

O panorama da Procriação Medicamente Assistida: a criopreservação de ovócitos e a influência da vitrificação nas suas taxas de sucesso

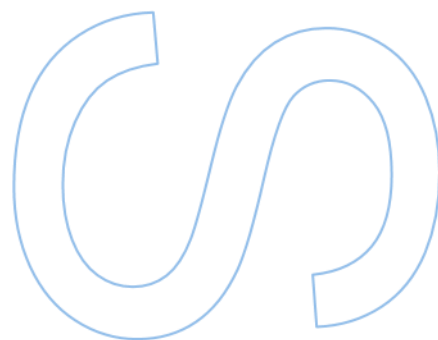
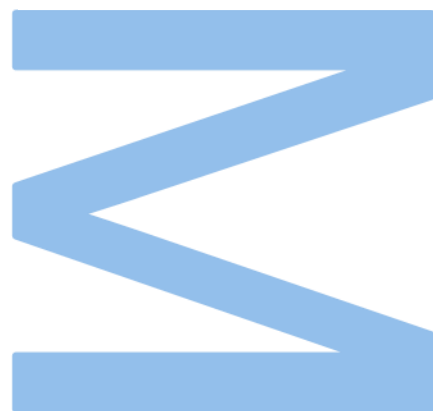
Inês Andreia Alcaide Tavares

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Departamento de Biologia

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

2023/2024



O panorama da Procriação Medicamente Assistida: a criopreservação de ovócitos e a influência da vitrificação nas suas taxas de sucesso

Inês Andreia Alcaide Tavares

Relatório de Estágio realizado no âmbito do Mestrado em
Biologia Celular e Molecular
Departamento de Biologia
2023/2024

Orientador

Prof. Luís Filipe Costa de Castro
Professor Auxiliar
FCUP

Coorientador

Prof. Dr. Vasco Manuel Leal Martins de Almeida, Diretor de
Laboratório, Centro de Estudos de Infertilidade e Esterilidade
(CEIE)



*Dedicado ao Benny, pela pessoa que foi e
que continuará a ser. Para sempre.*

Agradecimentos

Ao professor Vasco Almeida, por me ter concedido a oportunidade de realizar o meu estágio no CEIE, pela confiança que depositou em mim e por todo o apoio, simpatia, compreensão e disponibilidade demonstrados ao longo deste último ano e durante todo o meu percurso académico.

Ao meu coordenador, professor Filipe Castro, pela dedicação e profissionalismo que sempre demonstrou, bem como pelo apoio, empatia, disponibilidade e prontidão ao longo do meu percurso académico.

Ao professor José Américo Sousa, pela dedicação e esforço demonstrados como diretor de Mestrado, e pela contínua disponibilidade, simpatia e acompanhamento oferecidos.

Aos Doutores Joaquim Gonçalves e Jorge Braga, e a toda a equipa do CEIE, pela oportunidade que me deram, e por me terem acolhido tão bem ao longo de todo o ano curricular.

Um sincero e profundo obrigado às doutoras Isabel Damião e Sara Oliveira por me terem acolhido e integrado desde o primeiro dia, e por tudo o que me ensinaram, tanto da área da reprodução assistida como da vida. Pelo profissionalismo, dedicação, disponibilidade, paciência, amizade, companhia, por todas as experiências vivenciadas e por todas as horas de almoço descontraídas, e, acima de tudo, por todo o apoio que me deram ao longo do ano.

Ao João Faria, pelo auxílio dado no planeamento do projeto científico e nas análises estatísticas, e por sempre se mostrar disponível para esclarecer qualquer dúvida, a qualquer altura.

Aos meus amigos, Catarina Pinto, Mariana Trigo, Tomás Gabriel, Rodrigo Samico e Manuel Baldaque, por tudo o que vivemos nos últimos anos, pelo companheirismo, por todos os bons e maus momentos, pela vossa paciência, por serem o meu maior apoio e por serem os melhores amigos que poderia ter. Ao Gonçalo Fernandes e ao João Andrade, um especial obrigado por terem feito com que o primeiro ano de mestrado tivesse sido inesquecível.

