

Técnicas de Reprodução Assistida: Taxa de sucesso da ICSI

Luís Carlos Ribeiro Monteiro

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Departamento de Biologia

2022/2023

Orientador

Prof. Dr. Vasco Manuel Leal Martins de Almeida,
Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências da
Universidade do Porto



M

S

C

Agradecimentos

Inicialmente, gostaria de agradecer ao Professor Doutor Vasco Almeida, por todo o apoio, disponibilidade e simpatia que demonstrou ao longo de todo o meu percurso neste mestrado, não só como orientador, mas também como professor.

Agradeço também a toda a equipa do CEIE, em especial à Doutora Isabel Damião e à Doutora Sara Oliveira, pela paciência e compreensão que sempre demonstraram desde a minha chegada à clínica e pelos excelentes ensinamentos e mentoria.

Agradeço à minha melhor amiga e namorada, Inês Tavares. Obrigado por me apoiares, motivares e acreditares sempre em mim nos bons e maus momentos.

Agradeço à minha mãe, pelo carinho que sempre me deu, pelos sacrifícios que faz para que eu possa ter a oportunidade de estudar e seguir os meus sonhos sem outras preocupações e por me ensinar que sem trabalho e dedicação nada se consegue.

Agradeço ao meu pai que, apesar de já não se encontrar entre nós, sempre teve o sonho de me ver a terminar a minha jornada académica e sei que está a torcer por mim onde quer que esteja.

Finalmente, agradeço aos meus amigos e família, obrigado por fazerem parte da minha vida.

Resumo

A infertilidade é uma doença que afeta os sistemas reprodutivos masculino e feminino e atinge cerca de 10-15% dos casais, podendo ter consequências a nível psicológico e social, não só no indivíduo, como também no casal. Vários fatores podem influenciar a fertilidade, tanto masculina como feminina. No homem, a infertilidade está comumente associada a uma má qualidade espermática, nomeadamente a valores reduzidos nos parâmetros de concentração, motilidade ou morfologia. Nas mulheres, fatores de risco como a obesidade, idade materna avançada, tabagismo e fatores ambientais podem resultar no aparecimento de danos nas trompas de Falópio e interferir com a ovulação e com a regulação hormonal.

Nos últimos anos, várias técnicas de procriação medicamente assistida (PMA) sofreram uma grande evolução, nomeadamente a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Introduzida inicialmente como um método para tratar casais com infertilidade severa do fator masculino, esta técnica tem ganho popularidade nas últimas décadas entre casais com infertilidade inexplicada ou com baixa produção de ovócitos.

Tendo isto em consideração, este estudo pretende avaliar de que modo a idade da mulher e a qualidade espermática (com foco em casais com valores de morfologia reduzidos) influenciam a taxa de sucesso do procedimento de ICSI. Adicionalmente, pretende-se investigar de que forma a técnica de transferência utilizada influencia o sucesso da implantação do embrião.

Foram avaliadas as taxas de fecundação, formação de blastocistos e implantação em casais cujo membro masculino apresentava uma morfologia espermática igual ou inferior a 4% de formas normais, tendo também em consideração a idade da mulher. Através de análise estatística, foi determinado que os casais em estudo não apresentavam diferenças significativas na taxa de fecundação e formação de blastocistos. No entanto, os casais em que a mulher tinha idade igual ou inferior a 35 anos apresentavam taxas de implantação significativamente superiores aos casais com mulheres de idade mais avançada.

Relativamente às técnicas de transferência, foi avaliado o sucesso da transferência de embriões a fresco (TEF) e de embriões criopreservados (TEC) quando realizadas independentemente e em sequência. Em ambas as situações, verificamos que a TEC apresenta uma taxa de sucesso superior à TEF.

O presente estudo permitiu concluir que, em casais cujo membro masculino apresente teratozoospermia, a morfologia espermática e a idade materna, não influenciam as taxas de fecundação e formação de blastocistos. Contudo, a idade materna demonstrou influenciar a taxa de implantação, independentemente da morfologia espermática. Além disso, os resultados obtidos permitem concluir que, neste tipo de casais, a TEC deverá ser preferida à TEF.

Palavras-chave: Infertilidade, ICSI, idade materna avançada, morfologia espermática, fecundação, formação de blastocistos, implantação, transferência embrionária

Abstract

Infertility is a disease that affects the male and female reproductive systems and impacts around 10-15% of couples. It can have psychological and social consequences, not only for the individual, but also for the couple. Various factors can influence both male and female fertility. In men, infertility is commonly associated with poor sperm quality, namely reduced values in the parameters of concentration, motility or morphology. In women, risk factors such as obesity, advanced maternal age, smoking and environmental factors can result in damage to the fallopian tubes and interfere with ovulation and hormonal regulation.

In recent years, various assisted reproductive technologies (ART) have undergone major developments, particularly intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Initially introduced as a method to treat couples with severe male factor infertility, this technique has gained popularity in recent decades among patients with unexplained infertility or low oocyte production (common in couples with advanced maternal age).

With this in mind, our study aims to assess how the woman's age and sperm quality (with a focus on couples with reduced morphology values) influence the success rate of the ICSI procedure. In addition, we investigated how the transfer technique used influences the success of embryo implantation.

Fertilization, blastocyst formation and implantation rates were evaluated in couples whose male member had a sperm morphology equal to or less than 4% of normal forms, also considering the woman's age. Through statistical analysis, it was determined that the couples under study did not show significant differences in the rate of fertilization and blastocyst formation. However, couples in which the woman was aged 35 or under had significantly higher implantation rates than couples with older women.

Regarding the transfer techniques, the success of the transfer of fresh embryos (FET) and cryopreserved embryos (CET) was evaluated when carried out independently and in sequence. In both situations, CET had a higher success rate than FET.

This study led to the conclusion that, in couples whose male member has teratozoospermia, sperm morphology and maternal age do not influence fertilization and blastocyst formation rates. However, maternal age was shown to influence the implantation rate, regardless of sperm morphology. In addition, the results obtained lead us to conclude that, in this type of couple, CET should be preferred to FET.

Keywords: Infertility, ICSI, advanced maternal age, sperm morphology, fertilization, blastocyst formation, implantation, embryo transfer

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iv
Lista de tabelas	viii
Lista de Gráficos	xi
Lista de figuras	xii
Lista de abreviaturas	xiii
1. Introdução	1
1.1. Infertilidade	1
1.1.1. Conceitos e Epidemiologia	1
1.1.2. Diagnóstico	2
1.2. Técnicas de Procriação Medicamente Assistida (PMA)	8
1.2.1. Espermograma	8
1.2.2. FIV	8
1.2.3. ICSI	9
1.2.4. Desenvolvimento embrionário	11
1.2.4.1. Avaliação da fecundação e clivagem inicial (Dia 1)	12
1.2.4.2. Avaliação de embriões em fase de clivagem (dias 2 e 3)	13
1.2.4.3. Fase de mórula e blastocisto	16
1.2.5. Tecnologia time-lapse	19
2. Objetivos	21
3. Métodos	22
3.1 Trabalho laboratorial	22
3.2 Espermograma	22
3.2.1 Parâmetros Macroscópicos	23
3.2.1.1 Volume	23
3.2.1.2 pH	23
3.2.1.3 Cheiro	23
3.2.1.4 Viscosidade	23
3.2.1.5 Aspetto visual	23
3.2.1.6 Liquefação	24
3.2.2 Parâmetros microscópicos	24
3.2.2.1 Motilidade	24
3.2.2.2 Vitalidade	25
3.2.2.3 Concentração	25
3.2.2.4 Morfologia	26

3.3	Processamento laboratorial	27
3.3.1	Processamento dos gametas masculinos.....	27
3.3.2	Processamento dos gametas femininos.....	28
3.4	Procedimento de FIV	29
3.5	Procedimento de ICSI.....	30
3.6	Avaliação do desenvolvimento dos embriões.....	32
3.7	Vitrificação e descongelação de embriões.....	33
3.8	Transferência embrionária.....	34
3.9	Avaliação da gravidez clínica.....	34
3.10	Acompanhamento do casal.....	35
4	Análise estatística.....	36
4.1	Preparação dos dados.....	36
4.2	Análise estatística dos dados.....	37
5	Resultados	39
5.1	Resultados descritivos da amostra.....	39
5.2	Diferenças no número de ovócitos injetados por grupo.....	39
5.3	Taxas de fecundação, formação de blastocistos e implantação.....	40
5.3.1	Análise descritiva da amostra	40
5.4	Influência da morfologia espermática e idade da mulher na taxa de fecundação.....	45
5.5	Influência da morfologia espermática e idade da mulher na taxa de formação de blastocistos.....	47
5.6	Influência da morfologia espermática e idade da mulher na taxa de implantação	49
5.7	TEC vs TEF.....	51
6	Discussão.....	54
6.1	Influência da idade da mulher e da morfologia espermática na fertilidade do casal.....	54
6.2	TEC vs. TEF	57
7	Conclusão	59
8	Referências bibliográficas	61

Lista de tabelas

Tabela 1: Terminologia das anomalias espermáticas.

Tabela 2: Timing e estágio de desenvolvimento esperado dos ovócitos fertilizados e embriões. Adaptado de *The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting* [2]

Tabela 3: Classificação dos embriões em fase de clivagem. Adaptado de *The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting* [2].

Tabela 4: Classificação de *Gardner e Schoolcraft* para a qualidade embrionária na fase de blastocisto. Adaptado de *The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting* [2]

Tabela 5: Classificação do estágio de desenvolvimento e da qualidade da ICM e TE. Adaptado de *The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting* [2]

Tabela 6: Distribuição dos casais pelos 6 grupos de acordo com a morfologia espermática do membro masculino e idade da mulher.

Tabela 7: Resultados do teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov* para a taxa de fecundação, formação de blastocistos e implantação. A distribuição dos dados é considerada normal se $p > 0,05$.

Tabela 8: Número de ovócitos injetados por cada grupo: número de casais (N), número médio de ovócitos injetados ($\bar{X}_{ovóцитos}$), desvio padrão, erro padrão, intervalo de confiança para a média (95%), valor mínimo e máximo.

Tabela 9: Teste de Anova para avaliar a existência de diferenças significativas no número de ovócitos injetados entre os grupos 1-6.

Tabela 10: Teste de Anova a dois fatores para avaliar a existência de diferenças significativas no número de ovócitos injetados entre os grupos de idade materna e entre os grupos de morfologia espermática estabelecidos.

Tabela 11-12: Caracterização da população elegível para o cálculo da taxa de fecundação: número de casais, taxa de fecundação média e respetivo desvio padrão, mediana da taxa de fecundação e amplitude interquartil para cada um dos grupos de idade e morfologia estabelecidos.

Tabela 13-14: Caracterização da população elegível para o cálculo da taxa de formação de blastocistos: número de casais, taxa de formação de blastocistos média e respetivo desvio padrão, mediana da taxa de formação de blastocistos e amplitude interquartil para cada um dos grupos de idade e morfologia estabelecidos.

Tabela 15-16: Caracterização da população elegível para o cálculo da taxa de implantação: número de casais, taxa de implantação média e respetivo desvio padrão, mediana da taxa de implantação e amplitude interquartil para cada um dos grupos de idade e morfologia estabelecidos.

Tabela 17: Descrição dos grupos de casais: Média ($\bar{X}$) e respetivo desvio padrão (dp), mediana (M) e amplitude interquartil.

Tabela 18: Teste de *Kruskal-Wallis* para avaliar a existência de diferenças significativas entre a taxa de fecundação dos grupos 1-6.

Tabela 19: Comparação da significância das diferenças na taxa de fecundação entre grupos com mulheres na mesma faixa etária, mas com morfologia variável.

Tabela 20: Comparação da significância das diferenças na taxa de fecundação entre grupos com a mesma morfologia espermática, mas em faixas etárias diferentes.

Tabela 21: Descrição dos grupos de casais: Média ($\bar{X}$) e respetivo desvio padrão (dp), mediana (M) e amplitude interquartil.

Tabela 22: Teste de *Kruskal-Wallis* para avaliar a existência de diferenças significativas entre a taxa de formação de blastocistos dos grupos 1-6.

Tabela 23: Comparação da significância das diferenças na taxa de formação de blastocistos entre grupos com mulheres na mesma faixa etária, mas com morfologia variável.

Tabela 24: Comparação da significância das diferenças na taxa de formação de blastocistos entre grupos com a mesma morfologia espermática, mas em faixas etárias diferentes.

Tabela 25: Descrição dos grupos de casais: Média ($\bar{X}$) e respetivo desvio padrão (dp), mediana (M) e amplitude interquartil.

Tabela 26: Teste de *Kruskal-Wallis* para avaliar a existência de diferenças significativas entre a taxa de implantação dos grupos 1-6.

Tabela 27: Comparação da significância das diferenças na taxa de implantação entre grupos com mulheres na mesma faixa etária, mas com morfologia variável.

Tabela 28: Comparação da significância das diferenças na taxa de implantação entre grupos com a mesma morfologia espermática, mas em faixas etárias diferentes.

Tabela 29: Tabela com os valores utilizados no teste do Qui-quadrado de *Pearson* para amostras independentes.

Tabela 30: Teste de *McNemar* para amostras dependentes.

Tabela 31: Tabela referente aos valores utilizados no teste de *McNemar* para amostras dependentes.

Lista de Gráficos

Gráfico 1: Diagrama de caixa representando as diferenças na taxa de fecundação entre cada grupo de morfologia. Muito baixa: 0%; Moderada: 1-2%; Elevada: 3-4%. As caixas representam os valores concentrados entre 25 e 75% da amostra e as linhas representam barras de erro.

Gráfico 2: Diagrama de caixa representando as diferenças na taxa de fecundação entre cada grupo de idades. ≤ 35 : Idade igual ou inferior a 35 anos; > 35 : Idade superior a 35 anos. As caixas representam os valores concentrados entre 25 e 75% da amostra e as linhas representam barras de erro.

Gráfico 3: Diagrama de caixa representando as diferenças na taxa de formação de blastocistos entre cada grupo de morfologia. Muito baixa: 0%; Moderada: 1-2%; Elevada: 3-4%. As caixas representam os valores concentrados entre 25 e 75% da amostra e as linhas representam barras de erro.

Gráfico 4: Diagrama de caixa representando as diferenças na taxa de formação de blastocistos entre cada grupo de idades. ≤ 35 : Idade igual ou inferior a 35 anos; > 35 : Idade superior a 35 anos. As caixas representam os valores concentrados entre 25 e 75% da amostra e as linhas representam barras de erro.

Gráfico 5: Diagrama de caixa representando as diferenças na taxa de implantação entre cada grupo de morfologia. Muito baixa: 0%; Moderada: 1-2%; Elevada: 3-4%. As caixas representam os valores concentrados entre 25 e 75% da amostra e as linhas representam barras de erro.

Gráfico 6: Diagrama de caixa representando as diferenças na taxa de implantação entre cada grupo de idades. ≤ 35 : Idade igual ou inferior a 35 anos; > 35 : Idade superior a 35 anos. As caixas representam os valores concentrados entre 25 e 75% da amostra e as linhas representam barras de erro.

Lista de figuras

Figura 1: Desenvolvimento embrionário durante a fase de clivagem (dias 2 e 3): **(A)** Estágio de 2 células; **(B)** Estágio de 4 células; **(C)** Estágio de 8 células. Adaptado de *Niakan et al.* [3].

Figura 2: Desenvolvimento embrionário durante a fase de mórula (dia 4), caracterizada pela presença de um aglomerado de blastómeros compactados e contidos no interior da ZP. Adaptado de *Niakan et al.* [3].

Figura 3: Desenvolvimento embrionário durante a fase de blastocisto (dia 5). O blastocisto é caracterizado pelo aparecimento de uma cavidade na sua região central (blastocélio) e pela diferenciação da MCI e da TE. Adaptado de *Niakan et al.* [3].

Figura 4: Imagem ilustrativa de possíveis anomalias na morfologia do espermatozoide. Adaptado de *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen* [4].

Figura 5: Imagem ilustrativa do procedimento de FIV. Após o processamento dos gametas masculinos, realiza-se o cálculo do volume de amostra seminal a pipetar recorrendo a uma câmara de *Neubauer*. Posteriormente, os espermatozoides são pipetados nos poços contendo os CCO. Criada com *Biorender.com*.

Figura 6: Imagem ilustrativa do posicionamento do ovócito no momento da microinjeção. GP posicionado às 12 horas em relação à micropipeta de microinjeção. Adaptado de *Rubino et al.* [5].

Figura 7: Imagem ilustrativa do procedimento de ICSI. **(A)** Seleção e aspiração dos espermatozoides que apresentem a melhor morfologia; **(B)** Penetração da ZP e aspiração de um pouco do citoplasma; **(C)** Injeção do citoplasma aspirado juntamente com o espermatozoide; **(D)** Remoção da micropipeta de injeção do interior do ovócito. Adaptado de *uncfertility.com* [1].

Figura 8: Imagem ilustrativa de um embrião após inseminação. Verificamos a presença dos dois PN na região central do embrião e dos dois GP localizados na região entre a membrana citoplasmática e a ZP. Adaptado de *atlas.eshre.eu* [6].

Lista de abreviaturas

CCO – complexo *cumulus*-ovócito

CPN – corpos precursores nucleolares

DGPI – diagnóstico genético pré-implantação

DIP – doença inflamatória pélvica

DNA – traduzido do inglês *deoxyribonucleic acid*

FIV – fertilização *in vitro*

FSH – hormona folículo-estimulante

GnRH – fator libertador de gonadotrofinas

GP – glóbulos polares

hCG – gonadotrofina coriônica humana

ICSI – injeção intracitoplasmática de espermatozoides

IFT – infertilidade por fator tubárico

LH – hormona luteinizante

MCI – massa celular interna

mRNA – traduzido do inglês *messenger ribonucleic acid*

OMS – organização mundial de saúde

PMA – procriação medicamente assistida

PN – pronúcleos

PVP – polivinilpirrolidona

PZD – traduzido do inglês *partial zona dissection*

SUZI – traduzido do inglês *subzonal insemination*

TE – trofotoderme

TEC – transferência de embriões criopreservados

TEF – transferência de embriões a fresco

TESE – traduzido do inglês *Testicular Sperm Extraction*

VHC – vírus da hepatite C

VIH – vírus da imunodeficiência humana

ZP – zona pelúcida

1. Introdução

1.1. Infertilidade

1.1.1. Conceitos e Epidemiologia

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a infertilidade é uma doença que afeta o sistema reprodutivo masculino e feminino e é definida pela incapacidade de um casal alcançar a gravidez após 12 meses ou mais de relações sexuais desprotegidas e regulares [4]. Esta pode ser primária, no caso de casais que nunca atingiram gravidez anteriormente, ou secundária, no caso de casais que a alcançaram, mesmo que não tenha sido bem sucedida [7].

A ocorrência desta doença é descrita como uma experiência altamente stressante e frustrante, tendo consequências a nível psicológico e social, não só no indivíduo, como também no casal [8-11]. Um estudo realizado em Portugal em 2011 demonstrou que casais inférteis apresentam uma maior incidência de depressão, ansiedade e auto-perceção negativa. Eles consideram-se incapazes, inamáveis e índigos acreditando que outras pessoas os vêm como tendo características negativas, tais como serem indesejáveis, inúteis, defeituosas, ou inferiores [9].

Globalmente, estima-se que cerca de 10-15% dos casais sejam inférteis [12, 13]. No entanto, esta estimativa apresenta variações geográficas, sendo que em países mais desenvolvidos 3,5% a 16,7% dos casais são inférteis, enquanto que em países menos desenvolvidos a infertilidade varia entre os 6,9% e 9,3% [14].

Vários fatores podem influenciar a fertilidade, tanto feminina como masculina. O estilo de vida adotado pela pessoa, como o consumo de álcool, tabaco e drogas recreativas, a obesidade, o stress e o adiamento da maternidade, podem afetar negativamente a sua capacidade reprodutiva, aumentando assim a incidência de infertilidade na população em que estão inseridos. [15, 16].

Além do estilo de vida, doenças sexualmente transmissíveis, deficiências genéticas, fatores masculinos (por exemplo, baixa qualidade do esperma, malformação testicular, bloqueio do sistema reprodutor masculino) e fatores femininos (por exemplo, problemas ováricos, bloqueio tubal, endometriose) estão também na causa de diversos casos de infertilidade [17].

