pregnancy outcomes: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Sci Rep*. 2016;6. doi:10.1038/srep31228
108. Chen HF, Chen SU, Ma GC, et al. Preimplantation genetic diagnosis and screening: Current status and future challenges. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2018;117(2):94-100. doi:10.1016/j.jfma.2017.08.006
109. Cooper AR, Jungheim ES. Preimplantation genetic testing: Indications and controversies. *Clin Lab Med*. 2010;30(3):519-531. doi:10.1016/j.cl.2010.04.008
110. Greco E, Litwicka K, Minasi MG, Cursio E, Greco PF, Barillari P. Preimplantation genetic testing: Where we are today. *Int J Mol Sci*. 2020;21(12):1-29. doi:10.3390/ijms21124381
111. Bosch E, de Vos M, Humaidan P. The Future of Cryopreservation in Assisted Reproductive Technologies. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11. doi:10.3389/fendo.2020.00067
112. Rienzi L, Gracia C, Maggiulli R, et al. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in art: Systematic review and meta-Analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Hum Reprod Update*. 2017;23(2):139-155. doi:10.1093/humupd/dmw038
113. Spitzer D, Haidbauer R, Corn C, Stadler J, Wirleitner B, Zech NH. Effects of embryo transfer quality on pregnancy and live birth delivery rates. *J Assist Reprod Genet*. 2012;29(2):131-135. doi:10.1007/s10815-011-9680-z

114. Nasiri N, Eftekhari-Yazdi P. *An Overview of The Available Methods for Morphological Scoring of Pre-Implantation Embryos in In Vitro Fertilization*. Citation: Nasiri N, Eftekhari-Yazdi P. *An Overview of the Available Methods for Morphological Scoring of Pre-Implantation Embryos in in Vitro Fertilization*. Vol 16.; 2015.
115. Cuevas Saiz I, Carme Pons Gatell M, Vargas MC, et al. The Embryology Interest Group: updating ASEBIR's morphological scoring system for early embryos, morulae and blastocysts. *Medicina Reproductiva y Embriología Clínica*. 2018;5(1):42-54. doi:10.1016/j.medre.2017.11.002
116. Gardner DK, Phil D, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. *Blastocyst Score Affects Implantation and Pregnancy Outcome: Towards a Single Blastocyst Transfer*.; 2000.
117. Scott L, Alvero R, Leondires M. *The Morphology of Human Pronuclear Embryos Is Positively Related to Blastocyst Development and Implantation\**. Vol 15.; 2000.
118. Alpha Scientists in Reproductive Medicine, ESHRE. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: Proceedings of an expert meeting. In: *Human Reproduction*. Vol 26. Oxford University Press; 2011:1270-1283. doi:10.1093/humrep/der037
119. MOHR LR, TROUNSON AO. Cryopreservation of Human Embryos. *Ann N Y Acad Sci*. 1985;442(1 *In Vitro Fert*):536-543. doi:10.1111/j.1749-6632.1985.tb37562.x
120. PALERMO G. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *The Lancet*. 1992;340(8810):17-18. doi:10.1016/0140-6736(92)92425-F
121. Stoddart NR, Wild AE, Fleming TP. Stimulation of development *in vitro* by platelet-activating factor receptor ligands released by mouse preimplantation embryos. *J Reprod Fertil*. 1996;108(1):47-53. doi:10.1530/jrf.0.1080047
122. Lane M, Gardner DK. *Effect of Incubation Volume and Embryo Density on the Development and Viability of Mouse Embryos in Vitro*. Vol 7.; 1992.
123. Gardner DK, Lane M, Spitzer A, Batt PA. *Enhanced Rates of Cleavage and Development for Sheep Zygotes Cultured to the Blastocyst Stage In Vitro in the Absence of Serum and Somatic Cells: Amino Acids, Vitamins, and Culturing*