Aos meus pais, por tudo o que sempre fizeram e continuam a fazer por mim, e por me apoiarem em todas as decisões da minha vida. Tudo o que hoje sou, devo-lhes a eles.

Ao meu namorado e melhor amigo, Bernardo Pinto, por ter sido a minha maior inspiração e a melhor pessoa que conheci em toda a minha vida. Por tudo o que me ensinou, pelas palavras de incentivo, por sempre acreditar em mim e por toda a força que me deu e que continuará a dar. Foi o seu amor inabalável e apoio incondicional, juntamente com a certeza que me deu de que estaria sempre orgulhoso de mim, que me motivou a chegar até aqui e, por isso, lhe dedico este relatório em sinal de homenagem e gratidão.

Resumo

A Procriação Medicamente Assistida (PMA) engloba um conjunto de procedimentos médicos e técnicas laboratoriais que visam solucionar problemas relacionados com a infertilidade de um casal, ou com a incapacidade de conceção natural, nomeadamente em casais de mulheres ou mulheres em projetos monoparentais. A aplicação das técnicas de reprodução assistida e o seu consequente progresso têm sido determinantes na abordagem ao crescimento exponencial de casos de infertilidade que se observa atualmente. Entre as técnicas laboratoriais de PMA, as mais conhecidas e utilizadas são a inseminação intrauterina (IIU), a fertilização *in vitro* (FIV), a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) e a criopreservação de gâmetas e embriões, todas envolvendo a manipulação de gâmetas e embriões *in vitro*, de forma a potenciar as probabilidades da ocorrência de uma gravidez.

O presente relatório teve como principal objetivo explorar todos os aspetos relacionados com a PMA, entre os quais o sistema reprodutor e os mecanismos subjacentes ao seu funcionamento, o tema da infertilidade e a análise das suas diversas causas e metodologias de avaliação, apresentando-se também uma descrição detalhada das técnicas atualmente reconhecidas e dos procedimentos adotados em cada uma, com especial foco naquelas com as quais tive oportunidade de entrar em contacto durante o estágio.

Complementarmente, realizou-se uma análise retrospectiva dos dados relativos a ciclos de FIV e/ou ICSI cujos ovócitos provêm de programas de doação, de modo a avaliar a eficácia da criopreservação dos ovócitos através da comparação entre ciclos com ovócitos a fresco e ciclos com ovócitos vitrificados. Decorrente da comparação dos resultados laboratoriais e clínicos, observou-se que, apesar da viabilidade dos ovócitos não ser comprometida pela vitrificação, a capacidade fecundante dos mesmos foi desfavorecida em relação aos ovócitos usados a fresco. O seu desenvolvimento embrionário revelou-se, no entanto, comparável ao dos ciclos a fresco, evidenciado pelos indicadores de performance embrionários, e pelos eventos subsequentes à transferência embrionária, implantação e nascimento. Conclui-se, portanto, que a criopreservação de ovócitos cumpre o objetivo final, que é a ocorrência de uma gravidez bem-sucedida.

Palavras-chave: Reprodução, Hormonas, Fecundação, Infertilidade, Inseminação intrauterina, Fertilização *in vitro*, Injeção intracitoplasmática de espermatozoides, Embriões, Gravidez.

Abstract

Medically Assisted Reproduction encompasses a set of medical procedures and laboratory techniques aimed at solving issues related to infertility in couples, or the inability to conceive naturally, particularly in lesbian couples or women in single-parent projects. The application of assisted reproductive techniques (ART), and their subsequent progress, have been decisive in addressing the exponential increase in infertility cases currently reported. Among the laboratory techniques in ART, the most well-know and utilized are the intrauterine insemination (IUI), *in vitro* fertilization (IVF), intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and gamete and embryo cryopreservation, all of these involving the manipulation of gametes and embryos *in vitro*, in ways of enhancing the probability of achieving a pregnancy.