1.1.2. Diagnóstico

A maioria dos casais inférteis (cerca de 85%) têm uma razão conhecida para a sua infertilidade. Disfunção ovulatória, infertilidade do fator masculino, e doença tubária são as três causas mais típicas. Os restantes 15% dos casais inférteis são afetados por infertilidade idiopática [18].

Estatisticamente, tanto o homem como a mulher são igualmente responsáveis pela infertilidade do casal. Um terço dos casos de infertilidade são causados por problemas reprodutores femininos, um terço por problemas reprodutores masculinos e o restante por problemas reprodutores de ambos os membros do casal ou por fatores desconhecidos [7, 19].

Fator Masculino

Infertilidade do “fator masculino” é definida como uma alteração na concentração, motilidade ou morfologia do espermatozoide em pelo menos uma amostra de duas análises de espermatozoides, obtidas com uma e quatro semanas de intervalo [20]. Ao contrário das mulheres, apenas um número reduzido de homens que apresentem infertilidade do “fator masculino” têm condições tratáveis [21].

As contagens de espermatozoides têm vindo a diminuir nos últimos anos a nível global [22], apresentando variações geográficas devido a diferentes exposições ambientais ou a diferenças no estilo de vida das populações [23, 24].

A infertilidade masculina é comumente associada a deficiências no sêmen e é por isso frequentemente utilizada como uma medida preditiva da fertilidade masculina [23], sendo que indivíduos com parâmetros de espermatozoides abaixo dos valores normais estabelecidos pela OMS são considerados como tendo infertilidade do “fator masculino” [20].

De acordo com a mais recente atualização realizada pela OMS em 2021, foram estabelecidos novos valores mínimos de referência para a qualidade do espermatozoide, sendo eles, 1,4mL de volume de sêmen, 16×10^6 de espermatozoides por mililitro, 54% de vitalidade, 4% de espermatozoides morfologicamente normais e 42% de motilidade total (progressivos + não-progressivos), sendo que a taxa de progressivos tem de ser no mínimo 30% [4].

A origem da infertilidade masculina é, em grande parte, devido a fatores genéticos. A produção espermática é um processo complexo que envolve a ação coordenada de milhares de genes e de diversas vias biológicas [25, 26].

Por este motivo, durante o seu desenvolvimento e maturação, existem vários momentos em que o DNA (traduzido do inglês *deoxyribonucleic acid*) do espermatozoide pode sofrer mutações, muitas delas afetando negativamente a fertilidade masculina. As causas genéticas mais comuns para a infertilidade masculina incluem, mutações monogénicas e aneuploidias como a síndrome de *Klinefelter* e microdeleções no cromossoma Y [25, 26].

A síndrome de *Klinefelter* é uma doença genética caracterizada pela existência, nos homens, de um cromossoma X extra (genótipo XXY). Esta condição resulta num aumento dos níveis de LH (hormona luteinizante) e FSH (hormona folículo-estimulante) e diminuição dos níveis de androgénios, a partir da puberdade. Consequentemente, a desregulação hormonal leva ao aparecimento de características fisiológicas femininas, como desenvolvimento dos seios e alargamento da anca e à incapacidade de produzir espermatozoides devido ao atrofiamento dos testículos [27, 28].

O cromossoma Y apresenta a característica de ser o único gene que não tem um cromossoma homólogo. Todos os outros cromossomas têm um homólogo que os auxilia na reparação do DNA danificado [26].

Na extremidade distal do braço longo do cromossoma Y encontra-se a região responsável pela espermatogénese, denominada de AZF. Esta, por sua vez, está dividida em três sub-regiões, AZFa, AZFb e AZFc, que contêm diversos genes responsáveis por uma variedade de funções essenciais para a espermatogénese [26, 29, 30].

Microdeleções nestas regiões são responsáveis por 15% dos casos de azoospermia (deleção das sub-regiões AZFa e AZFb) e 5% dos casos de oligozoospermia severa (deleção da sub-região AZFc) (Tabela 1) [26, 29].

Apesar de não ser uma ferramenta perfeita, a análise de esperma (ou espermograma) continua a ser o primeiro exame realizado caso haja suspeitas de infertilidade do fator masculino e a melhor forma de apurar se um indivíduo é ou não infértil [20, 31].

Este exame inclui, uma avaliação macroscópica, do volume, cor, cheiro, viscosidade, liquefação e pH, bem como uma avaliação microscópica, na qual é avaliada a motilidade, vitalidade, morfologia, concentração, aglutinação de espermatozoides e presença de outras células, como células da linha germinativa e leucócitos [4].

Caso os valores obtidos no espermograma estejam abaixo dos valores de referência, atribui-se uma terminologia à condição do paciente, consoante a(s) característica(s) que apresentem um desvio relativamente ao estabelecido pela OMS (**Tabela 1**) [4].

Tabela 1: Terminologia das anomalias espermáticas.

Terminologia	Condição
Teratozoospermia	Menos de 4% de espermatozoides com morfologia normal
Astenozoospermia	Motilidade progressiva (lenta+rápida) inferior a 32%
Oligozoospermia	Concentração de espermatozoides inferior a 15×10^6 espermatozoides/mL
Leucocitospermia	Concentração de leucócitos no esperma superior a 1×10^6 leucócitos/mL
Hematospermia	Presença de eritrócitos no esperma
Azoospermia	Ausência total de espermatozoides no esperma

Se o espermograma apresentar valores anormais, deve ser realizada uma segunda análise ao esperma e, caso seja determinado que o paciente apresenta oligospermia ou azoospermia severa, será necessária a realização de uma avaliação andrológica de modo a estabelecer se esta é obstrutiva ou secretora [32].

Uma azoospermia secretora (ou não obstrutiva) consiste na ausência de espermatozoides no ejaculado devido a falhas na espermatogénese é a forma mais grave de infertilidade masculina [33].

Uma azoospermia obstrutiva pode ser definida como a ausência de espermatozoides no ejaculado por obstrução física do trato genital pós-testicular [33, 34]. Ao contrário da azoospermia secretora, pacientes com azoospermia obstrutiva podem apresentar uma espermatogénese normal [34].

Perante quadros de azoospermia tanto secretora como obstrutiva, primeiramente é necessário realizar um estudo hormonal e um estudo genético de modo a determinar a causa exata da azoospermia [35]. A biópsia testicular, ou TESE (traduzido do inglês *Testicular Sperm Extraction*) seguida de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) continua a ser o tratamento primário para estes pacientes apesar de nenhuma técnica se ter ainda demonstrado efetiva para o tratamento de azoospermia não obstrutiva [33, 36].

Fator feminino

O estudo da infertilidade na mulher começa com uma avaliação exaustiva da sua condição física e da sua história clínica, sendo relevante analisar documentação referente à sua ovulação, ao trato reprodutivo feminino e patência dos tubos, e realizar uma avaliação da cavidade uterina [37].

Vários fatores de risco estão associados ao aumento da incidência da infertilidade em mulheres, sendo a obesidade, idade avançada da mulher, tabagismo e fatores ambientais os mais impactantes. Esses fatores interferem no aparecimento de danos nas trompas de Falópio e interferem com a ovulação e com a regulação hormonal [38].

Fatores ambientais como a exposição a hidrocarbonetos clorados e fumicidas estão associados a uma maior incidência de abortamentos espontâneos [38]. A obesidade pode também afetar negativamente a fertilidade feminina através da desregulação da menstruação e ovulação, diminuindo a eficiência das técnicas de reprodução assistida e dificultando o processo fisiológico na gravidez e no parto [39].

Além dos fatores previamente mencionados, mulheres fumadoras e/ou em idade avançada podem vir a apresentar graves problemas de infertilidade. O consumo de tabaco contribui para a depleção dos folículos ováricos, o que leva à diminuição da reserva ovárica da mulher. Tal afeta negativamente a fecundação, aumentando, por conseguinte, o tempo de concepção. O tabaco pode também causar danos no DNA nuclear devido à sua exposição a stress oxidativo, aumentando assim a incidência de abortamentos, entre outros problemas [40, 41].

A idade avançada da mulher é cada vez um fator mais relevante e presente quando se fala de infertilidade feminina. Cada vez mais mulheres jovens optam por priorizar a sua educação e carreira profissional em detrimento da constituição de família [42, 43].

No entanto, este retardamento da concepção pode ter consequências na capacidade reprodutiva da mulher pois com a idade, a reserva ovocitária, bem como a sua qualidade diminui, devido à falha de mecanismos que controlem a divisão celular, o que por sua vez leva à perda de competência genética dos embriões e a uma maior chance de abortamento [38, 40, 42].

Tal como referido anteriormente, a infertilidade feminina é uma doença multifatorial. Estes fatores, por sua vez, podem causar infertilidade através de alterações ovulatórias, tubares, uterinas ou até mesmo devido à presença de mais de uma alteração em simultâneo [38, 44, 45].

Os fatores ovulatórios, também designados fatores hormonais, são disfunções ováricas resultantes de anomalias no eixo hipotálamo-hipófise-ovário e glândulas endócrinas periféricas (hipotireoidismo), da doença do ovário policístico, ou de disfunções metabólicas. Estas anomalias podem levar à anovulação, a disfunções do ciclo resultantes de baixa reserva e qualidade de ovócitos e a má resposta endometrial [46, 47].

A OMS definiu, para mulheres com disfunções anovulatórias, 4 grupos distintos de acordo com o fator causador da disfunção. O grupo I engloba mulheres com transtorno de anovulação hipogonadotrófica hipogonadal. O grupo II reúne mulheres com distúrbios de anovulação normogonadotróficos normoestrogenémicos. O Grupo III reúne mulheres com distúrbios de anovulação hipergonadotróficos. O quarto e último grupo é referente a mulheres com anovulação hiperprolactinémica, ou seja, com níveis elevados de prolactina [46].

A infertilidade por fator tubárico (IFT) é responsável por 25%-35% dos casos de infertilidade feminina e a sua causa mais frequente é a obliteração das trompas de Falópio devido a uma infeção provocada por um agente sexualmente transmitido, *Chlamydia trachomatis* ou *Neisseria gonorrhoeae*, que levam ao aparecimento da doença inflamatória pélvica (DIP) [48, 49].

A DIP, por sua vez, causa inflamação e danos a longo prazo nas trompas, podendo dar origem a salpingite ístmica nodosa, fimose fimbrial, aglutinação fimbrial, obstrução parcial ou total das trompas de falópio e hidrossalpinge [50, 51].

Episódios repetidos de DIP podem levar ao aumento da incidência da infertilidade, sendo que, após um episódio, a sua incidência é de 10%-12%, após dois episódios 23%-35% e 54%-75% após o terceiro episódio. Além disso, a probabilidade de gravidez ectópica aumenta significativamente após cada episódio de DIP [50].

Endometriose é uma condição que está associada à IFT e consiste na presença de glândulas e estroma endometrial fora do útero. As células endometriais disseminadas podem levar a uma alteração do sistema imune humoral e celular, o que por sua vez causa inflamação crónica pelas citocinas reativas e pelas quimiocinas produzidas pelo endométrio ectópico resultando em danos semelhantes aos observados na DIP. A endometriose é responsável por 7% a 14% dos casos, em mulheres com IFT [50, 52].

As infeções tubáricas responsáveis pela IFT podem ser divididas em salpingite primária e secundária. A primária deve-se a uma infeção ascendente a partir do canal cervical e a secundária a um processo de infeção na cavidade abdominal [48].

A infertilidade por fator uterino pode ser definida como a condição resultante da completa ausência ou não funcionamento do útero, provocada por anomalias congénitas e adquiridas, que incluem agenesia uterina, histerectomias, malformações uterinas, pólipos, miomas, adenomioses, sinequias e irradiação uterina [53, 54].

No caso das mulheres que apresentem uma total ausência de útero, esta condição deve-se a uma falha no processo de organogénese que ocorre entre a oitava e décima sexta semana de gestação. Neste processo, os canais de Muller desenvolvem-se e fundem dando origem à parte superior da vagina, cérvix e útero. Após os canais se fundirem, forma-se a cavidade uterina e um único cérvix. Qualquer falha neste processo levará a anomalias uterinas congénitas [54, 55].

Os tratamentos em casos de ausência completa de útero são ainda limitados. O transplante uterino surge como o primeiro tratamento para casos de infertilidade do fator uterino absolutos. No entanto, apesar da evolução constante deste tipo de procedimentos, ainda se encontram numa fase muito inicial [50, 54].

Ao contrário de outros tipos de transplantes, como do fígado e rins, os transplantes uterinos não são supostos durar toda a vida da recetora. O objetivo do útero transplantado é apenas de permanecer *in situ* durante as gravidezes pretendidas (normalmente uma ou duas), pois durante o tempo de manutenção do transplante e gravidez a recetora necessita de estar imunossuprimida. Após o término da gravidez o excerto é removido de modo a diminuir os efeitos secundários da imunossupressão a longo prazo e a evitar a ocorrência de rejeição crónica e severa [54].

1.2. Técnicas de Procriação Medicamente Assistida (PMA)

1.2.1. Espermograma

Uma suspensão concentrada de espermatozoides mantidos nos epidídimos é utilizada para produzir a ejaculação. O fluido prostático é adicionado à mistura e utilizado para a diluir na uretra, finalmente, a secreção das vesículas seminais é esvaziada, produzindo assim o esperma [4].

O espermograma, ou avaliação da amostra seminal, é uma técnica que permite analisar a qualidade e função espermática do homem de modo a determinar o tratamento adequado para a subfertilidade masculina [4].

Este exame permite avaliar a função reprodutora masculina e a permeabilidade do trato genital, o que por sua vez viabiliza uma estimativa geral do potencial de fertilidade do homem. A avaliação clínica do homem, juntamente com as análises do sêmen, possibilitam uma escolha mais assertiva e ponderada do tratamento a realizar pelo casal infértil por parte do clínico [4].

Vários aspetos podem influenciar as características do ejaculado, por exemplo, o tamanho dos testículos está diretamente relacionado com o número total de espermatozoides produzidos por dia, o que por sua vez está também relacionado com a morfologia espermática. O estado endócrino, a medicação que o homem esteja a tomar e suplementos ou medicação não prescrita como esteroides anabólicos podem contribuir para a variação na composição do sêmen [4].

Num espermograma realiza-se uma análise macroscópica e uma análise microscópica ao esperma (como referido em **1.1.2**) [4].

A análise da amostra seminal é o passo inicial e também o mais essencial na avaliação da fertilidade masculina e na determinação da gravidade da infertilidade do fator masculino [56].

1.2.2. FIV

A fertilização *in vitro* (FIV) é uma técnica de PMA comumente utilizada. Este procedimento foi inicialmente desenvolvido de modo a servir de tratamento para mulheres com doença tubárica severa. No entanto, atualmente é vastamente utilizada em outras situações como, infertilidade severa do fator masculino, endometriose, disfunção ovulatória, reserva ovárica reduzida e em casos em que a causa da infertilidade não pode ser determinada [57-59].

Esta técnica ganhou destaque quando, em 1978, na Inglaterra, nasceu o primeiro ser humano a partir de FIV. Desde então, houve uma enorme evolução do seu procedimento, principalmente devido à transição para a estimulação controlada dos ovários ao invés da recolha de apenas um ovócito a partir de uma mulher com um ciclo menstrual normal. Esta alteração permitiu maximizar o número de ovócitos recuperados e, conseqüentemente, levou a um grande aumento do sucesso da FIV [57-60].

Atualmente, esta técnica é composta por cinco passos principais, estimulação ovárica controlada, recuperação dos ovócitos, fertilização, cultura de embriões e transferência dos embriões. Caso se formem embriões em excesso, poderá ser realizado um passo extra de criopreservação por vitrificação para posterior transferência [57].

Apesar dos enormes avanços nos procedimentos de FIV que permitiram um aumento significativo do sucesso desta técnica, várias otimizações podem ainda ser realizadas. Futuramente, uma abordagem mais individualizada no tratamento de mulheres submetidas a hiperestimulação ovárica, através da identificação de biomarcadores de desenvolvimento embrionário e da otimização dos meios de cultura poderá ser realizada de modo a melhorar a qualidade dos ovócitos e dos embriões e as taxas de gravidez e de implantação [58].

1.2.3. ICSI

O início do desenvolvimento das técnicas que viriam a culminar na ICSI praticada atualmente, começou em finais da década de 80 como um modo de tratamento para casais com menos de 5×10^5 espermatozoides moveis progressivos e até mesmo com azoospermia, que não podiam realizar tratamentos de FIV. Por esse motivo, foi introduzida uma primeira técnica designada *partial zona dissection* (PZD), que consistia numa pequena abertura na zona pelúcida (ZP), permitindo o acesso direto do esperma à membrana do ovócito. No entanto, os seus resultados demonstraram-se inconsistentes e pouco satisfatórios [61, 62].

Como alternativa, foi desenvolvida a técnica de *subzonal insemination* (SUZI) que consiste na microinjeção de alguns espermatozoides móveis através do espaço perivitelino. Apesar do aumento da taxa de fertilização relativamente à PZD, as taxas de fertilização de ambas as técnicas continuavam a ser demasiado reduzidas [61, 62].

A ICSI consiste na injeção de um único espermatozoide, o que apresenta maior potencial de fertilização, no ovócito maduro [63].

Esta técnica foi introduzida em 1992 como um método para tratar casais com infertilidade severa do fator masculino, no entanto nas últimas décadas a sua popularidade tem aumentado entre pacientes com outros tipos de infertilidade [64]. Apesar de alguns estudos demonstrarem que, tanto a ICSI como a FIV, são igualmente eficazes conforme a sua aplicação, tanto na taxa de fecundação como de implantação, esta primeira tem sido apontada para o tratamento de casais com infertilidade inexplicada ou com baixa produção de ovócitos, (por exemplo, em casos de idade materna avançada) [63-65].

A característica que permite que a ICSI seja uma técnica tão revolucionária e a distinga da FIV é a capacidade de se realizar a inseminação de um ovócito em casos de fator masculino grave, nomeadamente quando determinadas características do sémen, como a concentração, morfologia e motilidade de espermatozoides, se encontram abaixo dos valores de referência. Isto é possível por ser realizado preliminarmente ao procedimento de ICSI, uma seleção dos espermatozoides com maior qualidade [62, 63].

Os espermatozoides podem ser obtidos de duas formas: através do ejaculado obtido por masturbação ou por meio de biópsia testicular. A biópsia testicular é utilizada em casos de infertilidade por obstrução dos canais excretórios, como por exemplo, pela ausência bilateral congénita dos canais deferentes, reversão de vasectomia falhada ou vasoepididimostomia. Além disso, a biópsia testicular também pode ser utilizada em casos de azoospermia não obstrutiva, como disfunção testicular grave em resultado de aplasia incompleta das células germinativas, síndrome de células de *Sertoli*, hipospermatogénese ou maturação incompleta [66].

Atualmente, os métodos de seleção utilizados pré-ICSI dependem de mecanismos de separação por morfologia e motilidade e incluem técnicas como *swim up* e centrifugação por gradiente de densidade. Contudo, estas técnicas não são capazes de discernir entre espermatozoides com DNA normal e danificado, sendo que poderão ser inseminados ovócitos com espermatozoides com DNA danificado, o que por sua vez levará a uma percentagem considerável de embriões com falhas no seu desenvolvimento [63, 67].

Para além da sua utilidade em casos graves de fator masculino, a ICSI pode também ser utilizada em casais com VIH/VHC (vírus da imunodeficiência humana/ vírus da hepatite C), em casos em que os ovócitos têm um número reduzido e uma morfologia deficiente, em casos de excesso de polispermia (fertilização do ovócito por mais de um espermatozoide [68]), quando a ZP é demasiado densa e quando é necessária a realização de diagnóstico genético pré-implantação (DPGI) [66].

O DGPI consiste na análise genética de embriões através da extração de um ou dois blastómeros com núcleos visíveis, idealmente ao terceiro dia de cultura, ou casualmente em blastocistos (5º-6º dia de cultura) com biopsia de quatro a oito células. Os embriões são obtidos através de ICSI, de modo a reduzir o risco de contaminação paternal, que ocorre em casos de FIV convencional provocado pelos espermatozoides presos na ZP [69-71].

Este tipo de análise permite que embriões não afetados sejam transferidos para o útero da mulher e possibilita que casais com doenças genéticas tenham filhos saudáveis e não lhes transmitam a doença [69, 70].