- Embryos in Groups Stimulate Development*. Vol 50.; 1994.  
<https://academic.oup.com/biolreprod/article/50/2/390/2762612>
124. O'Doherty EM, Wade MG, Hill JL, Boland MP. Effects of culturing bovine oocytes either singly or in groups on development to blastocysts. *Theriogenology*. 1997;48(1):161-169. doi:10.1016/S0093-691X(97)00199-4
  125. Moessner J, Dodson WC. *The Quality of Human Embryo Growth Is Improved When Embryos Are Cultured in Groups Rather than Separately\**. Vol 64.; 1995.
  126. Almagor M, Corina Bejar P, Irit Kafka M, Yaffe H. *Pregnancy Rates after Communal Growth of Preimplantation Human Embryos in Vitro\**. Vol 66.; 1996.
  127. Ebner T, Shebl O, Moser M, Mayer RB, Arzt W, Tews G. Group culture of human zygotes is superior to individual culture in terms of blastulation, implantation and life birth. *Reprod Biomed Online*. 2010;21(6):762-768. doi:10.1016/j.rbmo.2010.06.038
  128. Laverge H, de Sutter P, van der Elst J, Dhont M. *A Prospective, Randomized Study Comparing Day 2 and Day 3 Embryo Transfer in Human IVF*. Vol 16.; 2001.
  129. Rijnders PM, Jansen CAM. *Influence of Group Culture and Culture Volume on the Formation of Human Blastocysts: A Prospective Randomized Study*. Vol 14.; 1999.
  130. Rebollar-Lazaro I, Matson P. *The Culture of Human Cleavage Stage Embryos Alone or in Groups: Effect upon Blastocyst Utilization Rates and Implantation*. Vol 10.; 2010.
  131. Reed ML, Woodward BJ, Swain JE. Single or Group Culture of Mammalian Embryos: The Verdict of the Literature. *Journal of Reproductive and Stem Cell Biotechnology*. 2011;2(2):77-87. doi:10.1177/205891581100200203
  132. Paria BC, Dey SK. *Preimplantation Embryo Development in Vitro: Cooperative Interactions among Embryos and Role of Growth Factors (Morula/Blastocyst/Epidermal Growth Factor Receptor/Autocrine/Paracrine)*. Vol 87.; 1990.
  133. Lane M, Gardner DK. Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse. *Biol Reprod*. 2003;69(4):1109-1117. doi:10.1095/biolreprod.103.018093

134. Gardner DK, Lane M. *Amino Acids and Ammonium Regulate Mouse Embryo Development in Culture*. Vol 48.; 1993. <https://academic.oup.com/biolreprod/article/48/2/377/2762157>
135. Johnson MH, Nasr-Esfahani MH. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*? *Bioessays*. 1994;16(1):31-38. doi:10.1002/bies.950160105
136. Salahuddin S, Ookutsu S, Goto K, Nakanishi Y, Nagata Y. *Effects of Embryo Density and Co-Culture of Unfertilized Oocytes on Embryonic Development of in-Vitro Fertilized Mouse Embryos*. Vol 10.; 1995. <http://humrep.oxfordjournals.org/>
137. Restelli L, Paffoni A, Corti L, et al. The strategy of group embryo culture based on pronuclear pattern on blastocyst development: a two center analysis. *J Assist Reprod Genet*. 2014;31(12):1629-1634. doi:10.1007/s10815-014-0350-9
138. Vajta G, Peura TT, Holm P, et al. *New Method for Culture of Zona-Included or Zona-Free Embryos: The Well of the Well (WOW) System*. Vol 55.; 2000.
139. Reed ML. Culture systems: Embryo density. *Methods in Molecular Biology*. 2012;912:273-312. doi:10.1007/978-1-61779-971-6\_16
140. Scaravelli G, Zacà C, Levi Setti PE, et al. Fertilization rate as a novel indicator for cumulative live birth rate: a multicenter retrospective cohort study of 9,394 complete *in vitro* fertilization cycles. *Fertil Steril*. 2021;116(3):766-773. doi:10.1016/j.fertnstert.2021.04.006
141. Shen S, Khabani A, Klein N, Battaglia D. Statistical analysis of factors affecting fertilization rates and clinical outcome associated with intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2003;79(2):355-360. doi:10.1016/S0015-0282(02)04675-7
142. Javed M, Michael E. Intracytoplasmic Sperm Injection – Factors Affecting Fertilization. In: *Enhancing Success of Assisted Reproduction*. InTech; 2012. doi:10.5772/50036
143. Swain JE. Fused blastocysts as a consequence of group embryo culture: observations, complications, and potential solutions. *F S Rep*. 2021;2(1):133-135. doi:10.1016/j.xfre.2020.10.010
144. Villani MT, Morini D, Spaggiari G, et al. Are sperm parameters able to predict the success of assisted reproductive technology? A retrospective analysis of over