The main objective of this report was to explore all aspects related to medically assisted reproduction, including the reproductive system and the mechanisms underlying its functioning, the topic of infertility, along with its causes and assessment methodologies, providing also a detailed description of currently recognized techniques and the procedures for each of them, with special focus on those in which I had the opportunity to engage with during this internship.

In addition, a retrospective analysis of data related to IVF and/or ICSI cycles using donor oocytes was conducted to evaluate the effectiveness of oocyte cryopreservation by comparing cycles with fresh oocytes to those with vitrified oocytes. The comparison of laboratory and clinical results revealed that, although oocyte viability is not compromised by vitrification, its fertilization capacity was disfavoured relative to that of fresh oocytes. Its embryonic development, however, proved to be comparable to that of fresh oocytes, as shown by embryonic performance indicators and subsequent events following embryo transfer, implantation and birth. Therefore, it can be concluded that oocyte cryopreservation achieves its ultimate goal, which is the occurrence of a successful pregnancy.

Keywords: Reproduction, Hormones, Fecundation, Infertility, Intrauterine Insemination, *In vitro* Fertilization, Intracytoplasmic Sperm Injection, Embryos, Pregnancy.

Índice

Agradecimentos.....	ii
Resumo	iv
Abstract	v
Lista de Tabelas	viii
Lista de Gráficos.....	x
Lista de Figuras	xi
Lista de Abreviaturas	xiii
Capítulo 1 – PMA: Introdução	1
1. Sistema reprodutor.....	1
1.1. Controlo hormonal do sistema reprodutor.....	1
1.2. Sistema reprodutor feminino.....	2
1.3. Sistema reprodutor masculino	11
1.4. Desde o transporte dos gâmetas até à implantação	16
2. Infertilidade.....	20
2.1. Prevalência da infertilidade	20
2.2. Causas de infertilidade	22
2.3. Abordagem do casal infértil.....	31
Capítulo 2 – Técnicas de Reprodução Assistida.....	37
1. Colheita, preparação e seleção de gâmetas.....	37
1.1. Gâmetas masculinos	37
1.2. Gâmetas femininos.....	51
2. Procedimentos	59
2.1. Inseminação intrauterina (IIU).....	59
2.2. Fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....	61
2.3. Injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).....	63
2.4. Cultura embrionária	67
2.5. Teste Genético Pré-Implantação (PGT).....	79

2.6.	Transferência embrionária.....	83
2.7.	Criopreservação	86
2.8.	Doação de gâmetas e embriões	99
Capítulo 3 – Criopreservação de ovócitos : os efeitos da vitrificação na qualidade embrionária e respetivas taxas de sucesso		103
1.	Introdução	103
2.	Métodos	104
2.1.	Recolha de dados.....	104
2.2.	Preparação dos dados e análises estatísticas	105
3.	Resultados	109
3.1.	Análise descritiva e estatística dos resultados	109
4.	Discussão.....	121
5.	Conclusão	126
Referências Bibliográficas		127