1.2.4. Desenvolvimento embrionário

O desenvolvimento embrionário inicia-se com a finalização da meiose II no ovócito e, conseqüentemente, com a fusão dos pronúcleos (PN) haploides feminino e masculino no zigoto. Os processos que se seguem incluem reprogramação, clivagens sequenciais, a segregação mitótica dos cromossomos e a ativação do genoma embrionário [72].

O entendimento dos processos que levam ao desenvolvimento embrionário pré-implantação são importantes em PMA pois permitem a seleção dos melhores embriões no momento da transferência que proporcionem um aumento das taxas de sucesso das gravidezes [3].

Contudo, estes mecanismos celulares e moleculares não são totalmente entendidos. Com o conhecimento atual destes processos ainda não é possível garantir a formação de embriões totalmente saudáveis sem alterações genéticas e epigenéticas indesejáveis que ocorrem durante a cultura *in vitro* [73].

Atualmente, as estratégias utilizadas na avaliação da potencialidade embrionária para implantação e gravidez recorrem a um sistema de classificação baseado na morfologia dos embriões em certos marcos temporais (**Tabela 2**) [74].

Tabela 2: Timing e estágio de desenvolvimento esperado dos ovócitos fertilizados e embriões. Adaptado de *The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting* [2]

<i>Tipo de observação</i>	<i>Timing (horas pós inseminação)</i>	<i>Estágio de desenvolvimento esperado</i>
Verificação da fertilização	17±1 h	Estágio pronuclear
Verificação da singamia	23±1 h	50% em singamia (até 20% podem estar na fase de 2 células)
Verificação da clivagem inicial	26±1 h pós ICSI	Estágio de duas células
	28±1 h pós FIV	
Avaliação de embriões de segundo dia	44±1 h	Estágio de 4 células
Avaliação de embriões de terceiro dia	68±1 h	Estágio de 8 células
Avaliação de embriões de quarto dia	92±1 h	Mórula
Avaliação de embriões de quinto dia	116±1 h	Blastocisto

1.2.4.1. Avaliação da fecundação e clivagem inicial (Dia 1)

A avaliação do desenvolvimento embrionário inicia-se com a avaliação da fecundação. De acordo com os consensos de Istambul, um ovócito fecundado deve conter dois PN e dois glóbulos polares (GP) [2]. Caso seja realizada ICSI, a avaliação da fertilização ocorre 16-18 horas após a inseminação, enquanto nos casos de FIV, esta ocorre 18-20 horas após a inseminação [75]. Estas diferenças nos tempos de avaliação devem-se ao facto de a ICSI permitir que o espermatozoide ultrapasse a ZP, havendo evidências que demonstram uma rápida fusão do espermatozoide com o citoplasma do ovócito. Por outro lado, a FIV convencional está associada a um maior intervalo de tempo até à fertilização, uma vez que o contacto entre o espermatozoide e o ovócito não é imediato, sendo necessário atravessar a coroa radiata e a ZP [76].

Posteriormente, é necessário realizar uma avaliação da fertilização de modo a identificar possíveis anomalias [77].

O número de PN é um dos critérios a avaliar pois, embriões com um número de PN diferente de 2, estão associados a uma maior taxa de aneuploidias e ativação da partenogénese (em casos com menos de 2PN) [77-79].

Vários fatores morfológicos como a simetria e alinhamento dos PN, são importantes na análise da qualidade embrionária, sendo que estes devem ter tamanho semelhante, estar muito próximos um do outro e localizados centralmente no ovócito fertilizado [2, 76, 77]

Anomalias no posicionamento periférico, afastamento e tamanho irregular dos PN podem também ser indicativos de menor qualidade embrionária [76, 77].

Além disso, também é necessário ter em consideração o número, simetria e a posição relativa dos corpos precursores nucleolares (CPN) que se encontram nos PN. Preferencialmente, cada pronúcleo deve conter cinco a sete CPNs, com distribuições equivalentes em ambos. Qualquer desvio na quantidade ou na disposição dos CPNs dentro dos PN é considerado anormal [2, 76, 77].

1.2.4.2. Avaliação de embriões em fase de clivagem (dias 2 e 3)

Com o objetivo de selecionar os embriões de maior qualidade para serem transferidos, otimizando a eficiência clínica e minimizando o risco de gravidezes múltiplas, estes são selecionados tendo como base a sua morfologia e o número de células que poderão refletir o seu potencial de desenvolvimento [76, 80].

Embriões que atingem o estágio de 4 células e apresentam menos de 10% de fragmentação celular no segundo dia têm um maior potencial de implantação em comparação com embriões que possuem um número diferente de blastómeros e/ou um grau de fragmentação maior. Observações semelhantes feitas em transferências ao terceiro dia indicam que a seleção de embriões de 8 células sem ou com poucos fragmentos celulares estão associadas a altas taxas de implantação. [76, 77, 80, 81].



Figura 1: Desenvolvimento embrionário durante a fase de clivagem (dias 2 e 3): **(A)** Estágio de 2 células; **(B)** Estágio de 4 células; **(C)** Estágio de 8 células. Adaptado de *Niakan et al.* [3].

Vários fatores podem resultar na diminuição do sucesso do desenvolvimento embrionário. A fragmentação, que consiste na formação de estruturas citoplasmáticas extracelulares anucleares de origem blastomérica delimitadas por membrana celular, é um destes fatores [2, 82].

Embriões que apresentem mais de 10% de fragmentação têm um desenvolvimento considerado anormal e estão mais propícios a interrupção da clivagem e degeneração por apoptose, sendo que embriões com uma taxa elevada de fragmentação raramente resultam em gravidez. Este parâmetro apresenta três níveis de fragmentação distintos: ligeiro (<10%), moderado (10-25%) e grave (>25%) [83, 84].

A multinucleação consiste na presença de dois ou mais núcleos, ou núcleos fragmentados, num único blastómero [85]. A sua ocorrência é atribuída a diferentes mecanismos, como a fragmentação parcial do núcleo, falhas na citocinese e migração defeituosa dos cromossomas durante a anáfase [85, 86].

A presença de multinucleação nos embriões está associada ao aparecimento de anomalias cromossômicas, aumento da fragmentação e a um maior número de blastómeros ao segundo e terceiro dia. Estas alterações no desenvolvimento embrionário podem resultar num tamanho irregular das células, à interrupção do seu desenvolvimento e a taxas de gravidez e nascimento inferiores [86, 87].

A clivagem celular irregular representa outro fator que afeta o desenvolvimento embrionário, através da formação de blastómeros de tamanhos diferentes. Esta deficiência está confirmada que afeta negativamente a capacidade de desenvolvimento do embrião e, consequentemente o resultado da gravidez, estando associada a fenómenos de multinucleação, anomalias cromossômicas ou até a uma distribuição desigual de proteínas, mRNA (traduzido do inglês *messenger ribonucleic acid*), mitocôndrias, entre outros componentes celulares nos embriões [2, 88].

O indicador mais importante da viabilidade embrionária é a divisão celular, sendo que embriões de boa qualidade necessitam de apresentar cinética e sincronia adequadas durante a divisão. Em condições normais, a divisão celular ocorre a cada 18-20h, sendo que embriões que se dividam demasiado cedo ou demasiado tarde apresentam uma pior taxa de implantação e poderão apresentar defeitos metabólicos e/ou cromossômicos [2, 89].

Os embriões podem ser classificados como “lentos”, “normais” ou “acelerados” consoante a sua taxa de divisão celular. Embriões que apresentem 6 ou menos células

ao 3º dia de desenvolvimento ($68\pm 1h$ pós inseminação) são considerados “lentos”. Embriões “normais” são aqueles que alcancem 7-9 células no dia 3, apresentem <15% de fragmentação sem multinucleação e que tenham sofrido clivagem nas últimas 24h. Um embrião “acelerado” contém mais de 9 blastómeros ao 3º dia. Adicionalmente, um embrião pode também ser considerado “detido” caso não tenha realizado clivagem nas últimas 24h [2].

A avaliação morfológica de embriões em fase de clivagem (dias 2-3) pode também incluir parâmetros adicionais como, a vacuolização [89], granulosidade citoplasmática e aparência da membrana [2, 77].

Tabela 3: Classificação dos embriões em fase de clivagem. Adaptado de *The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting* [2]

Nota	Classificação	Descrição
1	Bom	<10% de fragmentação
		Tamanho das células adequado ao estágio em que se encontra
		Ausência de multinucleação
2	Razoável	10-25% de fragmentação
		Tamanho de maior parte das células adequado ao estágio em que se encontra
		Ausência de multinucleação
3	Fraco	>25% de fragmentação
		Tamanho celular não adequado ao estágio em que se encontra
		Presença de multinucleação

1.2.4.3. Fase de mórula e blastocisto

A fase de formação da mórula é um dos passos mais negligenciados do desenvolvimento embrionário, em parte devido à necessidade de não se observar demasiado os embriões, para evitar a sua remoção do ambiente controlado da estufa, e da falta de um sistema de classificação definitivo da sua morfologia. No entanto, com a introdução das tecnologias de time-lapse, tornou-se possível visualizar os embriões e os eventos morfocinéticos chave que ocorrem durante o seu desenvolvimento, sem o condicionar [76, 77, 90].

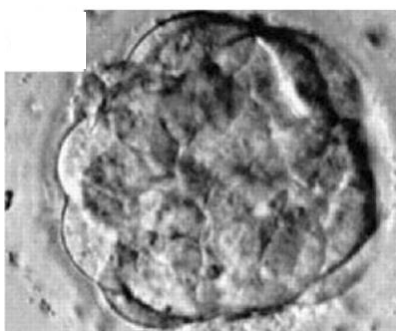


Figura 2: Desenvolvimento embrionário durante a fase de mórula (dia 4), caracterizada pela presença de um aglomerado de blastómeros compactados e contidos no interior da ZP. Adaptado de *Niakan et al.* [3].

Por este motivo, novos sistemas de classificação da qualidade embrionária ao quarto dia têm surgido, com base na proporção de blastómeros em compactação, na morfologia da massa multicelular e também na quantidade de fragmentação. Apesar de estudos apontarem que este tipo de sistema de classificação poderia ser adotado e aplicado com sucesso, a sua utilização ainda não foi amplamente aceite [76, 77, 91].

O estudo do blastocisto, em semelhança às outras fases, é feita com base em critérios morfológicos, sendo eles a extensão da expansão do blastocélio e a qualidade da MCI e da TE [2, 92]. O desenvolvimento da trofotoderme (TE) indicará a capacidade do embrião para se fixar e implantar no endométrio, enquanto o desenvolvimento da massa celular interna (MCI) é essencial para o crescimento do feto [2].

A avaliação da qualidade embrionária na fase de formação do blastocisto é importante porque permite a sua análise após a ativação do genoma embrionário, a uma seleção dos embriões mais viáveis e à redução do número de embriões transferidos, evitando assim a ocorrência de gestações múltiplas [93].

Gardner e Schoolcraft [94] inicialmente desenvolveram um sistema de classificação que se baseava no grau de desenvolvimento e expansão do blastocélio e na morfologia da TE e MCI. Com a expansão do embrião, estas duas estruturas ficavam mais evidentes e entendeu-se que seria necessário atribuir-lhes pontuações independentes [2, 93].

Tanto a TE como a MCI passaram a ser avaliadas numa escala de classificação alfabética (**Tabela 4**) [2].

Tabela 4: Classificação de *Gardner e Schoolcraft* para a qualidade embrionária na fase de blastocisto. Adaptado de *The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting* [2]

Massa celular interna	A	✓ MCI densamente compactada com muitas células
	B	✓ MCI pouco compacto com muitas células
	C	✓ MCI com muito poucas células
Trofecoderme	A	✓ TE com muitas células formando um epitélio coeso
	B	✓ TE com poucas células formando um epitélio solto
	C	✓ TE com muito poucas células

Este sistema foi posteriormente atualizado para incluir a pontuação D (células degenerativas) para a avaliação da TE e, D e E para a avaliação da MCI [2].

Em 2010, com os consensos de Istambul, foi estabelecido que um blastocisto idealmente desenvolvido encontrar-se-á, ao quinto dia ($116 \pm 2h$), totalmente expandido com uma MCI proeminente, facilmente distinguível e constituído por muitas células compactadas e aderidas firmemente. Além disso, deverá apresentar também uma TE constituída por um elevado número de células de modo a formar um epitélio coesivo [2].

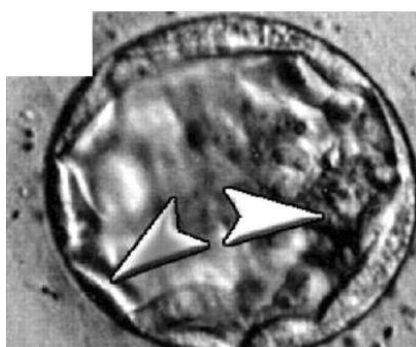


Figura 3: Desenvolvimento embrionário durante a fase de blastocisto (dia 5). O blastocisto é caracterizado pelo aparecimento de uma cavidade na sua região central (blastocélio) e pela diferenciação da MCI e da TE. Adaptado de *Niakan et al.* [3].

Nesse encontro, um novo sistema de classificação baseado na escala de *Gardner* foi estabelecido, contudo esta seria convertida numa escala numérica de modo a facilitar a introdução de dados em bases de dados numéricas e facilitar a análise estatística (Tabela 5) [2].

Tabela 5: Classificação do estágio de desenvolvimento e da qualidade da MCI e TE. Adaptado de *The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting* [2]

	Nota	Classificação	Descrição
Estágio de desenvolvimento	1		✓ Inicial
	2		✓ Blastocisto
	3		✓ Expandido
	4		✓ Eclodido
ICM	1	Bom	✓ Proeminente, facilmente discernível, com muitas células compactadas e firmemente aderidas umas às outras
	2	Razoável	✓ Facilmente discernível, com muitas células que estão agrupadas de forma solta.
	3	Fraco	✓ Difícil de discernir, com poucas células
TE	1	Bom	✓ Muitas células que formam um epitélio coeso
	2	Razoável	✓ Poucas células formando um epitélio solto
	3	Fraco	✓ Muito poucas células

1.2.5. Tecnologia time-lapse

A cultura *in vitro* de embriões sofreu imensas melhorias nos últimos anos. Desde o desenvolvimento de novos meios de cultura e incubadoras, estas novas tecnologias têm permitido o crescimento de embriões até à fase de blastocisto rotineiramente. Contudo, o desenvolvimento de técnicas que permitam a avaliação da competência no desenvolvimento embrionário tem-se demonstrado significativamente mais lento [95].

A determinação da viabilidade e qualidade do embrião é fundamental para o sucesso do tratamento de FIV. Desde o surgimento da FIV, a análise morfológica tem sido amplamente utilizada para escolher os embriões mais desenvolvidos e competentes de um grupo disponível [96, 97].

Anteriormente à tecnologia de time-lapse, os embriões eram retirados da incubadora uma vez por dia para avaliar a clivagem e a morfologia, no entanto, este método tem as suas desvantagens, pois implica uma manipulação frequente do embrião e uma exposição repetida a condições potencialmente nocivas fora da incubadora. Além disso, este tipo de monitorização apenas permite obter uma imagem instantânea de um processo dinâmico [95-98].

Esta avaliação estática do embrião em momentos pré-determinados apresenta limitações evidentes, como grande variação nos resultados entre diferentes observadores e até do mesmo observador, além de não ser capaz de detetar eventos cruciais que podem afetar negativamente a viabilidade do embrião [95-98].

Com a introdução dos sistemas de time-lapse, este problema foi resolvido, pois esta nova tecnologia permitiu acompanhar o desenvolvimento embrionário de forma contínua, através da captura automatizada de imagens a cada 5-20 minutos [95-98].

Esta visualização contínua dos embriões sem a necessidade da sua remoção da incubadora trouxe duas grandes vantagens relativamente à monitorização tradicional, sendo a primeira a quantidade de informação extra que permitiu obter sobre a cinética do desenvolvimento e marcadores fenotípicos, devido à presença de uma câmara na incubadora que tira fotos dos embriões em intervalos pré-definidos [95-98].

A utilização de parâmetros morfocinéticos, ou seja, a duração dos ciclos celulares e os momentos das mudanças morfológicas embrionárias, que são medidos a partir do momento da inseminação, foi demonstrada em vários estudos tendo um impacto positivo nas taxas de implantação e gravidez, na capacidade de prever a formação de blastocistos e na seleção de embriões [95-98].

A segunda vantagem destes sistemas é que a classificação dos embriões pode ser realizada sem retirá-los da incubadora. Isso permite que os embriões permaneçam num ambiente menos perturbado, sem variações no pH, luminosidade, temperatura, humidade e composição gasosa, que são comuns na avaliação diária tradicional dos embriões [95-98].

Por estes motivos vários laboratórios clínicos de FIV começaram a adquirir sistemas de time-lapse [95-98].

Atualmente existem três sistemas de imagiologia de time-lapse utilizados em laboratórios de embriologia clínica, sendo eles, Primo Vision, EmbryoScope e Eeva. Todos estes sistemas apresentam um microscópio invertido digital que captura imagens dos embriões a 5-20 minutos. Estas imagens são então processadas e convertidas em vídeos que podem ser revistos para uma análise detalhada [95, 98].

Os três sistemas apresentam diferenças na fonte de luz utilizada e na maneira como os embriões são posicionados para serem visualizados, ou seja, o sistema pode manter a placa de cultura imóvel ou movimentá-la constantemente com os embriões [95, 98].

2. Objetivos

A ICSI é a técnica de PMA mais comumente utilizada em centros de fertilidade a nível global [62, 63, 99], sendo especialmente importante em casos de fator masculino grave, como por exemplo, concentração, morfologia e motilidade de espermatozoides abaixo dos valores de referência [4, 61-63, 100].

Tendo isto em consideração, o objetivo deste trabalho consiste na comparação das taxas de fecundação, formação de blastocistos e implantação de casais que realizaram ICSI, com mulheres dos grupos etários ≤ 35 anos e > 35 anos e homens com 0%, 1-2% ou 3-4% de espermatozoides morfologicamente normais. Em suma, este estudo pretende avaliar de que modo estes fatores (idade da mulher e morfologia) influenciam a taxa de sucesso do procedimento de ICSI.

Serão formados 6 grupos de casais, distribuindo as mulheres pelos dois grupos etários (≤ 35 e > 35) e os homens de acordo com os intervalos de morfologia referidos anteriormente (0%, 1- 2%, 3-4%).

Também se procederá à comparação entre as taxas de sucesso da transferência de embriões a fresco (TEF) e a transferência de embriões criopreservados (TEC).

3. Métodos

3.1 Trabalho laboratorial

Na duração do estágio curricular, todo o material utilizado, tanto laboratorial como biológico, foi cedido pelo CEIE.

As placas de cultura foram preparadas na véspera da sua utilização com o meio de cultura adequado, garantindo o equilíbrio da temperatura (37°C) e pH, sendo cobertas com parafina líquida (OVOIL™, Vitrolife), à exceção das placas utilizadas na transferência embrionária.

As estufas utilizadas para a manutenção das células (gâmetas e embriões) e dos meios de cultura encontravam-se a 37°C com 6% de CO₂ e 5% de O₂.

Com exceção do procedimento de avaliação da qualidade espermática (espermograma), todos os procedimentos foram realizados em ambiente assético.

Após a realização dos procedimentos de FIV e ICSI, os embriões foram colocados em placas de time-lapse para serem incubados no equipamento Geri+.

3.2 Espermograma

A amostra seminal utilizada na avaliação da qualidade espermática foi obtida por masturbação, na sala de colheitas perto do laboratório, para um frasco estéril de recolha de fluidos biológicos com identificação do respetivo paciente e do número do espermograma.

Este exame deve ser realizado após um período de 2 a 3 dias de abstinência sexual.

Após a colheita da amostra seminal, esta foi transportada para o laboratório de andrologia e colocada dentro de uma estufa a 37°C até completar a liquefação. A amostra foi colocada numa placa de aquecimento, também a 37°C, de modo a manter uma temperatura adequada que não comprometa nenhum dos parâmetros avaliados durante o espermograma.

3.2.1 Parâmetros Macroscópicos

3.2.1.1 Volume

A medição do volume da amostra foi realizada recorrendo a uma pipeta serológica. O valor mínimo de referência é de 1,5mL.