- 22,000 assisted reproductive technology cycles. *Andrology*. 2022;10(2):310-321. doi:10.1111/andr.13123
145. Parinaud J, Mieusset R, Vieitez G, Labal B, Richoilley G. Influence of sperm parameters on embryo quality. *Fertil Steril*. 1993;60(5):888-892. doi:10.1016/S0015-0282(16)56292-X
  146. Grøndahl ML, Yding Andersen C, Bogstad J, Nielsen FC, Meinertz H, Borup R. Gene expression profiles of single human mature oocytes in relation to age. *Hum Reprod*. 2010;25(4):957-968. doi:10.1093/humrep/deq014
  147. Grøndahl ML, Christiansen SL, Kesmodel US, et al. Effect of women's age on embryo morphology, cleavage rate and competence - A multicenter cohort study. *PLoS One*. 2017;12(4). doi:10.1371/journal.pone.0172456
  148. Stensen MH, Tanbo T, Storeng R, Åbyholm T, Fèdorcsak P. Routine morphological scoring systems in assisted reproduction treatment fail to reflect age-related impairment of oocyte and embryo quality. *Reprod Biomed Online*. 2010;21(1):118-125. doi:10.1016/j.rbmo.2010.03.018
  149. Yan JH, Wu KL, Tang R, Ding LL, Chen ZJ. Effect of maternal age on the outcomes of *in vitro* fertilization and embryo transfer (IVF-ET). *Sci China Life Sci*. 2012;55(8):694-698. doi:10.1007/s11427-012-4357-0
  150. Mohammadzadeh M, Fesahat F, Khoradmehr A, Khalili MA. Influential effect of age on oocyte morphometry, fertilization rate and embryo development following IVF in mice. *Middle East Fertil Soc J*. 2018;23(2):117-120. doi:10.1016/j.mefs.2017.09.006
  151. Tatone C, Amicarelli F, Carbone MC, et al. Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. *Hum Reprod Update*. 2008;14(2):131-142. doi:10.1093/humupd/dmm048
  152. Bar-Hava I, Ferber A, Ashkenazi J, et al. Does female age affect embryo morphology? *Gynecological Endocrinology*. 1999;13(6):371-374. doi:10.3109/09513599909167582
  153. Hsu MI, Wang CW, Chen CH, Tzeng CR. Impact of the number of retrieved oocytes on pregnancy outcome in *in vitro* fertilization. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2016;55(6):821-825. doi:10.1016/j.tjog.2015.05.009



## Anexos

## Anexo 1

Tabela 5. Organização de oócitos por gota de meio em cada placa de cultura. O sinal + corresponde a separação de placas, ou seja, placas diferentes. Em cada linha, os primeiros oócitos isolados serão cultivados na mesma placa que os primeiros oócitos em grupo e assim subsequentemente, por exemplo: quando temos 13 oócitos em metáfase II a primeira placa terá 4 em grupo e 3 isolados enquanto a segunda placa terá 4 em grupo e 2 isolados. A sinalização a cinza corresponde a placas com apenas oócitos isolados e a sinalização a amarelo corresponde a casos onde a organização nas placas vai alternando para manter um número equilibrado de oócitos em grupo e isolados.

Nº de oócitos total	Nº de oócitos em grupo (por placa)	Nº de oócitos isolados (por placa)	Nº de placas
7	4	3	1
8	4	2+2*	2
9	4	2+3*	2
10	4	2+4*	2
11	4	2+5*	2
12	4 / 4+4	2+6* / 2+2	2
13	4+4	3+2	2
14	4+4	3+3	2
15	4+4	2+2+3*	3
16	4+4	2+2+4*	3
17	4+4	2+2+5*	3
18	4+4	2+2+6*	3
19	4+4	3+3+5*	3
20	4+4+4	3+3+2	3
21	4+4+4	3+3+3	3
22	4+4+4	2+2+2+4*	4
23	4+4+4	2+2+2+5*	4
24	4+4+4	2+2+2+6*	4
25	4+4+4	2+2+3+6*	4
26	4+4+4	2+3+3+6*	4
27	4+4+4	3+3+3+6*	4
28	4+4+4+4	3+3+3+3	4
29	4+4+4+4	2+2+2+2+5*	5
30	4+4+4+4	2+2+2+2+6*	5
31	4+4+4+4	2+2+2+3+6*	5
32	4+4+4+4	2+2+3+3+6*	5