Lista de Tabelas

Tabela 1. Tabela com fatores de conversão próprias para uma câmara de contagem <i>Neubauer Improved</i> , dependendo do número de quadrados contados e da diluição realizada. Adaptado de [119].	43
Tabela 2. Valores de referência mínimos para uma análise espermática, atualizados conforme o manual da OMS de 2021 [119].	47
Tabela 3 – Parâmetros morfocinéticos absolutos, que representam o <i>timing</i> (em horas) no qual se dá o evento correspondente. Adaptado de [291].	76
Tabela 4 – Parâmetros morfocinéticos relativos, que representam a duração de um evento específico. Adaptado de [291].	77
Tabela 5 – Pontuações atribuídas aos blastocistos, de acordo com a sua respetiva classificação.	107
Tabela 6 – Caracterização dos valores de idade e IMC das dadoras, com respetivos valores da média, desvio padrão (DP), erro padrão (EP), mediana, amplitude interquartil (AI) e amplitude com valor mínimo e máximo.	110
Tabela 7 - Caracterização dos valores de idade e IMC das recetoras no grupo dos ovócitos usados a fresco (F) e grupo dos ovócitos vitrificados (V) com respetivos valores da média, desvio padrão (DP), erro padrão (EP), mediana, amplitude interquartil (AI) e amplitude com valor mínimo e máximo.	110
Tabela 8 - Teste não paramétrico de <i>Mann-Whitney</i> para avaliação da existência de diferenças significativas entre as idades e os valores do IMC entre os grupos de recetoras.	110
Tabela 9 – Quantificação dos ovócitos usados para os ciclos de tratamento: número total dos ovócitos recolhidos, usados a fresco, desnudados, maduros, vitrificados e usados, e respetivos valores da média, desvio padrão (DP), erro padrão, mediana e respetiva amplitude interquartil (IQR) e amplitude com valores mínimos e máximos.	111
Tabela 10 - Proporções de ovócitos calculadas para o número de ovócitos usados a fresco, desnudados e criopreservados usados, em relação ao número de ovócitos recolhidos. Apresentação dos valores da média, desvio padrão (DP), erro padrão, mediana e respetiva amplitude interquartil (IQR), e amplitude com números mínimo e máximo.	112
Tabela 11 – Teste t de <i>Student</i> para amostras independentes para avaliação da existência de diferenças estatisticamente significativas entre as proporções de ovócitos usados a fresco e ovócitos criopreservados usados, em relação aos ovócitos recolhidos.	113

Tabela 12 – Taxa de sobrevivência. Apresentação dos valores da média, desvio padrão (DP), erro padrão, mediana e amplitude interquartil (IQR).	113
Tabela 13 – Número de ovócitos inseminados, fecundados e respetivas taxas de fecundação para os grupos de ciclos com ovócitos a fresco (F) e ciclos com ovócitos vitrificados (V). Apresentação do número total e valores da média, desvio padrão (DP), erro padrão, mediana e respetiva amplitude interquartil (IQR), e amplitude com valores mínimo e máximo.	114
Tabela 14 – Teste não paramétrico de <i>Mann-Whitney</i> para avaliação das diferenças estatisticamente significativas para o número de ovócitos inseminados, fecundados e respetivas taxas de fecundação, entre os grupos de ovócitos usados a fresco e grupos de ovócitos vitrificados.	115
Tabela 15 – Número total de embriões em clivagem e respetivas taxas de clivagem para o grupo dos ovócitos a fresco (F) e grupo dos ovócitos vitrificados (V). Apresentação dos valores da média, desvio padrão (DP), erro padrão, mediana e respetiva amplitude interquartil (IQR) e amplitude com valores mínimo e máximo.	116
Tabela 16 - Número total de blastocistos e blastocistos de boa qualidade, e respetivas taxas de formação de blastocistos e de blastocistos de boa qualidade para o grupo dos ovócitos a fresco (F) e grupo dos ovócitos vitrificados (V). Apresentação dos valores da média, desvio padrão (DP), erro padrão, mediana e respetiva amplitude interquartil (IQR) e amplitude com valores mínimo e máximo.	117
Tabela 17 - Teste não paramétrico de <i>Mann-Whitney</i> para avaliação das diferenças estatisticamente significativas para o número de embriões em clivagem e respetivas taxas de clivagem, número de blastocistos, número de blastocistos de boa qualidade e respetivas taxas de formação de blastocistos e blastocistos de boa qualidade.	118
Tabela 18 - Representação do número total de casos de sucesso e insucesso de implantação entre todas as transferências realizadas (contagem) e taxas de implantação (percentagens de sucesso destacadas) para os grupos de ovócitos a fresco e grupos de ovócitos vitrificados.	119
Tabela 19 – Representação do número total de casos de sucesso e insucesso de nascimentos entre todas as implantações registadas (nados-vivos / GC) e de nascimentos entre todas as transferências registadas (nados-vivos / transferências), e respetivas taxas de sucesso (percentagens destacadas) para o grupo dos ovócitos usados a fresco e grupo dos ovócitos vitrificados.	120
Tabela 20 - Teste de Qui-Quadrado de Pearson para avaliação das diferenças estatisticamente significativas para as taxas de implantação e taxas de nados-vivos.	120