3.2.1.2 pH

O valor do pH foi obtido mergulhando uma fita indicadora de pH na amostra seminal ou espalhando uma gota da amostra na fita e comparando a cor exibida com as de referência presentes na embalagem. Apesar de ser um parâmetro com pouco interesse clínico, a OMS definiu um valor de referência de 7,2, sendo que valores inferiores podem ser indicativos de falta de fluido seminal alcalino ou contaminação por urina.

3.2.1.3 Cheiro

O odor da amostra seminal deve ser *sui generis*, sendo que um forte odor a urina ou putrefação deve ser registado.

3.2.1.4 Viscosidade

Para avaliar a viscosidade do ejaculado, é necessário aspirá-lo com uma pipeta serológica e permitir que este caia por ação da gravidade. Uma amostra seminal que caia gota a gota é considerada normal. Caso ela forme um fio de mais de 2cm, significa que apresenta uma viscosidade anormal.

3.2.1.5 Aspeto visual

O aspeto visual do ejaculado permite estimar a sua concentração. Uma aparência homogénea, de cor creme/cinzento opaco é indicativa de uma concentração elevada de espermatozoides, enquanto uma cor menos opaca pode significar que a amostra apresenta uma menor concentração.

A cor do ejaculado pode fornecer informações sobre outras características. Uma cor amarelada pode indicar um tempo de abstinência elevado, enquanto uma cor vermelha acastanhada pode indicar presença de eritrócitos. Caso apresente uma cor amarelo-clara pode significar que o paciente consome vitaminas ou drogas. Quando o ejaculado

é completamente transparente, é necessário averiguar se o paciente atingiu o orgasmo durante a recolha, pois pode estar apenas presente a amostra pré-ejaculado das glândulas de Cowper.

3.2.1.6 Liquefação

Logo após a ejaculação, o ejaculado é tipicamente uma massa semissólida coagulada e gelatinosa. O frasco de colheita foi colocado na estufa a 37°C de modo a facilitar a sua liquefação.

Primeiramente, durante o processo de liquefação, forma-se uma mistura homogénea de grumos semi-sólidos no fluido, de seguida o ejaculado começa a ficar mais homogéneo e menos viscoso até só sobraem pequenas áreas de coagulação.

3.2.2 Parâmetros microscópicos

3.2.2.1 Motilidade

A motilidade deve ser avaliada logo após liquefação da amostra de modo a evitar desidratação e variações induzidas pelo pH ou temperatura [101].

A avaliação da motilidade foi realizada colocando uma gota de 10µL de amostra seminal numa lâmina previamente aquecida na placa de aquecimento e cobrindo-a com uma lamela. De seguida, foi observada ao microscópio de contraste de fase e realizaram-se duas contagens de 200 espermatozoides.

A contagem deve ser realizada evitando áreas perto das bordas da lamela e devem ser utilizados pelo menos 5 campos distintos de modo a evitar a visualização da mesma área.

Os espermatozoides podem ser classificados em 4 categorias: progressivos rápidos, quando se movem ativamente percorrendo uma distância de pelo menos 25µm/min; progressivos lentos, quando se movem ativamente percorrendo uma distância de 5-25µm/min; *in situ*, quando se movem ativamente, mas sem progressão; imóveis, quando não há qualquer movimento.

3.2.2.2 Vitalidade

A vitalidade dos espermatozoides pode ser estimada através da determinação da integridade da membrana celular.

O teste de coloração com eosina Y tem como base esse mesmo princípio. Inicialmente, num tubo de ensaio foram pipetados 10µL da amostra e 10µL de eosina Y e aguardou-se 5 minutos. De seguida, foi realizado um esfregaço e no microscópio de contraste de fase foram contados 200 espermatozoides em contraste de fase negativo. Os espermatozoides vivos apresentavam uma cor esverdeada, enquanto que os mortos apresentavam uma cor avermelhada devido à entrada do corante, pela falta de integridade da membrana celular.

Além do teste de coloração com eosina Y, também foi realizado o teste de hipoosmolaridade. Este teste parte do princípio que apenas células com membranas intactas conseguem inchar em soluções hipotónicas.

Para realizar este teste, começou-se por pipetar 10µL de amostra seminal e 90µL de solução hipoosmótica. A mistura foi colocada na estufa a 37°C durante 30 minutos. Após esse período, uma gota de 10µL da mistura foi observada ao microscópio de contraste de fase, coberta por uma lamela, e procedeu-se à contagem de 200 espermatozoides.

Espermatozoides vivos diferem dos mortos por apresentarem caudas enroladas e inchadas, enquanto os mortos mantêm a sua cauda intacta.

3.2.2.3 Concentração

A determinação da concentração iniciou-se com a diluição de 50µL de amostra seminal com uma solução fixadora. Esta diluição é determinada no início da avaliação dos padrões microscópios tendo como base o número médio de espermatozoides observados em cada campo.

De seguida, foram pipetados 10µL da solução diluída numa câmara de *Neubauer* em câmara húmida e, após 30 minutos, procedeu-se à contagem dos espermatozoides (mínimo de 200 na totalidade dos campos observados) e cálculo da concentração.

A determinação da concentração depende do número de espermatozoides contados, do fator de diluição utilizado, do número de quadrados contabilizados e do volume e profundidade da câmara de *Neubauer*.

3.2.2.4 Morfologia

Para a avaliação da morfologia foi necessário realizar inicialmente um esfregaço com 10µL da amostra seminal. Após secagem ao ar livre da lâmina procedeu-se à fixação do esfregaço em metanol e posteriormente esta foi corada com os corantes *Papanicolaou* e *Shorr*.

De seguida, recorrendo a um microscópio de campo claro, usando a objetiva de óleo de imersão (1000x), foram contados 200 espermatozoides e foi avaliada a sua morfologia de acordo com os critérios de classificação morfológica da OMS [4].

Para uma correta determinação da morfologia dos espermatozoides é necessário avaliar a morfologia específica da cabeça, peça intermédia, cauda e ainda a presença de resíduos anormais no citoplasma.

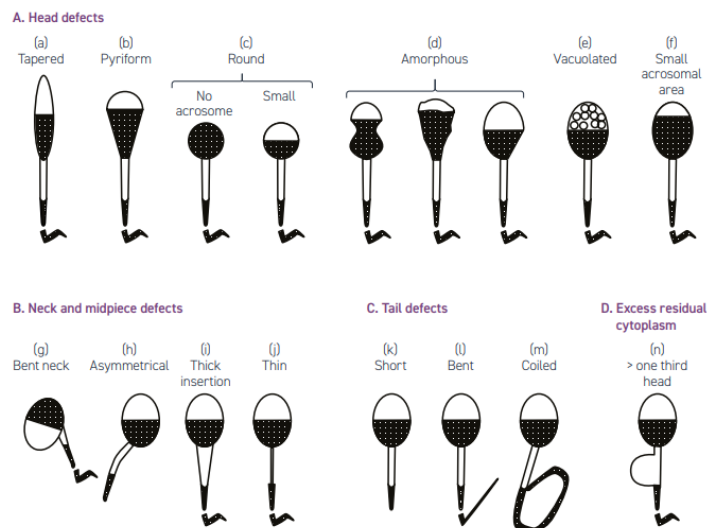


Figura 4: Imagem ilustrativa de possíveis anomalias na morfologia do espermatozoide. Adaptado de *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen* [4].

3.3 Processamento laboratorial

No começo de cada ciclo, é necessário realizar o processamento tanto dos gametas masculinos como femininos. O processamento dos gametas masculinos é importante pois permite a separação dos espermatozoides normais não só dos fatores descapacitantes presentes no plasma seminal, mas também de espermatozoides imóveis e outras células que poderão estar presentes na amostra. O processamento dos gametas femininos permite a remoção de restos celulares, vestígios de sangue e resíduos do líquido folicular que se encontrem ligados ao complexo *cumulus*-ovócito (CCO).

3.3.1 Processamento dos gametas masculinos

Após a colheita da amostra seminal do paciente, esta foi incubada por um período de aproximadamente 30 minutos numa estufa a 37°C, até à sua liquefação.

De seguida, procedeu-se à preparação dos gradientes de densidade descontínuos em tubos *falcon*. Dois tubos foram preparados, ambos com um volume final de 1mL, no primeiro pipetou-se 0,8mL de gradiente de sílica (*SpermGrad*TM, *Vitrolife*) e 0,2mL de meio de cultura (*G-IVF PLUS*TM, *Vitrolife*), para uma concentração final de 80% (v/v), no segundo pipetou-se 0,4mL de gradiente de sílica e 0,6mL de meio de cultura, perfazendo uma concentração final de 40% (v/v).

Antes de realizar o processamento, foi feita uma avaliação do volume e concentração da amostra ao microscópio de contraste de fase para determinar o volume dos gradientes que seriam utilizados.

O gradiente de concentração 80% (v/v) foi transferido cuidadosamente para baixo do gradiente de 40% (v/v) com o auxílio de uma seringa.

Assim que a amostra se encontrava liquefeita, foi colocada lentamente no topo dos dois gradientes. O tubo foi então levado a centrifugar durante 25 min, a 1000 rpm e 35°C.

Após a centrifugação, o sobrenadante resultante foi descartado e o *pellet* ressuspenso e transferido para um novo tubo de *falcon*. Para realizar uma última lavagem do *pellet*, foram adicionados 2mL de meio de cultura, previamente equilibrados a 37°C, ao novo tubo de *falcon*. Realizou-se uma centrifugação de 10 min, a 1000 rpm e 35°C, para remover os restos celulares e do gradiente de densidade ainda existentes.

Finalmente, o sobrenadante foi novamente descartado de forma a ficar apenas o *pellet* no fundo do tubo. Sem perturbar o sedimento, adicionou-se meio de cultura até um máximo de 0,5mL (volume dependente da concentração de espermatozoides e da técnica de PMA a realizar).

No *swim up*, os tubos foram colocados à temperatura ambiente, numa posição ligeiramente inclinada (45°), por um período mínimo de 30 min, permitindo a deslocação dos espermatozoides com motilidade progressiva até a superfície.

3.3.2 Processamento dos gametas femininos

Com o objetivo de obter o maior número possível de ovócitos maduros para os procedimentos de PMA, as pacientes e as dadoras foram submetidas a uma estimulação ovárica controlada.

Neste tratamento, verificou-se a inibição da ovulação natural da mulher através da administração de agonistas ou antagonistas do fator libertador de gonadotrofinas (GnRH). Os primeiros, levam à dessensibilização hipofisária, inibindo a produção de FSH e de LH, enquanto que os antagonistas de GnRH impedem a libertação destas hormonas pela hipófise.

Quando pelo menos três folículos alcançaram um diâmetro de 17mm, foi administrada gonadotrofina coriônica humana (hCG) para que atinjissem a sua maturação final e fosse induzida a ovulação. A punção folicular ocorreu 34 a 36 horas após a injeção desta hormona.

A punção transvaginal dos folículos decorreu numa das salas de tratamento do CEIE. Nesta, o ginecologista, sob controlo ecográfico, perfurou a cápsula do ovário utilizando uma agulha acoplada a um sistema de vácuo e aspirou o líquido folicular para tubos de poliestireno, previamente aquecidos a 37°C.

Após a punção, os tubos contendo o líquido folicular foram transportados para o laboratório de embriologia, onde se iniciou a pesquisa por CCO.

A pesquisa foi realizada numa bancada de fluxo laminar, com superfície aquecida a 37°C. O líquido folicular foi vertido numa placa de *Petri* e observado ao estereomicroscópio, permitindo assim a localização e isolamento dos CCO.

Os CCO encontrados foram transferidos para uma placa de lavagem de meio tamponado (*G-MOPS PLUS™*, *Vitrolife*) de modo a remover restos celulares, sangue e líquido folicular que se encontrassem ligados ao CCO.

De seguida, os ovócitos foram colocados numa placa com meio de cultura e incubados numa estufa a 37°C, com 6% de CO₂ e 5% de O₂.

3.4 Procedimento de FIV

Em ciclos de FIV, os CCO mantiveram-se em incubação por 4 a 6 horas após a punção até serem inseminados. No momento da inseminação, foi retirada uma alíquota de 10µL da amostra seminal processada para uma câmara de *Neubauer* e procedeu-se à contagem do número de espermatozoides móveis em 5 quadrados diferentes. Esta contagem teve como objetivo calcular o volume de amostra a colocar em cada poço de modo que a concentração de espermatozoides progressivos por mL fosse 1×10⁵. Para tal recorremos à fórmula:

$$V_{amostra} = \frac{1}{N} \times 1000$$

V = volume a inseminar por poço

N = número total de espermatozoides nos 5 quadrados

O volume calculado de amostra seminal foi então pipetado recorrendo a uma micropipeta, para os poços onde se encontravam os CCO. De seguida, observou-se a placa de cultura ao microscópio ótico invertido e os CCO foram incubados com os espermatozoides por um período de 17±1h.

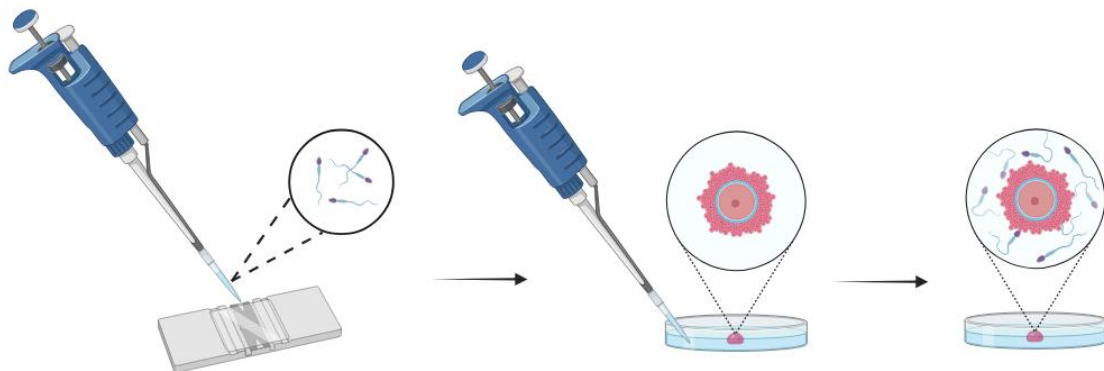


Figura 5: Imagem ilustrativa do procedimento de FIV. Após o processamento dos gâmetas masculinos, realiza-se o cálculo do volume de amostra seminal a pipetar recorrendo a uma câmara de *Neubauer*. Posteriormente, os espermatozoides são pipetados nos poços contendo os CCO. Criada com *Biorender.com*.

Após o período de incubação, procedeu-se à desnudação mecânica dos ovócitos e avaliação da fecundação, que é caracterizada pela presença de dois PN e dois GP no embrião. Os embriões viáveis foram incubados no equipamento de *time-lapse* Geri+.

3.5 Procedimento de ICSI

Em ciclos de ICSI, os CCO obtidos durante a pesquisa foram incubados por um período mínimo de 3 horas após o qual se procedeu à sua desnudação. Ao contrário do procedimento de FIV, os CCO no ciclo de ICSI não foram submetidos apenas a desnudação mecânica, mas sim desnudação enzimática seguida de desnudação mecânica.

O processo de desnudação iniciou-se com a colocação de um CCO numa gota de 80µL de enzima hialuronidase, seguida de aspirações sucessivas por um período de 20-25 segundos, de modo a dispersar o *cumulus* envolvente. De seguida, os ovócitos foram transferidos para um poço com meio tamponado onde sofreram desnudação mecânica para remover a totalidade das células circundantes.

Antes de se iniciar o procedimento de ICSI, foi necessária a preparação de uma placa de microinjeção. Com esse propósito, foram colocadas no lado direito de uma placa de Petri gotas de 5µL de meio tamponado de acordo com o número de ovócitos que seriam submetidos à microinjeção e à esquerda duas colunas de 10µL de meio polivinilpirrolidona (PVP), que têm como função diminuir a velocidade de movimentação dos espermatozoides. A placa foi então coberta com parafina líquida e incubada a 37°C na estufa até a sua utilização.

No início do procedimento de ICSI, foi colocada uma alíquota da amostra seminal, de volume dependente da concentração espermática, na primeira gota de PVP. Os ovócitos maduros obtidos durante o processamento dos gametas femininos, foram colocados nas gotas de meio tamponado.

A microinjeção foi realizada com recurso a um microscópio ótico invertido com superfície aquecida a 37°C e um conjunto de micromanipuladores que permitem a micromanipulação da micropipeta de sustentação, que tem como função imobilizar o ovócito, e de microinjeção ou ICSI, responsável por aspirar, imobilizar e microinjetar os espermatozoides.

Para a microinjeção, foi necessário primeiramente realizar a pesquisa de espermatozoides. Com recurso à pipeta de microinjeção, foram selecionados e

aspirados os espermatozoides que apresentavam a melhor morfologia e de seguida transferidos para a segunda coluna de PVP onde foram imobilizados através da quebra da sua cauda e novamente aspirados pela cauda. A imobilização dos espermatozoides tem como objetivo evitar que estes saiam de dentro do ovócito após a microinjeção.

De seguida, o espermatozoide selecionado foi transportado até à gota de meio tamponado. Aqui, o ovócito maduro encontrava-se posicionado de modo que o seu glóbulo polar estivesse localizado perpendicularmente à direção de microinjeção e imobilizado pela micropipeta de sustentação como descrito na **Figura 6**.

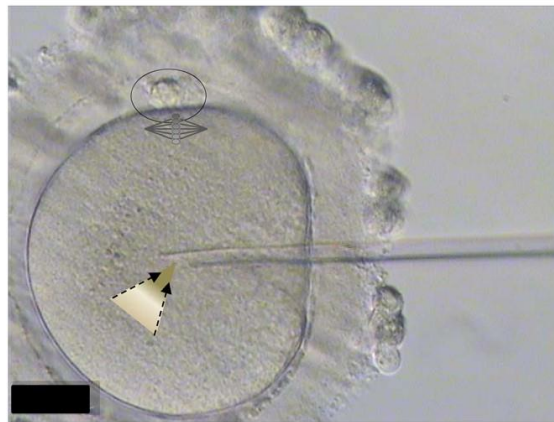


Figura 6: Imagem ilustrativa do posicionamento do ovócito no momento da microinjeção. GP posicionado às 12 horas em relação à micropipeta de microinjeção. Adaptado de *Rubino et al.* [5].

A membrana citoplasmática do ovócito foi devidamente focada e, a pipeta de microinjeção contendo o espermatozoide já na sua extremidade, foi utilizada para penetrar a ZP e a membrana citoplasmática. Já no interior do ovócito, foi aspirado um pequeno volume de citoplasma e novamente injetado juntamente com o espermatozoide.

Finalmente, a micropipeta de microinjeção foi retirada lentamente com o objetivo de evitar a saída do espermatozoide do interior do ovócito.

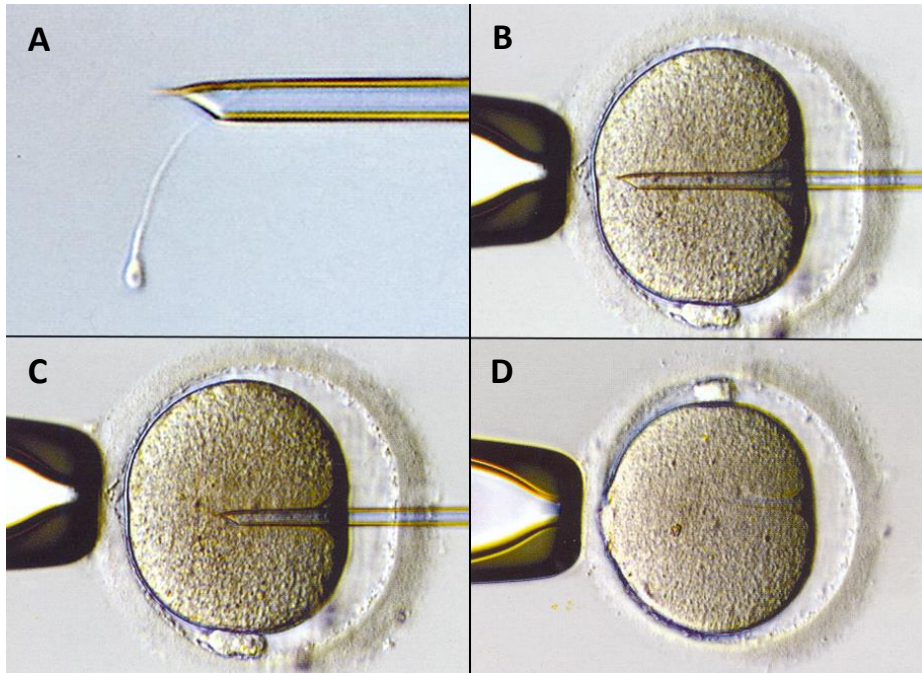


Figura 7: Imagem ilustrativa do procedimento de ICSI. **(A)** Seleção e aspiração dos espermatozoides que apresentem a melhor morfologia; **(B)** Penetração da ZP e aspiração de um pouco do citoplasma; **(C)** Injeção do citoplasma aspirado juntamente com o espermatozoide; **(D)** Remoção da micropipeta de injeção do interior do ovócito. Adaptado de *uncfertility.com* [1].

Os ovócitos inseminados foram transferidos para o equipamento de *time-lapse* Geri+ em placas de cultura próprias, onde ocorreu o desenvolvimento embrionário até ao momento da transferência.

3.6 Avaliação do desenvolvimento dos embriões

A avaliação da qualidade embrionária foi realizada com o auxílio do equipamento de *time-lapse* Geri+.

Inicialmente, foi necessário averiguar a fecundação após o procedimento de inseminação, no entanto, no contexto deste trabalho, apenas os embriões provenientes de ICSI foram considerados e, por esse motivo, a avaliação da fertilização foi realizada 16-18h após a microinjeção.

A fecundação pode ser verificada pela visualização de 2PN e 2GP (**Figura 8**).



Figura 8: Imagem ilustrativa de um embrião após inseminação. Verificamos a presença dos dois PN na região central do embrião e dos dois GP localizados na região entre a membrana citoplasmática e a ZP. Adaptado de *atlas.eshre.eu* [6].

Os embriões resultantes foram visualizados e classificados diariamente de acordo com os critérios e timings estabelecidos nos consensos de Istambul [2] e referidos na secção **1.2.4.**

Neste estudo, apenas foi relevante o estado de desenvolvimento embrionário ao 5º dia ($116 \pm 2h$). Um blastocisto idealmente desenvolvido encontrar-se-á, ao quinto dia ($116 \pm 2h$), totalmente expandido com uma MCI proeminente, facilmente distinguível e constituído por muitas células compactadas e aderidas firmemente. Além disso, deverá apresentar também uma TE constituída por um elevado número de células de modo a formar um epitélio coesivo [2].

3.7 Vitrificação e descongelação de embriões

Após um ciclo de ICSI, é possível que se obtenham mais embriões de boa qualidade do que os necessários para a transferência. Nesses casos, cabe ao casal optar por eliminá-los ou criopreservá-los. Os embriões criopreservados podem ser utilizados futuramente pelo próprio casal ou doados a um outro casal com o seu consentimento.

Os embriões foram vitrificados e descongelados seguindo o protocolo do fabricante de meios da KITAZATO® [102].

3.8 Transferência embrionária

Os embriões, após um ciclo de ICSI, podem ser transferidos a fresco ou criopreservados para serem transferidos posteriormente (como referido em 3.7).

Para a transferência de embriões a fresco (TEF) foi necessário preparar uma placa de 4 poços com um poço de 350µL de meio de carregamento (*Embryo-Glue*™, *Vitrolife*), onde foram colocados os embriões 15 minutos a 2 horas pré-transferência, e um outro poço de 500µL de meio de cultura (*G-TL*™, *Vitrolife*).

Na TEC, foi necessário preparar uma placa de 4 poços com meio de carregamento e de lavagem tal como na TEF, no entanto, foi também necessário preparar um poço com 500µL de meio de cultura coberto com parafina líquida de modo a manter os embriões incubados após descongelação.

Em casos de TEC, pelo facto da ZP poder “enrijecer” após descongelação, realizou-se a eclosão assistida através da abertura artificial da ZP com recurso a um laser.

No momento da transferência, um ou dois embriões (no máximo) foram carregados para um cateter de transferência juntamente com o meio de carregamento onde se encontravam. O ginecologista a quem foi entregue o cateter, depositou os embriões na cavidade uterina da paciente.

Finalmente, realizou-se a lavagem do cateter de modo a verificar se os embriões ficaram retidos. Caso tal aconteça, recarrega-se o cateter e realiza-se imediatamente nova transferência.

3.9 Avaliação da gravidez clínica

Doze dias após a transferência embrionária, foi realizado o exame de deteção da β -HCG. Valores de β -HCG inferiores a 6 UI/L significam que a mulher não se encontra grávida, enquanto valores superiores a 39,1 UI/L são indicativos de gravidez química.

Caso se verifique gravidez química, é realizada uma ecografia abdominal 3 semanas após a transferência embrionária para confirmar a gravidez. Para confirmar a gravidez clínica, é necessário visualizar um saco gestacional intrauterino e detetar a atividade cardíaca fetal.

3.10 Acompanhamento do casal

O acompanhamento do casal após confirmação da gravidez foi realizado por uma unidade de obstetrícia escolhida pelo próprio.

No termo da gravidez e após o parto, foi pedido ao casal que devolvesse ao centro um relatório referente às condições do parto e às características do recém-nascido. Estes documentos têm como objetivo a avaliação dos resultados médico-sanitários e psicossociológicos dos procedimentos de PMA.

4 Análise estatística

4.1 Preparação dos dados

Todos os dados utilizados no presente estudo foram recolhidos de pacientes que realizaram procedimento de ICSI no CEIE entre os anos de 2018 a 2022. De modo a serem elegíveis para participar no estudo, o membro masculino do casal necessitava de apresentar uma morfologia espermática igual ou inferior a 4% de formas normais.

Neste estudo, serão formados 2 grupos distintos referentes às idades femininas, sendo eles, mulheres com ou menos de 35 anos e mulheres com mais de 35 anos. Casais que recorram a doação de ovócitos, serão inseridos no grupo de mulheres com idade inferior ou igual a 35 anos, pois apenas são elegíveis a realizar doação ovocitária mulheres dentro deste grupo etário.

De modo a determinar quais os pacientes elegíveis para participar no estudo, foi necessário recorrer aos dados do espermograma, a fim de obter o valor da morfologia espermática. Serão incluídos apenas homens que apresentem entre 0% e 4% de espermatozoides normais.

Os dados serão separados em três grupos de morfologia distintos, 0% (muito baixa), 1-2% (moderada) ou 3-4% (elevada) de formas normais.

No presente estudo, apenas foram selecionados casais cujo membro masculino tenha realizado a colheita da amostra seminal no laboratório, com recurso a masturbação, sendo que foram excluídos casais que tenham recorrido a amostras seminais de dador, pois os critérios de seleção de dadores implicam que a sua amostra seminal apresente uma morfologia superior a 4%.

Os casais serão distribuídos em 6 grupos, de acordo com o grupo etário da mulher (idade igual ou inferior a 35 anos e idade superior a 35 anos) e com os intervalos de morfologia referidos anteriormente (0%, 1-2% e 3-4%). **(Tabela 6)**

Tabela 6: Distribuição dos casais pelos 6 grupos de acordo com a morfologia espermática do membro masculino e idade da mulher.

Idade / Morfologia	0%	1-2%	3-4%
≤35	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
>35	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6

Cada casal surge apenas uma vez no estudo, foram apenas incluídos casais heterossexuais inférteis, tendo sido excluídos casos de mulheres pelo regime single e casais de mulheres que realizaram ciclos de maternidade partilhada.

Na comparação das taxas de sucesso da TEC e TEF dos casais referidos anteriormente, foi necessário separar as amostras independentes, ou seja, casais que apenas realizaram TEF ou TEC, das amostras dependentes, casais que realizaram TEF seguida de TEC.

Na totalidade, 224 casais realizaram transferência embrionária, 135 casais recorreram apenas a TEF, 46 casais apenas a TEC e 43 casais realizaram TEF seguida de TEC.

4.2 Análise estatística dos dados

A taxa de fecundação pode ser definida como a percentagem de embriões 2PN pelo número total de ovócitos injetados [103].

$$\text{Taxa de fecundação} = \frac{\# \text{ovócitos 2PN}}{\# \text{ovócitos injetados}} \times 100$$

Neste estudo, a taxa de implantação será calculada através do número de gravidezes clínicas em função do número total de transferências de 1 ou 2 embriões.

$$\text{Taxa de implantação} = \frac{\# \text{gravidezes clínicas}}{\# \text{transferências}} \times 100$$

Os embriões serão classificados diariamente de acordo com a sua qualidade até ao 5º dia (116±2h), de modo a calcular a taxa de formação de blastocistos para cada grupo de casais.

$$\text{Taxa de formação de blastocistos} = \frac{\# \text{blastocistos no dia 5}}{\# \text{ovócitos fecundados}} \times 100$$

As fórmulas utilizadas no cálculo da taxa de fecundação, formação de blastocistos e implantação foram estabelecidas e estão descritas nos consensos de Viena [104].

A organização das bases de dados foi realizada com recurso ao Microsoft Excel [105] e ao IBM SPSS Statistics v.29 [106].

A análise estatística (descritiva e inferencial) foi realizada no IBM SPSS Statistics v.29 [106]. O nível de significância estatística definido foi de 5% ($\alpha = 0,05$).

A comparação do número médio de ovócitos injetados por grupo (idade/morfologia) foi efetuada através do teste de Anova.

Inicialmente, de modo a escolher que teste estatístico a realizar para comparar as taxas de fecundação, formação de blastocistos e implantação entre os 6 grupos, avaliou-se a normalidade da distribuição destas variáveis pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov* (**Tabela 7**).

Tabela 7: Resultados do teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov* para a taxa de fecundação, formação de blastocistos e implantação. A distribuição dos dados é considerada normal se $p > 0,05$.

	Taxa de fecundação	Taxa de formação de blastocistos	Taxa de implantação
Grupos	p	p	p
1	0,200	0,200	2,39E-9
2	0,000332	0,200	2,76E-17
3	0,200	0,127	4,87E-7
4	0,0125	0,0202	2,40E-16
5	0,200	0,00618	4,99E-27
6	0,000258	0,0193	2,11E-13

Como podemos verificar pelas tabelas acima, a maioria das variáveis nos grupos não segue uma distribuição normal pois $p \leq 0,05$. Por esse motivo, e dado não ter sido encontrada uma transformação de variável que permitisse o cumprimento do pressuposto da ANOVA, a avaliação da existência de diferenças entre grupos relativamente às distribuições (medianas) das variáveis foi realizada segundo o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis*.

O sucesso da transferência embrionária (TEC e TEF) foi definido como a ocorrência de gravidez clínica em pelo menos um dos ciclos de transferência do casal. A análise da variável em amostras independentes foi realizada com recurso ao teste qui-quadrado de *Pearson* χ^2 e em amostras emparelhadas recorrendo ao teste de *McNemar*.

5 Resultados

5.1 Resultados descritivos da amostra

Na totalidade, foram recolhidos dados referentes a 244 ciclos de ICSI. Destes, 244 foram elegíveis para o cálculo da taxa de fecundação, 224 foram elegíveis para o cálculo da taxa de implantação e 199 foram elegíveis para o cálculo da taxa de formação de blastocistos.

5.2 Diferenças no número de ovócitos injetados por grupo

Inicialmente, foi determinado o número médio de ovócitos injetados por grupo de modo a verificar se existiam diferenças significativas entre estes.

Tabela 8: Número de ovócitos injetados por cada grupo: número de casais (N), número médio de ovócitos injetados ($\bar{X}_{\text{ovócitos}}$), desvio padrão, erro padrão, intervalo de confiança para a média (95%), valor mínimo e máximo.

Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de Confiança para a Média (95%)		Mínimo	Máximo
					Limite Inferior	Limite superior		
1	21	8,24	4,12	0,90	6,36	10,11	3,00	20,00
2	73	7,86	3,86	0,45	6,96	8,76	1,00	19,00
3	36	8,61	3,51	0,58	7,42	9,80	3,00	17,00
4	29	6,34	4,55	0,85	4,61	8,08	1,00	16,00
5	58	6,07	3,72	0,49	5,09	7,05	1,00	19,00
6	27	5,15	3,37	0,65	3,81	6,48	1,00	13,00
Total	244	7,10	3,98	0,25	6,60	7,60	1,00	20,00

Verificamos que o número médio de ovócitos injetados por grupo variava entre 5,15 (grupo 6) e 8,61 (grupo 3). **(Tabela 8)**

Ao analisar os dados através do teste ANOVA (2 fatores: idade, morfologia) para um nível de significância de 5%, verificamos diferenças estatisticamente significativas no número médio de ovócitos injetados pois existe evidência para rejeitar a hipótese nula de que a distribuição do número de ovócitos injetados pelos grupos é igual ($p < 0,001$). **(Tabela 9)**

Tabela 9: Teste de Anova para avaliar a existência de diferenças significativas no número de ovócitos injetados entre os grupos 1-6.

	Soma dos Quadrados	gl	Média dos Quadrados	F	p
Entre Grupos	332,961	5	66,592	4,520	<0,001

Observamos que, para um fator de significância de 5%, a variação do número de ovócitos injetados por grupo era significativa entre os grupos de idade, mas não entre os grupos de morfologia. **(Tabela 10)**

Tabela 10: Teste de Anova a dois fatores para avaliar a existência de diferenças significativas no número de ovócitos injetados entre os grupos de idade materna e entre os grupos de morfologia espermática estabelecidos.

	Soma dos Quadrados	gl	Média dos Quadrados	F	p
Modelos	332,961	5	66,592	4,520	<0,001
Intercepção	10048,007	1	10048,007	681,963	<0,001
Idade	287,459	1	287,459	19,510	<0,001
Morfologia	5,159	2	2,579	0,175	0,840
Idade * Morfologia	30,967	2	15,483	1,051	0,351
Erro	3506,678	238	14,734		
Total	16134,000	244			
Total Corrigido	3839,639	243			

5.3 Taxas de fecundação, formação de blastocistos e implantação

5.3.1 Análise descritiva da amostra

Inicialmente, foi realizada uma análise descritiva de modo a avaliar a forma como a morfologia espermática e idade da mulher influenciavam individualmente a taxa de fecundação, formação de blastocistos e implantação.

Foi determinada a média e respetivo desvio padrão, mediana e amplitude interquartil para cada um dos grupos de idade e morfologia estabelecidos. (Tabelas 11-16, Gráficos 1-6)

a) Taxa de fecundação

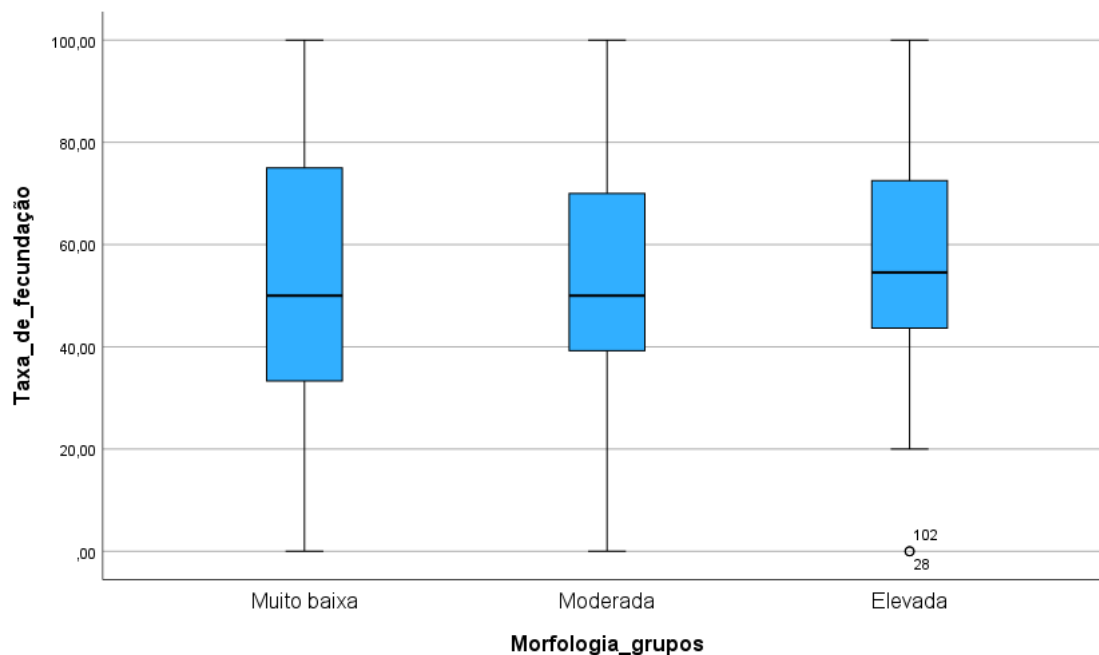


Gráfico 1: Diagramas de caixa e fio representando as diferenças na taxa de fecundação entre grupos de morfologia. Muito baixa: 0%; Moderada: 1-2%; Elevada: 3-4%. Os limites das caixas representam os valores dos percentis 25 e 75 da amostra, a linha no interior corresponde à mediana (P50) e os extremos das linhas verticais representam os valores máximo e mínimo.

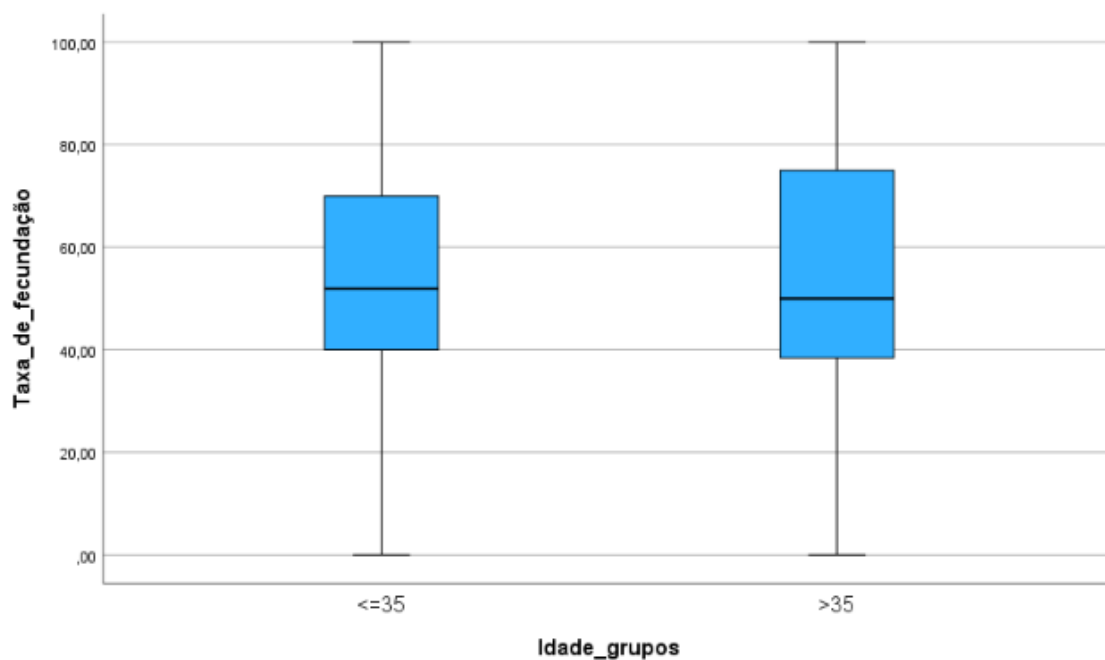


Gráfico 2: Diagrama de caixa e fio representando as diferenças na taxa de fecundação entre grupos de idades. <=35: Idade igual ou inferior a 35 anos; >35: Idade superior a 35 anos. Os limites das caixas representam os valores dos percentis 25 e 75, a linha no interior corresponde à mediana (P50) e os extremos das linhas verticais representam o valor máximo e mínimo.

Tabela 11-12: Caracterização da população elegível para o cálculo da taxa de fecundação: número de casais, taxa de fecundação média e respetivo desvio padrão, mediana da taxa de fecundação e amplitude interquartil para cada um dos grupos de idade e morfologia estabelecidos.

Morfologia		
Muito baixa	N	50
	Média (dp)	53,72 (4,03)
	Mediana	50,00
	Amplitude interquartil	41,67
Moderada	N	131
	Média (dp)	53,49 (2,21)
	Mediana	50,00
	Amplitude interquartil	31,54
Elevada	N	63
	Média (dp)	58,02 (3,04)
	Mediana	54,55
	Amplitude interquartil	32,14

Idade da mulher		
≤35 anos	N	130
	Média (dp)	54,69 (2,00)
	Mediana	51,93
	Amplitude interquartil	30,00
>35 anos	N	114
	Média (dp)	54,72 (2,68)
	Mediana	50,00
	Amplitude interquartil	36,78

b) Taxa de formação de blastocistos

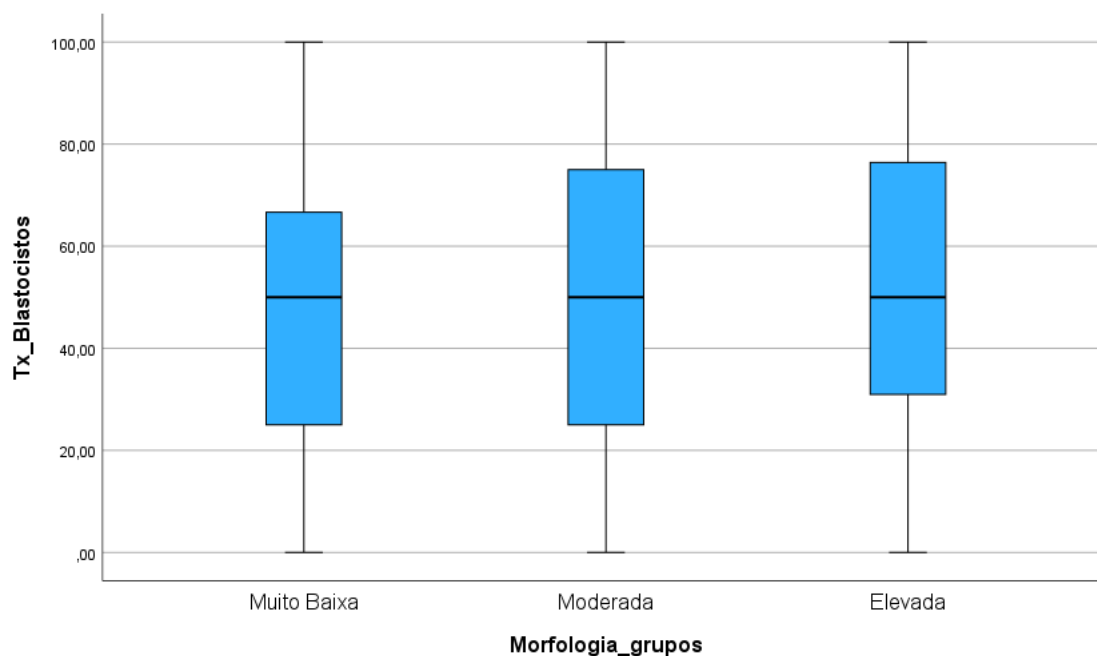


Gráfico 3: Diagramas de caixa e fio representando as diferenças na taxa de formação de blastocistos entre grupos de morfologia. Muito baixa: 0%; Moderada: 1-2%; Elevada: 3-4%. Os limites das caixas representam os valores dos percentis 25 e 75 da amostra, a linha no interior corresponde à mediana (P50) e os extremos das linhas verticais representam os valores máximo e mínimo.

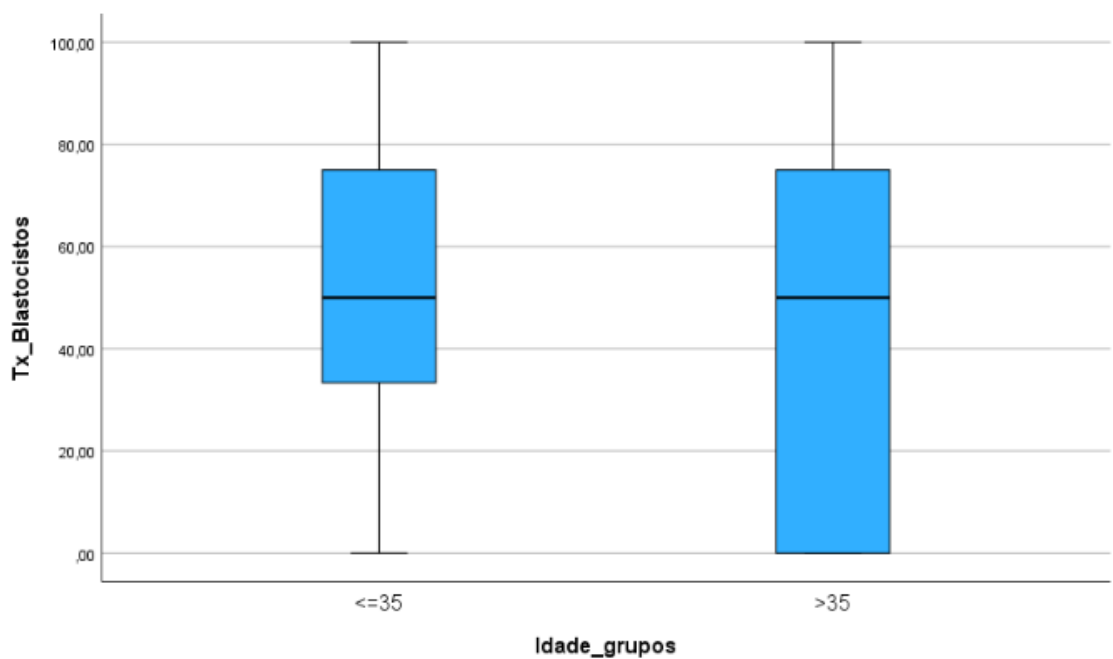


Gráfico 4: Diagrama de caixa e fio representando as diferenças na taxa de formação de blastocistos entre grupos de idades. ≤35: Idade igual ou inferior a 35 anos; >35: Idade superior a 35 anos. Os limites das caixas representam os valores dos percentis 25 e 75, a linha no interior corresponde à mediana (P50) e os extremos das linhas verticais representam o valor máximo e mínimo.

Tabela 13-14: Caracterização da população elegível para o cálculo da taxa de formação de blastocistos: número de casais, taxa de formação de blastocistos média e respetivo desvio padrão, mediana da taxa de formação de blastocistos e amplitude interquartil para cada um dos grupos de idade e morfologia estabelecidos.

Morfologia		
Muito baixa	N	41
	Média (dp)	48,46 (4,94)
	Mediana	50,00
	Amplitude interquartil	45,83
Moderada	N	106
	Média (dp)	51,35 (3,30)
	Mediana	50,00
	Amplitude interquartil	51,25
Elevada	N	52
	Média (dp)	49,50 (4,50)
	Mediana	50,00
	Amplitude interquartil	47,32

Idade da mulher		
≤35 anos	N	117
	Média (dp)	52,21 (2,86)
	Mediana	50,00
	Amplitude interquartil	41,67
>35 anos	N	82
	Média (dp)	47,51 (3,94)
	Mediana	50,00
	Amplitude interquartil	75,00

c) Taxa de implantação

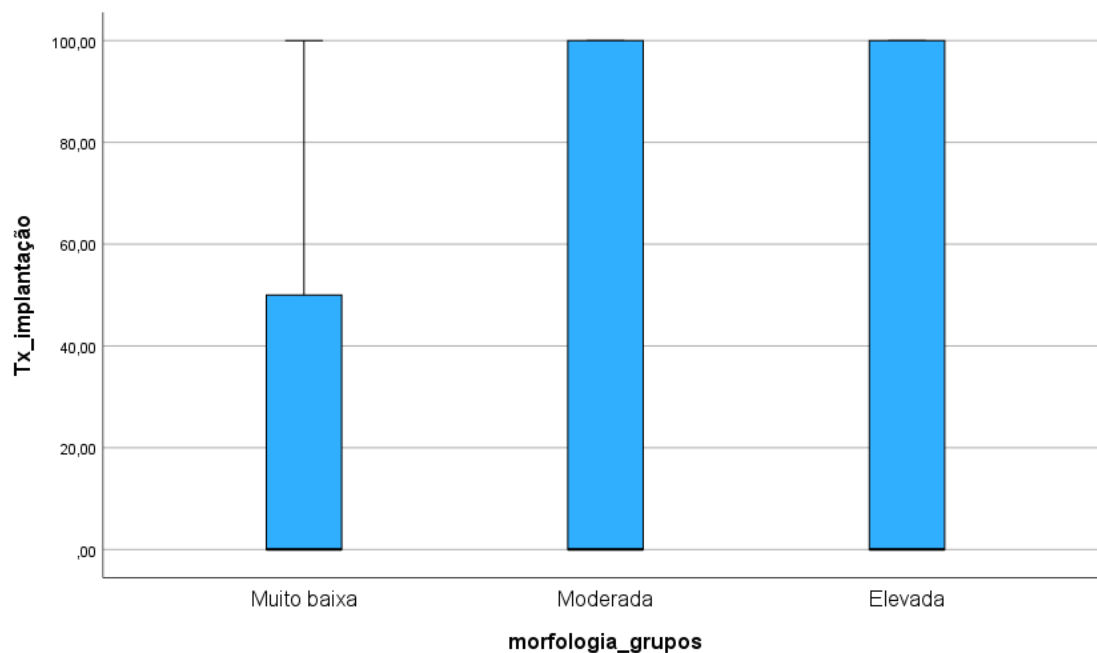


Gráfico 5: Diagramas de caixa e fio representando as diferenças na taxa de implantação entre grupos de morfologia. Muito baixa: 0%; Moderada: 1-2%; Elevada: 3-4%. Os limites das caixas representam os valores dos percentis 25 e 75 da amostra, a linha no interior corresponde à mediana (P50) e os extremos das linhas verticais representam os valores máximo e mínimo.

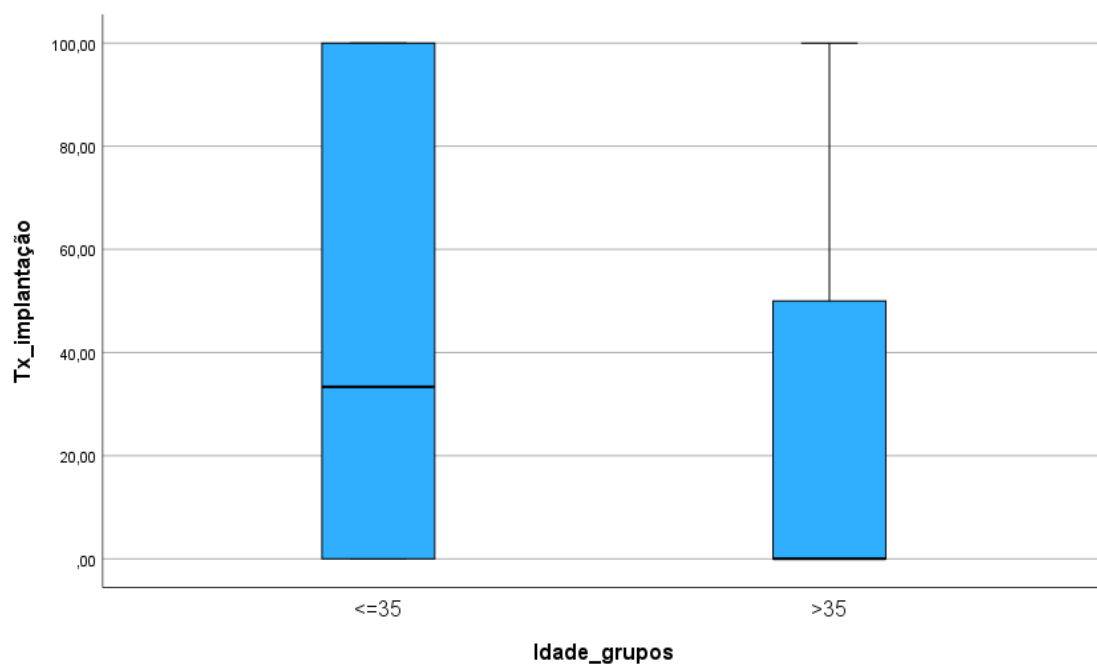


Gráfico 6: Diagrama de caixa e fio representando as diferenças na taxa de implantação entre grupos de idades. <=35: Idade igual ou inferior a 35 anos; >35: Idade superior a 35 anos. Os limites das caixas representam os valores dos percentis 25 e 75, a linha no interior corresponde à mediana (P50) e os extremos das linhas verticais representam o valor máximo e mínimo.

Tabela 15-16: Caracterização da população elegível para o cálculo da taxa de implantação: número de casais, taxa de implantação média e respetivo desvio padrão, mediana da taxa de implantação e amplitude interquartil para cada um dos grupos de idade e morfologia estabelecidos.

Morfologia		
Muito baixa	N	46
	Média (dp)	23,91 (5,97)
	Mediana	0,00
	Amplitude interquartil	50,00
Moderada	N	118
	Média (dp)	37,57 (4,24)
	Mediana	0,00
	Amplitude interquartil	100,00
Elevada	N	60
	Média (dp)	36,44 (5,79)
	Mediana	0,00
	Amplitude interquartil	100,00

Idade da mulher		
≤35 anos	N	122
	Média (dp)	43,47 (4,18)
	Mediana	33,33
	Amplitude interquartil	100,00
>35 anos	N	102
	Média (dp)	23,69 (4,03)
	Mediana	0,00
	Amplitude interquartil	50,00

5.4 Influência da morfologia espermática e idade da mulher na taxa de fecundação

Avaliou-se de que forma a morfologia espermática, juntamente com a idade feminina, influenciavam a taxa de fecundação em casais que recorreram à técnica de ICSI.

Tabela 17: Descrição dos grupos de casais: Média ($\bar{X}$) e respetivo desvio padrão (dp), mediana (M) e amplitude interquartil.

Grupo	$\bar{X}_{\text{Fecundação}} (dp)$	M	Amplitude interquartil
1	48,49 ± (5,66)	54,55	35,72
2	55,97 ± (2,70)	50,00	31,01
3	55,71 ± (3,37)	56,95	28,04
4	57,51 ± (5,58)	50,00	51,25
5	50,37 ± (3,63)	50,00	38,10
6	61,09 ± (5,51)	50,00	57,14

Após a divisão dos casais pelos 6 grupos, verificou-se que, a taxa de fecundação média do grupo 6 (morfologia 3-4% e idade superior a 35 anos) era a mais elevada $\bar{X}$ =61,09% e a do grupo 1 (morfologia 0% e idade igual ou inferior a 35 anos de idade) a mais baixa $\bar{X}$ =48,49%. Contudo, comparando as medianas, verificamos que a do grupo 3 é a mais

elevada $M_3=56,95$ e os grupos 2,4,5 e 6 apresentam todos a mediana mais baixa $M_{2,4,5,6}=50,00$.

Os dados obtidos e demonstrados na **Tabela 17** mostram, no entanto, um ligeiro aumento na taxa de fecundação média entre os grupos 1 e 2, que não se verifica entre o grupo 2 e 3. O oposto se verificou nos grupos referentes a casais com mulheres de idade superior a 35 anos, pois como podemos visualizar na tabela 17, a taxa de fecundação do quinto grupo é inferior à do quarto e, contrariamente aos grupos 2 e 3, há um aumento desta entre os grupos 5 e 6.

À exceção dos grupos 2 e 5, a taxa de fecundação média tende a ser superior nos grupos correspondentes a casais com mulheres de idade superior a 35 anos (**Tabela 17**).

Ao analisar estes dados através do teste de *Kruskal-Wallis* e considerando um nível de significância de 5%, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p=0,718$): não existem evidências para rejeitar a hipótese nula de que a distribuição da taxa de fecundação pelos grupos é igual.

Tabela 18: Teste de *Kruskal-Wallis* para avaliar a existência de diferenças significativas entre a taxa de fecundação dos grupos 1-6.

N total	244
Estatística de teste	2,880
Graus de liberdade	5
p	0,718

Comparando os grupos 1 a 3 e os grupos 4 a 6, ou seja, casais com mulheres na mesma faixa etária (**Tabela 19**), mas com morfologia variável, verificamos que, pelo teste de *Kruskal-Wallis*, nenhuma das diferenças entre grupos era significativa. Observamos que entre os grupos 1 a 3, há uma ligeira diminuição da mediana do grupo 1 para o 2, sendo mais elevada no grupo 3. Ao comparar as medianas correspondentes a casais com mulheres de idade superior a 35 anos, observamos que estas se mantêm constantes entre os três grupos (**Tabela 17**).

Tabela 19: Comparação da significância das diferenças na taxa de fecundação entre grupos com mulheres na mesma faixa etária, mas com morfologia variável.

Interação grupo-grupo	p
1-2	0,356
1-3	0,299
2-3	0,781
4-5	0,467
4-6	0,634
5-6	0,209

Ao realizar a comparação entre grupos com a mesma morfologia espermática, mas em faixas etárias diferentes, constatamos pelo teste de *Kruskal-Wallis* que as diferenças entre os grupos não eram significativas (**Tabela 20**). Observando as medianas entre estes mesmos grupos, verificamos que tendem a ser superiores em mulheres de idade inferior a 35 anos, à exceção do grupo 2 e 5 em que são iguais (**Tabela 17**).

Tabela 20: Comparação da significância das diferenças na taxa de fecundação entre grupos com a mesma morfologia espermática, mas em faixas etárias diferentes.

Interação grupo-grupo	p
1-4	0,406
2-5	0,375
3-6	0,752

5.5 Influência da morfologia espermática e idade da mulher na taxa de formação de blastocistos

De seguida, considerando os ciclos em que o desenvolvimento embrionário foi monitorizado até ao quinto dia, avaliou-se também de que forma a atuação conjunta dos fatores referidos anteriormente influenciavam a taxa de formação de blastocistos.

Tabela 21: Descrição dos grupos de casais: Média ($\bar{X}$) e respetivo desvio padrão (dp), mediana (M) e amplitude interquartil.

Grupo	$\bar{X}_{\text{Formação de Blastocistos}}$ (dp)	M	Amplitude interquartil
1	51,90 (8,34)	50,00	65,71
2	51,16 (3,88)	50,00	41,67
3	53,34 (4,74)	50,00	39,11
4	45,49 (5,84)	50,00	35,42
5	51,68 (6,08)	55,56	100,00
6	43,35 (8,91)	33,33	81,36

Após a divisão dos casais pelos 6 grupos, verificou-se que, a taxa de formação de blastocistos média do grupo 3 (morfologia 3-4% e idade igual ou inferior a 35 anos) era a mais elevada $\bar{X}=53,34\%$ e a do grupo 6 (morfologia 3-4% e idade superior a 35 anos de idade) a mais baixa $\bar{X}=43,35\%$. Contudo, comparando as medianas, verificamos que a do grupo 5 é a mais elevada $M_5=55,56$ e a do grupo 6 a mais baixa $M_6=33,33$.

Os dados obtidos relativamente aos grupos 1 a 3 demonstram, no entanto, que a taxa de formação de blastocistos média se revelou relativamente constante entre os três grupos. No entanto, nos grupos referentes a casais com mulheres de idade superior a 35 anos, como podemos visualizar na **Tabela 21**, a taxa de formação de blastocistos média do quinto grupo é superior à do quarto e sexto grupo.

À exceção dos grupos 2 e 5 em que esta é semelhante, a taxa de formação de blastocistos média tende a ser superior nos grupos correspondentes a casais com mulheres de idade igual ou inferior a 35 anos (**Tabela 21**).

Ao analisar estes dados através do teste de *Kruskal-Wallis* e considerando um nível de significância de 5%, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p=0,894$), isto é, não existem evidências para rejeitar a hipótese nula de que a distribuição da taxa de formação de blastocistos pelos grupos é igual.

Tabela 22: Teste de *Kruskal-Wallis* para avaliar a existência de diferenças significativas entre a taxa de formação de blastocistos dos grupos 1-6.

N total	199
Estatística de teste	1,661
Graus de liberdade	5
p	0,894

Comparando os grupos 1 a 3 e os grupos 4 a 6, ou seja, casais com mulheres na mesma faixa etária, mas com morfologia variável (**Tabela 23**), verificamos pelo teste de *Kruskal-Wallis*, que nenhuma das diferenças entre grupos eram significativas. Ao comparar as medianas, observamos que estas eram constantes entre os grupos 1 a 3 e superior no quinto grupo, quando comparando com os grupos 4 e 6 (**Tabela 21**).

Tabela 23: Comparação da significância das diferenças na taxa de formação de blastocistos entre grupos com mulheres na mesma faixa etária, mas com morfologia variável.

Interação grupo-grupo	p
1-2	0,968
1-3	0,842
2-3	0,751
4-5	0,452
4-6	0,845
5-6	0,343

Ao realizar a comparação entre grupos com a mesma morfologia espermática, mas em faixas etárias diferentes (**Tabela 24**), constatamos pelo teste de *Kruskal-Wallis* que as diferenças entre os grupos não eram significativas. Observando as medianas entre estes mesmos grupos, verificamos uma grande variação nos resultados, pois os grupos 1 e 4 apresentam medianas iguais, o grupo 5 apresenta uma mediana superior à do grupo 2 e a mediana do grupo 3 é superior à do grupo 6 (**Tabela 21**).

Tabela 24: Comparação da significância das diferenças na taxa de formação de blastocistos entre grupos com a mesma morfologia espermática, mas em faixas etárias diferentes.

Interação grupo-grupo	p
1-4	0,589
2-5	0,836
3-6	0,313

5.6 Influência da morfologia espermática e idade da mulher na taxa de implantação

Por fim, considerando os ciclos em que ocorreu fecundação e posterior transferência embrionária, avaliou-se a influência conjunta da idade feminina e da morfologia espermática na taxa de implantação.

Tabela 25: Descrição dos grupos de casais: Média ($\bar{X}$) e respetivo desvio padrão (dp), mediana (M) e amplitude interquartil.

Grupo	$\bar{X}_{Implantação}$ (dp)	M	Amplitude interquartil
1	30,00 (9,87)	0,00	87,50
2	46,38 (5,66)	33,33	100,00
3	44,21 (7,79)	33,33	100,00
4	19,23 (7,38)	0,00	12,50
5	25,17 (6,01)	0,00	50,00
6	26,28 (8,38)	0,00	62,50

Após a divisão dos casais pelos 6 grupos, verificou-se que, a taxa de implantação média do grupo 2 (morfologia 1-2% e idade igual ou inferior a 35 anos) era a mais elevada $\bar{X}=46,38\%$ e a do grupo 4 (morfologia 0% e idade superior a 35 anos de idade) a mais baixa $\bar{X}=19,23\%$. Contudo, comparando as medianas, verificamos que apenas os grupos 2 e 3 apresentam mediana diferente de 0 ($M_{2,3}=33,33$).

Os dados obtidos relativamente aos grupos 1 a 3, ou seja, casais com mulheres de idade inferior a 35 anos (**Tabela 25**), demonstram, no entanto, que a taxa de implantação média aumenta do grupo 1 para o 2, contudo mantém-se relativamente constante entre os grupos 2 e 3. Nos grupos referentes a casais com mulheres de idade superior a 35 anos, ocorre algo similar, pois há um aumento da taxa de implantação do grupo 4 para o 5, enquanto que esta é semelhante entre os grupos 5 e 6.

Constatamos que a taxa de implantação média é superior nos grupos correspondentes a casais com mulheres de idade igual ou inferior a 35 anos (**Tabela 25**).

Ao analisar os dados através do teste de *Kruskal-Wallis* para uma significância de 5%, verificamos que existem diferenças estatisticamente significativas ($p=0,015$), isto é, existem evidências para rejeitar a hipótese nula de que a distribuição da taxa de implantação pelos grupos é igual, pois esta apresenta um p inferior a 0,05.

Tabela 26: Teste de *Kruskal-Wallis* para avaliar a existência de diferenças significativas entre a taxa de implantação dos grupos 1-6.

N total	244
Estatística de teste	14,139
Graus de liberdade	5
p	0,015

Contudo, comparando os grupos 1 a 3 e os grupos 4 a 6, ou seja, casais com mulheres na mesma faixa etária, mas com morfologia variável (**Tabela 27**), verificamos pelo teste de *Kruskal-Wallis*, que nenhuma das diferenças entre grupos era significativa. Analisando as medianas entre os grupos referentes a casais com mulheres de idade igual ou inferior a 35 anos, verificamos que os grupos 2 e 3 apresentam medianas semelhantes entre si e superiores à do grupo 1. Os grupos referentes a casais com

mulheres de idade superior a 35 anos apresentam todos a mesma mediana (M4,5,6= 0,00) (**Tabela 25**).

Tabela 27: Comparação da significância das diferenças na taxa de implantação entre grupos com mulheres na mesma faixa etária, mas com morfologia variável.

Interação grupo-grupo	p
1-2	0,137
1-3	0,195
2-3	0,953
4-5	0,597
4-6	0,560
5-6	0,891

Ao realizar a comparação entre grupos com a mesma morfologia espermática, mas faixas etárias distintas (**Tabela 28**), constatamos pelo teste de *Kruskal-Wallis* que as diferenças entre os grupos não eram significativas à exceção dos grupos 2 e 5. Observando as medianas entre estes mesmos grupos, verificamos que estas tendem a ser superiores em casais com mulheres de idade igual ou inferior a 35 anos, à exceção do grupo 1, em que a mediana é igual à do grupo 4 (**Tabela 25**).

Tabela 28: Comparação da significância das diferenças na taxa de implantação entre grupos com a mesma morfologia espermática, mas em faixas etárias diferentes.

Interação grupo-grupo	p
1-4	0,410
2-5	0,008
3-6	0,085

5.7 TEC vs TEF

Depois de terminado o ciclo de ICSI, os embriões obtidos e viáveis para transferência podem ser transferidos logo após o ciclo por TEF e/ou criopreservados para futuras TEC [107]. Na totalidade, 224 casais realizaram transferência embrionária, destes, 135 casais recorreram apenas a TEF, 46 casais apenas a TEC e 43 casais realizaram TEF seguida de TEC.

O sucesso das TEF e TEC foi calculado e comparado entre casais que só realizaram TEF e TEC, independentes uma da outra, e entre casais que realizaram TEF seguida de TEC. As transferências foram consideradas um sucesso quando o casal alcança a gravidez clínica.

Casais que realizaram apenas TEF ou TEC**Tabela 29:** Tabela com os valores utilizados no teste do Qui-quadrado de *Pearson* para amostras independentes.

Técnica	Resultado	N	Taxa de sucesso	p
TEF	Sucesso	43	31,9%	0,00226
	Insucesso	92		
TEC	Sucesso	27	52,2%	
	Insucesso	19		

Ao analisar os dados obtidos referentes a casais que realizaram apenas TEF ou TEC, exibidos na **Tabela 29**, observamos que a taxa de sucesso da TEC (52,2%) é superior à da TEF (31,9%). Verificamos pelo teste do Qui-quadrado de *Pearson*, para uma significância de 5%, que estas diferenças são estatisticamente significativas ($p=0,00226$). A hipótese nula de que existem diferenças significativas na taxa de sucesso da TEF e TEC, quando realizadas independentemente, pode ser rejeitada.

Casais que realizaram TEC após TEF**Tabela 30:** Teste de *McNemar* para amostras dependentes.

	Valor	p
Teste de McNemar		0,019
N	43	

Ao analisar os dados através do teste de *McNemar* para uma significância de 5%, verificamos que existem evidências para rejeitar a hipótese nula e que existem diferenças significativas na taxa de sucesso da TEF e TEC, quando se realiza TEC após TEF.

Tabela 31: Tabela referente aos valores utilizados no teste de *McNemar* para amostras emparelhadas.

			TEC		Total
			Insucesso	Sucesso	
TEF	Insucesso	Contagem	21	15	36
		% em TEF	58,3%	41,7%	100,0%
		% em TEC	84,0%	83,3%	83,7%
	Sucesso	Contagem	4	3	7
		% em TEF	57,1%	42,9%	100,0%
		% em TEC	16,0%	16,7%	16,3%
Total		Contagem	25	18	43
		% em TEF	58,1%	41,9%	100,0%
		% em TEC	100,0%	100,0%	100,0%

Ao analisar os dados exibidos na tabela 31, verificamos que a taxa de sucesso da TEF, quando seguida de TEC, era de 16,3%, enquanto a taxa de sucesso da TEC após TEF era de 41,9%.

6 Discussão

6.1 Influência da idade da mulher e da morfologia espermática na fertilidade do casal

A idade materna avançada e a qualidade do espermatozoide do homem são dois fatores que têm uma grande influência na fertilidade do casal, podendo ser determinantes para o sucesso ou insucesso das técnicas de PMA utilizadas no tratamento da fertilidade [14-16].

Na primeira parte do nosso estudo decidimos avaliar de que forma esses dois fatores afetavam a taxa de fecundação, formação de blastocistos e implantação.

De acordo com a literatura, a idade materna avançada já foi reportada como sendo um fator importante para o insucesso das técnicas de PMA, pois a reserva e qualidade ovocitária diminuem, as taxas de fecundação são reduzidas e há falha nos mecanismos que controlam a sua divisão celular, o que leva ao aparecimento de aneuploidias e à perda de competência genética dos embriões. Isso pode levar a falhas na sua implantação no útero ou a abortamentos espontâneos [38, 40, 43].

De facto, os nossos resultados vão ao encontro da literatura, pois demonstraram uma diminuição do número de ovócitos recuperados e injetados em grupos de mulheres com uma idade materna avançada.

Além da influência na qualidade ovocitária e embrionária, este fator também afeta as funções endometriais, diminuindo assim a receptividade endometrial e consequentemente as taxas de implantação e gravidez [108].

A morfologia dos espermatozoides é um forte indicador da saúde corporal e, consequentemente, testicular de um indivíduo. Este órgão reage significativamente a stress corporais, fisiológicos e ambientais, mais do que qualquer outro órgão [109].

Estudos anteriores que avaliaram o efeito da morfologia espermática na taxa de fecundação, desenvolvimento embrionário e implantação recorrendo a tratamentos de ICSI, concluíram que a microinjeção de espermatozoides com morfologia anormal leva a taxas de fecundação e implantação reduzidas, quando comparando com espermatozoides de morfologia normal. No entanto, não demonstraram ter qualquer influência no desenvolvimento embrionário [110].

Contudo, um estudo realizado por *French et al.* avaliou o sucesso da técnica de ICSI em casais com homens com teratozoospermia e concluiu que, em casais com mulheres

de idade inferior a 37 anos e morfologia espermática inferior a 7%, as diferenças na taxa fecundação, formação de blastocistos e implantação não eram significativas [111].

Os nossos resultados estão de acordo com este estudo no que se refere às taxas de fecundação e formação de blastocistos, pois não demonstraram diferenças significativas entre os diferentes grupos de casais.

Apesar de ter sido reportado que a idade avançada afeta negativamente a taxa de fecundação e de formação de blastocistos [38, 40, 43], no nosso estudo, os grupos de casais 4, 5 e 6, constituídos com mulheres de idade superior a 35 anos, não apresentaram diferenças nestas taxas, quando comparando com os casais nos grupos 1, 2 e 3, respetivamente, que eram formados por mulheres mais novas.

De acordo com os dados obtidos por *French et al.*, os seus resultados sugeriam que em subgrupos de morfologia reduzida, no qual se inserem os grupos do nosso trabalho, os fatores femininos aparentam ser menos prevalentes e o problema de infertilidade primário é o fator masculino [111], o que pode explicar a falta de significância nos nossos resultados quando avaliamos o efeito da idade para cada um dos intervalos de morfologia estabelecidos (0%, 1-2% e 3-4%) na taxa de fecundação e formação de blastocistos.

Anick de Vos et al. demonstrou também que, quando se realiza ICSI, mesmo em casos de morfologia reduzida, os espermatozoides são selecionados de forma a se escolher aqueles com morfologia “normal”, ou seja, aqueles com menos defeitos graves como por exemplo peça intermédia partida e cabeça amorfa ou alongada. Isto permite que, mesmo em casos de teratozoospermia severa, o potencial efeito negativo da morfologia anormal seja maioritariamente ignorado [110].

Além disso, a técnica de ICSI permite que os espermatozoides ultrapassem as primeiras fases da fertilização natural (penetração do *cumulus*, ligação à ZP e fusão com o oolema), mesmo aqueles com morfologia anormal que naturalmente não o conseguiriam [111, 112].

Todos estes fatores permitem um maior sucesso da técnica de ICSI, mesmo em casais como os do nosso estudo cujo membro masculino apresente uma morfologia espermática abaixo dos valores mínimos de referência para a qualidade do esperma estabelecidos pela OMS [4].

No entanto, contrariamente à taxa de fecundação e formação de blastocistos, os nossos resultados demonstraram que a idade materna e a morfologia espermática influenciaram significativamente a taxa de implantação.

Os nossos resultados revelaram que, para casais com uma morfologia espermática igual ou inferior a 4%, aqueles que apresentem mulheres com idade igual ou inferior a 35 anos tendem a ter uma taxa de implantação superior àqueles com mulheres de idade superior a 35 anos.

Quando comparamos grupos com o mesmo intervalo de morfologia, mas idade materna variável verificamos que apenas os grupos 2 e 5, 1-2% de formas normais com mulher de idade igual ou inferior a 35 anos e de idade superior a 35 anos respetivamente, apresentavam diferenças significativas na taxa de implantação. No entanto, isto pode dever-se ao facto de estes grupos apresentarem um tamanho amostral superior aos restantes, tendo por esse motivo maior força estatística.

Os resultados que obtivemos vão ao encontro dos obtidos em diversos estudos que avaliaram a variação da taxa de implantação com a idade materna. Por exemplo, um estudo realizado por *Devesa et al.* concluiu que as taxas de implantação diminuíam significativamente com o aumento da idade materna em mulheres de idade superior a 38 anos [113].

Um estudo realizado por *Spandorfer et al.* corroborou os resultados do nosso estudo pois, ao avaliar a variação da taxa de implantação em função da idade materna observou que a taxa de implantação diminuía gradualmente (2,77% por ano) após os 35 anos de idade [114].

Além disso, um estudo realizado por *Lin et al.* sobre o efeito da idade materna nos parâmetros neonatais e da gravidez na TEC, demonstrou que o aumento da idade estava associado a um declínio na taxa de implantação [115].

Os resultados obtidos no nosso estudo corroboram a literatura mencionada anteriormente, que afirmava que o aumento da idade materna leva a uma diminuição da taxa de implantação. Como referido anteriormente, isso pode ser explicado pela falha dos mecanismos que controlam a sua divisão celular, o que leva ao aparecimento de aneuploidias e à perda de competência genética dos embriões, bem como à diminuição da recetividade endometrial [113-116].

6.2 TEC vs. TEF

Após avaliarmos de que forma a idade da mulher e a morfologia espermática do homem influenciam o sucesso da técnica de ICSI, decidimos estudar como a técnica de transferência utilizada influenciava o sucesso da implantação do embrião ao útero nos casais em estudo.

Em tratamentos recorrendo a FIV ou ICSI, os embriões obtidos podem ser transferidos a fresco, 2-5 dias após a fecundação, com criopreservação dos embriões em excesso para uso futuro ou totalmente criopreservados para serem utilizados apenas em ciclos futuros [117, 118].

No nosso estudo, avaliamos o sucesso da TEF e da TEC quando realizadas independentemente e em sequência.

Quando realizadas independentemente, os nossos resultados demonstraram que a TEC apresenta uma taxa de sucesso de 52,2%, enquanto a TEF apresenta uma taxa de sucesso de 31,9%.

Neste mesmo sentido, quando analisamos a diferença entre as taxas de sucesso das duas técnicas quando se realiza TEC após TEF, obtemos resultados semelhantes aos anteriores, ou seja, a TEC apresenta uma taxa de sucesso superior mesmo quando realizada após uma TEF.

Os nossos resultados vão ao encontro dos obtidos por *Roque et al.*, que realizaram uma meta-análise para avaliar se a criopreservação de todos os embriões e a subsequente TEC resulta em melhores resultados em comparação com TEF. Nesse estudo concluiu-se que a utilização da TEC após criopreservação total resultava numa taxa de gravidezes clínicas significativamente superior [119].

Além disso, em concordância com o nosso estudo, *Shapiro et al.* determinou também que a TEC levava a uma maior taxa de sucesso das gravidezes clínicas e implantação do que a TEF [120].

No entanto, um estudo realizado por *Basirat* em que se compararam as taxas de gravidez em casais que realizaram ICSI seguida de TEF ou TEC contradiz os estes resultados, pois determinou que não existiam diferenças significativas entre os dois tipos de transferência [121].

Inicialmente, a criopreservação total dos ovócitos era indicada para casais com alto risco de desenvolverem síndrome de hiperestimulação ovárica [122]. Contudo, com o avanço

das técnicas de criopreservação, a qualidade dos embriões vitrificados e o seu potencial de implantação aumentaram significativamente [119].

Além disso, um fator importante para o sucesso da implantação embrionária é a receptividade endometrial [119, 120, 123]. Durante um ciclo normal de IVF/ICSI, a paciente é submetida à estimulação ovárica controlada de modo a obter um número elevado de folículos [123]. Porém, a estimulação ovárica controlada está associada a uma decadência da receptividade endometrial devido aos níveis excessivos de hormonas suprafisiológicas como estradiol e progesterona que levam a uma dessincronização entre o embrião e o endométrio [119-123].

Por esse motivo, apesar de os embriões de melhor qualidade serem selecionados para a transferência a fresco na maioria das vezes, a receptividade endometrial pode estar comprometida pelos níveis elevados destas hormonas [119]. Isto não acontece quando os embriões são criopreservados e se realiza TEC, pois no momento da transferência o útero não se encontra sob o efeito das hormonas suprafisiológicas e é preparado artificialmente para receber o embrião [119, 123].

7 Conclusão

No decorrer do presente ano letivo, o meu estágio curricular foi realizado no Centro de Estudos de Infertilidade e Esterilidade, onde tive a oportunidade de ampliar os meus conhecimentos sobre a área da embriologia e realizar todas as técnicas laboratoriais relativas à área.

Durante a minha permanência no centro, pude realizar, de forma autónoma, espermogramas, processamento de espermatozoides para inseminações artificiais, FIV e ICSI, provenientes de amostras a fresco ou congeladas e criopreservar palhetas de dadores e pacientes. Acompanhei posteriormente o protocolo destas técnicas e a transferência dos embriões obtidos. Além disso, realizei descongelação e criopreservação de embriões e ovócitos com material excedentário.

Acompanhei dezenas de punções, participando na pesquisa de ovócitos, na sua desnudação e na desnudação de pré-zigotos. Tive também a oportunidade de acompanhar e auxiliar na obtenção de amostras por TESE e na recolha de células para DGPI.

Por fim, acredito que este estágio me permitiu adquirir um maior e mais aprofundado conhecimento sobre a área da embriologia, bem como compreender a dinâmica do dia-a-dia de um embriologista e obter experiência prática que será essencial para o meu futuro.

Além de ter acompanhado e contribuído para a prática laboratorial de um laboratório de PMA, pude também desenvolver um projeto de investigação com o objetivo avaliar de que modo a idade da mulher e a qualidade espermática (com foco em casais com valores de morfologia reduzidos) influenciam a taxa de sucesso do procedimento de ICSI. Na segunda parte do trabalho, pretende-se investigar de que forma a técnica de transferência utilizada influencia o sucesso da implantação do embrião nos casais em estudo.

Os resultados obtidos a partir da análise estatística permitiram concluir que, em casais cujo membro masculino apresente teratozoospermia, não há influência das características morfológicas do espermatozoide e da idade materna nas taxas de fecundação e formação de blastocistos. No entanto, observou-se que a idade materna influencia a taxa de implantação, independentemente da morfologia espermática. Além disso, os resultados obtidos permitem concluir que, neste tipo de casais, a TEC deve ser preferida à TEF.

Vários fatores podem afetar negativamente a fertilidade. Além da idade, a obesidade, o estilo de vida adotado, o tabagismo, fatores ambientais, entre outros, podem levar à perda da fertilidade tanto do membro masculino como feminino do casal. Por esse motivo, acredito que seja relevante a realização de um estudo mais amplo que abranja um maior número de fatores que possam ser responsáveis pela diminuição da fertilidade. Isto permitiria tirar conclusões mais concretas sobre a influência de diferentes fatores na fertilidade do casal.

O presente estudo permitiu adquirir novos conhecimentos sobre a área, mais concretamente sobre os diferentes fatores que podem influenciar a fertilidade do casal e como estes podem afetar os diferentes estágios do processo de gravidez.

8 Referências bibliográficas

1. Fertility, U. *Intracytoplasmic Sperm Injection*. Available from: <https://uncfertility.com/treatment-options/in-vitro-fertilization/intracytoplasmic-sperm-injection/>.
2. Medicine, A.S.i.R. and E.S.I.G.o. Embryology, *The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting†*. Human Reproduction, 2011. **26**(6): p. 1270-1283.
3. Niakan, K.K., et al., *Human pre-implantation embryo development*. Development, 2012. **139**(5): p. 829-841.
4. Organization, W.H., *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 2021: World Health Organization.
5. Rubino, P., et al., *The ICSI procedure from past to future: a systematic review of the more controversial aspects*. Human Reproduction Update, 2015. **22**(2): p. 194-227.
6. ESHRE. *Atlas of Human Embryology*. Available from: <https://atlas.eshre.eu/es/14546650461602050>.
7. Anwar, S. and A. Anwar, *Infertility: A review on causes, treatment and management*. Womens Health Gynecol, 2016. **5**: p. 2-5.
8. Wallach, E.E., M.M. Seibel, and M.L. Taymor, *Emotional aspects of infertility*. Fertility and Sterility, 1982. **37**(2): p. 137-145.
9. Galhardo, A., M. Cunha, and J. Pinto-Gouveia, *Psychological aspects in couples with infertility*. Sexologies, 2011. **20**(4): p. 224-228.
10. Cousineau, T.M. and A.D. Domar, *Psychological impact of infertility*. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology, 2007. **21**(2): p. 293-308.
11. Burns, L.H., *Psychiatric Aspects of Infertility and Infertility Treatments*. Psychiatric Clinics of North America, 2007. **30**(4): p. 689-716.
12. Tamrakar, S.R. and R. Bastakoti, *Determinants of infertility in couples*. Journal of Nepal Health Research Council, 2019. **17**(1): p. 85-89.
13. Hazlina, N.H.N., et al., *Worldwide prevalence, risk factors and psychological impact of infertility among women: a systematic review and meta-analysis*. BMJ open, 2022. **12**(3): p. e057132.
14. Saúde, D.G.d. *Norma sobre Conduta em Infertilidade para os Cuidados de Saúde Primários*. 2011.
15. Durairajanayagam, D., *Lifestyle causes of male infertility*. Arab Journal of Urology, 2018. **16**(1): p. 10-20.
16. Bala, R., et al., *Environment, Lifestyle, and Female Infertility*. Reproductive Sciences, 2021. **28**(3): p. 617-638.
17. Mustafa, M., et al., *Male and female infertility: causes, and management*. IOSR Journal of Dental and Medical Sciences, 2019. **18**: p. 27-32.
18. Carson, S.A. and A.N. Kallen, *Diagnosis and management of infertility: a review*. Jama, 2021. **326**(1): p. 65-76.
19. Prevention, C.f.D.C.a. *Infertility FAQs*. 2009; Available from: <http://www.cdc.gov/reproductivehealth/infertility>.
20. Kumar, N. and A.K. Singh, *Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature*. Journal of human reproductive sciences, 2015. **8**(4): p. 191.
21. Tournaye, H., *Male factor infertility and ART*. Asian J Androl, 2012. **14**(1): p. 103-8.
22. Agarwal, A., et al., *Male infertility*. The Lancet, 2021. **397**(10271): p. 319-333.
23. Kumar, N. and A.K. Singh, *Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature*. J Hum Reprod Sci, 2015. **8**(4): p. 191-6.

24. Jørgensen, N., et al., *Regional differences in semen quality in Europe*. Hum Reprod, 2001. **16**(5): p. 1012-9.
25. Houston, B.J., et al., *A systematic review of the validated monogenic causes of human male infertility: 2020 update and a discussion of emerging gene–disease relationships*. Human Reproduction Update, 2021. **28**(1): p. 15-29.
26. Aitken, R.J. and M.A. Baker, *The Role of Genetics and Oxidative Stress in the Etiology of Male Infertility—A Unifying Hypothesis?* Frontiers in Endocrinology, 2020. **11**.
27. Wikström, A.M. and L. Dunkel, *Klinefelter syndrome*. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 2011. **25**(2): p. 239-250.
28. Bonomi, M., et al., *Klinefelter syndrome (KS): genetics, clinical phenotype and hypogonadism*. Journal of Endocrinological Investigation, 2017. **40**(2): p. 123-134.
29. Rabinowitz, M.J., et al., *Y-Chromosome Microdeletions: A Review of Prevalence, Screening, and Clinical Considerations*. The Application of Clinical Genetics, 2021. **14**: p. 51-59.
30. Punjani, N., C. Kang, and P.N. Schlegel, *Clinical implications of Y chromosome microdeletions among infertile men*. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 2020. **34**(6): p. 101471.
31. Frey, K.A. and K.S. Patel, *Initial Evaluation and Management of Infertility by the Primary Care Physician*. Mayo Clinic Proceedings, 2004. **79**(11): p. 1439-1443.
32. Frey, K.A. and K.S. Patel, *Initial evaluation and management of infertility by the primary care physician*. in *Mayo Clinic Proceedings*. 2004. Elsevier.
33. Chiba, K., N. Enatsu, and M. Fujisawa, *Management of non-obstructive azoospermia*. Reproductive Medicine and Biology, 2016. **15**(3): p. 165-173.
34. Baker, K. and E. Sabanegh, *Obstructive azoospermia: reconstructive techniques and results*. Clinics, 2013. **68**: p. 61-73.
35. Beja, A., *Visão de Enfermagem nas Patologias Peno-Escrotiais nos Serviços de Urgência*. 2014. p. 197-200.
36. Miyamoto, T., et al., *Male infertility and its causes in human*. Advances in urology, 2011. **2012**.
37. Barbieri, R.L., *Chapter 22 - Female Infertility*, in *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology (Eighth Edition)*, J.F. Strauss and R.L. Barbieri, Editors. 2019, Elsevier: Philadelphia. p. 556-581.e7.
38. Olooto, W., et al., *A review of Female Infertility; important etiological factors and management*. Journal of Microbiology and Biotechnology Research, 2012. **2**: p. 379-385.
39. Pasquali, R., L. Patton, and A. Gambineri, *Obesity and infertility*. Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity, 2007. **14**(6): p. 482-487.
40. Amoako, A.A. and A.H. Balen, *Female infertility: diagnosis and management*. Endocrinology and Diabetes: Case Studies, Questions and Commentaries, 2015: p. 123-131.
41. *Smoking and infertility*. Fertility and Sterility, 2008. **90**(5, Supplement): p. S254-S259.
42. Sauer, M.V., *Reproduction at an advanced maternal age and maternal health*. Fertility and Sterility, 2015. **103**(5): p. 1136-1143.
43. Seshadri, S., et al., *Assisted conception in women of advanced maternal age*. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology, 2021. **70**: p. 10-20.
44. Sudha, G. and K. Reddy, *Causes of female infertility: a crosssectional study*. International journal of latest research in science and technology, 2013. **2**(6): p. 119-123.
45. Direkvand-Moghadam, A., A. Delpisheh, and A. Khosravi, *Epidemiology of female infertility; a review of literature*. Biosci Biotechnol Res Asia, 2013. **10**(2): p. 559-67.

46. Luciano, A.A., A. Lanzone, and A.J. Goverde, *Management of female infertility from hormonal causes*. International Journal of Gynecology & Obstetrics, 2013. **123**(S2): p. S9-S17.
47. Makar, R.S. and T.L. Toth, *The evaluation of infertility*. Am J Clin Pathol, 2002. **117 Suppl**: p. S95-103.
48. Mårdh, P.-A., *Tubal factor infertility, with special regard to chlamydial salpingitis*. Current opinion in infectious diseases, 2004. **17**(1): p. 49-52.
49. Abrao, M.S., L. Muzii, and R. Marana, *Anatomical causes of female infertility and their management*. International Journal of Gynecology & Obstetrics, 2013. **123**(S2): p. S18-S24.
50. Dun, E.C. and C.H. Nezhat, *Tubal factor infertility: diagnosis and management in the era of assisted reproductive technology*. Obstet Gynecol Clin North Am, 2012. **39**(4): p. 551-66.
51. Brunham, R.C., S.L. Gottlieb, and J. Paavonen, *Pelvic inflammatory disease*. New England Journal of Medicine, 2015. **372**(21): p. 2039-2048.
52. Leyland, N., et al., *Endometriosis: Diagnosis and Management*. Journal of Endometriosis, 2010. **2**(3): p. 107-134.
53. Sallée, C., et al., *Uterine Factor Infertility, a Systematic Review*. Journal of Clinical Medicine, 2022. **11**(16): p. 4907.
54. Hur, C., et al., *Uterine factor infertility: a clinical review*. Clinical obstetrics and gynecology, 2019. **62**(2): p. 257-270.
55. Moncada-Madrado, M., *Embryology, uterus*. 2019.
56. Nallella, K.P., et al., *Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility*. Fertility and Sterility, 2006. **85**(3): p. 629-634.
57. Jain, M. and M. Singh, *Assisted reproductive technology (ART) techniques*, in *StatPearls [Internet]*. 2021, StatPearls Publishing.
58. Huang, J.Y.J. and Z. Rosenwaks, *In vitro fertilisation treatment and factors affecting success*. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology, 2012. **26**(6): p. 777-788.
59. Qublan, H.S., et al., *In-vitro fertilisation treatment: Factors affecting its results and outcome*. Journal of Obstetrics and Gynaecology, 2005. **25**(7): p. 689-693.
60. Passet-Wittig, J. and M. Bujard, *Medically assisted reproduction in developed countries: Overview and societal challenges*. Research Handbook on the Sociology of the Family, 2021: p. 417-438.
61. Devroey, P. and A. Van Steirteghem, *A review of ten years experience of ICSI*. Human Reproduction Update, 2004. **10**(1): p. 19-28.
62. Haddad, M., et al., *Thoughts on the popularity of ICSI*. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2021. **38**(1): p. 101-123.
63. Baldini, D., et al., *Sperm Selection for ICSI: Do We Have a Winner?* Cells, 2021. **10**(12): p. 3566.
64. Tannus, S., et al., *The role of intracytoplasmic sperm injection in non-male factor infertility in advanced maternal age*. Human Reproduction, 2016. **32**(1): p. 119-124.
65. Schwarze, J.-E., et al., *Is there a reason to perform ICSI in the absence of male factor? Lessons from the Latin American Registry of ART*. Human Reproduction Open, 2017. **2017**(2).
66. Palermo, G.D., Q.V. Neri, and Z. Rosenwaks. *To ICSI or not to ICSI*. in *Seminars in Reproductive Medicine*. 2015. Thieme Medical Publishers.
67. Nasr-Esfahani, M.H., M.R. Deemeh, and M. Tavalaei, *New era in sperm selection for ICSI*. International Journal of Andrology, 2012. **35**(4): p. 475-484.
68. Dale, B., *Polyspermy*, in *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)*, M.K. Skinner, Editor. 2018, Academic Press: Oxford. p. 309-313.

69. Feldman, B., et al., *Pre-implantation genetic diagnosis—should we use ICSI for all?* Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2017. **34**(9): p. 1179-1183.
70. Basille, C., et al., *Preimplantation genetic diagnosis: State of the art.* European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2009. **145**(1): p. 9-13.
71. Simpson, J.L., A. Kuliev, and S. Rechitsky, *Overview of Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD): Historical Perspective and Future Direction*, in *Prenatal Diagnosis*, B. Levy, Editor. 2019, Springer New York: New York, NY. p. 23-43.
72. Ambartsumyan, G. and A.T. Clark, *Aneuploidy and early human embryo development.* Human Molecular Genetics, 2008. **17**(R1): p. R10-R15.
73. Rossant, J. and P.P. Tam, *Exploring early human embryo development.* Science, 2018. **360**(6393): p. 1075-1076.
74. Scott, L., *Pronuclear scoring as a predictor of embryo development.* Reproductive BioMedicine Online, 2003. **6**(2): p. 201-214.
75. Gardner, D.K. and C. Simón, *Handbook of in vitro fertilization.* 2017: CRC press.
76. Hadi, H. and R. Ali, *Textbook of Assisted Reproductive Techniques vol 1.* 2021.
77. Saiz, I.C., 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): p. 42-54.
78. Staessen, C. and A.C. Van Steirteghem, *The chromosomal constitution of embryos developing from abnormally fertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection and conventional in-vitro fertilization.* Human reproduction (Oxford, England), 1997. **12**(2): p. 321-327.
79. Mateo, S., et al., *In vitro development and chromosome constitution of embryos derived from monopronucleated zygotes after intracytoplasmic sperm injection.* Fertility and sterility, 2013. **99**(3): p. 897-902. e1.
80. Dal Canto, M., et al., *Cleavage kinetics analysis of human embryos predicts development to blastocyst and implantation.* Reproductive BioMedicine Online, 2012. **25**(5): p. 474-480.
81. Racowsky, C., et al., *National collection of embryo morphology data into Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Outcomes Reporting System: associations among day 3 cell number, fragmentation and blastomere asymmetry, and live birth rate.* Fertility and sterility, 2011. **95**(6): p. 1985-1989.
82. Johansson, M., T. Hardarson, and K. Lundin, *There is a cutoff limit in diameter between a blastomere and a small anucleate fragment.* Journal of assisted reproduction and genetics, 2003. **20**: p. 309-313.
83. Alikani, M., et al., *Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation.* Fertility and Sterility, 1999. **71**(5): p. 836-842.
84. Jurisicova, A., S. Varmuza, and R. Casper, *Programmed cell death and human embryo fragmentation.* MHR: Basic science of reproductive medicine, 1996. **2**(2): p. 93-98.
85. Rienzi, L., et al., *Significance of morphological attributes of the early embryo.* Reproductive BioMedicine Online, 2005. **10**(5): p. 669-681.
86. Royen, E.V., et al., *Multinucleation in cleavage stage embryos.* Human Reproduction, 2003. **18**(5): p. 1062-1069.
87. Hardarson, T., et al., *Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation.* Human Reproduction, 2001. **16**(2): p. 313-318.
88. Hesters, L., et al., *Impact of early cleaved zygote morphology on embryo development and in vitro fertilization—embryo transfer outcome: a prospective study.* Fertility and Sterility, 2008. **89**(6): p. 1677-1684.
89. Prados, F.J., et al., *The cleavage stage embryo.* Human Reproduction, 2012. **27**(suppl_1): p. i50-i71.

90. Gardner, D.K. and B. Balaban, *Assessment of human embryo development using morphological criteria in an era of time-lapse, algorithms and 'OMICS': is looking good still important?* Molecular Human Reproduction, 2016. **22**(10): p. 704-718.
91. Ebner, T., et al., *Morphological analysis at compacting stage is a valuable prognostic tool for ICSI patients*. Reproductive BioMedicine Online, 2009. **18**(1): p. 61-66.
92. Fragouli, E., et al., *Morphological and cytogenetic assessment of cleavage and blastocyst stage embryos*. Molecular Human Reproduction, 2013. **20**(2): p. 117-126.
93. Hardarson, T., L. Van Landuyt, and G. Jones, *The blastocyst*. Human Reproduction, 2012. **27**(suppl_1): p. i72-i91.
94. Gardner, D.K., *Towards reproductive certainty: infertility and genetics beyond*. vitro culture of human blastocysts, 1999: p. 378-389.
95. Racowsky, C., P. Kovacs, and W.P. Martins, *A critical appraisal of time-lapse imaging for embryo selection: where are we and where do we need to go?* Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2015. **32**(7): p. 1025-1030.
96. Kaser, D.J. and C. Racowsky, *Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: a systematic review*. Human Reproduction Update, 2014. **20**(5): p. 617-631.
97. Gallego, R.D., J. Remohí, and M. Meseguer, *Time-lapse imaging: the state of the art*. Biology of Reproduction, 2019. **101**(6): p. 1146-1154.
98. Kovacs, P., *Embryo selection: the role of time-lapse monitoring*. Reproductive Biology and Endocrinology, 2014. **12**(1): p. 124.
99. Geng, T., et al., *The effect of ICSI in infertility couples with non-male factor: a systematic review and meta-analysis*. Journal of assisted reproduction and genetics, 2020. **37**(12): p. 2929-2945.
100. Bosch, E., et al., *ALWAYS ICSI? A SWOT analysis*. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2020. **37**(9): p. 2081-2092.
101. Baskaran, S., et al., *Diagnostic value of routine semen analysis in clinical andrology*. Andrologia, 2021. **53**(2): p. e13614.
102. CRYOTOP SAKETY KIT Vitrification Protocol for Cryotop Method:
KITAZATO(C). 2019; Available from: https://www.kitazato-ivf.com/wp-content/uploads/2021/05/Brochure_Vitrification_Protocol_v_2019-1.pdf.
103. Jiang, L., et al., *Normal fertilisation rates and serum 25-OHD levels among couples undergoing in-vitro fertilisation: a prospective cohort study*. BMC pregnancy and childbirth, 2020. **20**(1): p. 1-8.
104. *The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of ART laboratory performance indicators*. Reproductive BioMedicine Online, 2017. **35**(5): p. 494-510.
105. Corporation, M., *Microsoft Excel*. 2018.
106. Inc., S., *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 29.0*. Armonk, NY: IBM Corp. 2022.
107. Wong, K.M., et al., *Fresh versus frozen embryo transfers in assisted reproduction*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2017(3).
108. Pathare, A.D.S., et al., *Endometrial receptivity in women of advanced age: an underrated factor in infertility*. Hum Reprod Update, 2023.
109. Menkveld, R., C.A. Holleboom, and J.P. Rhemrev, *Measurement and significance of sperm morphology*. Asian J Androl, 2011. **13**(1): p. 59-68.
110. De Vos, A., et al., *Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection*. Fertility and Sterility, 2003. **79**(1): p. 42-48.
111. French, D.B., et al., *Does severe teratozoospermia affect blastocyst formation, live birth rate, and other clinical outcome parameters in ICSI cycles?* Fertility and Sterility, 2010. **93**(4): p. 1097-1103.

112. Neri, Q.V., et al., *Understanding fertilization through intracytoplasmic sperm injection (ICSI)*. Cell Calcium, 2014. **55**(1): p. 24-37.
113. Devesa, M., et al., *Cumulative live birth rates and number of oocytes retrieved in women of advanced age. A single centre analysis including 4500 women ≥ 38 years old*. Human Reproduction, 2018. **33**(11): p. 2010-2017.
114. Spandorfer, S.D., et al., *An Analysis of the Effect of Age on Implantation Rates*. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2000. **17**(6): p. 303-306.
115. Lin, J., et al., *Effect of Maternal Age on Pregnancy or Neonatal Outcomes Among 4,958 Infertile Women Using a Freeze-All Strategy*. Frontiers in Medicine, 2020. **6**.
116. Yan, J., et al., *Effect of maternal age on the outcomes of in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET)*. Science China Life Sciences, 2012. **55**(8): p. 694-698.
117. Zaat, T., et al., *Fresh versus frozen embryo transfers in assisted reproduction*. Cochrane Database Syst Rev, 2021. **2**(2): p. Cd011184.
118. Maheshwari, A., et al., *Transfer of thawed frozen embryo versus fresh embryo to improve the healthy baby rate in women undergoing IVF: the E-Freeze RCT*. Health Technol Assess, 2022. **26**(25): p. 1-142.
119. Roque, M., et al., *Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis*. Fertility and Sterility, 2013. **99**(1): p. 156-162.
120. Shapiro, B.S., et al., *Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders*. Fertility and Sterility, 2011. **96**(2): p. 344-348.
121. Basirat, Z., et al., *Comparison of pregnancy rate between fresh embryo transfers and frozen-thawed embryo transfers following ICSI treatment*. Int J Reprod Biomed, 2016. **14**(1): p. 39-46.
122. Roque, M., et al., *Fresh versus elective frozen embryo transfer in IVF/ICSI cycles: a systematic review and meta-analysis of reproductive outcomes*. Human Reproduction Update, 2018. **25**(1): p. 2-14.
123. Shapiro, B.S., et al., *Similar ongoing pregnancy rates after blastocyst transfer in fresh donor cycles and autologous cycles using cryopreserved bipronuclear oocytes suggest similar viability of transferred blastocysts*. Fertility and Sterility, 2010. **93**(1): p. 319-321.