Lista de Gráficos

Gráfico 1 – Distribuição do número de ciclos conforme quantidade de ovócitos utilizados. No eixo do X, os ovócitos estão divididos em intervalos de 0 a 5, 5 a 10, 11 a 20, 21 a 30 e mais de 30, sendo que cada intervalo é representado pelas barras. O eixo do Y representa a frequência de ciclos que possuem um número de ovócitos dentro desses intervalos. 112

Gráfico 2 – Diagrama de caixa que representa as diferenças na distribuição dos ovócitos inseminados (I) e fecundados (F) entre o grupo de ovócitos a fresco e grupo de ovócitos vitrificados. Cada uma das linhas centrais das caixas representam o valor da mediana, enquanto os limites das caixas, referentes ao 1º e ao 3º quartil, e os extremos das linhas, referentes aos valores máximo e mínimo, representam a dispersão dos dados..... 115

Lista de Figuras

Figura 1. Representação ilustrativa do aparelho reprodutor feminino. Adaptado de [1].	2
Figura 2. Representação ilustrativa do útero, ovários e trompas de Falópio. Adaptado de [5].	3
Figura 3. Ilustração esquemática do desenvolvimento folicular e oogénese. Adaptado de [5].	6
Figura 4. Representação gráfica da variação das concentrações da FSH, LH, estradiol e progesterona durante o ciclo menstrual. Adaptado de [1].	8
Figura 5. Ilustração representativa das variações da espessura do endométrio durante o ciclo uterino. Adaptado de [1].	10
Figura 6. Representação ilustrativa do aparelho reprodutor masculino. Adaptado de [1].	11
Figura 7. Representação ilustrativa do testículo e epidídimo, com respetiva legenda dos seus constituintes. Adaptado de [5].	12
Figura 8. Representação ilustrativa de um espermatozoide e suas estruturas. Criado a partir do BioRender.	14
Figura 9. Representação ilustrativa de uma porção do túbulo seminífero onde se observa as várias fases da espermatogénese. Adaptado de [5].	15
Figura 10. Representação ilustrativa das mudanças morfológicas típicas em espermatozoides humanos expostos a stress hipoosmótico. Retirado de [119].	41
Figura 11. Representação esquemática da área inscrita numa câmara de <i>Neubauer</i> : no painel do lado esquerdo observam-se os 9 compartimentos, e no painel do meio, o compartimento central (C) dividido em 25 quadrados, contendo todos eles 16 quadrados, delimitados todos eles por linhas triplas, tal como representado no painel do lado direito. Retirado de [119].	43
Figura 12. Foto representativa de um espermatozoide morfollogicamente normal (A). Retirado de [119].	45
Figura 13. Fotos representativas de espermatozoides com anomalias de cabeça. (A) Afunilada; (B) Piriforme, (C) Redonda; (D) Amorfa; (E) Acrossoma grande; (F) Vacuolizada; (G) Acrossoma pequeno; (H) Pequena. Retirado de [131].	45
Figura 14. Fotos representativas de espermatozoides com anomalias de peça intermédia. (A) Dobrada; (B) Espessa; (C) Restos citoplasmáticos. Retirado de [131].	46

Figura 15. Fotos representativas de espermatozoides com anomalias de cauda. (A) Dobrada; (B) Dupla; (C) Em <i>loop</i> ; (D) Enrolada. Retirado de [131].	46
Figura 16. Representação em fotografia de outras células para além de espermatozoides. (A) Macrófago; (B) Citoplasma; (C) Espermatozoide anormal; (D) Espermátide em divisão; (E) Espermatócito; (F) Espermátide em degeneração; (G) Espermatócito em divisão; (H) Macrófago em fagocitose; (I) – Espermátide. Retirado de [119].	46
Figura 17. Ovócitos em diferentes estados de maturação conforme a fase meiótica. (A) Ovócito imaturo, com a vesícula germinal presente; (B) Ovócito imaturo em metáfase I, onde já não se observa vesícula germinal; (C) Ovócito maduro, em metáfase II, com desaparecimento da vesícula germinal e extrusão do 1º GP. Retirado de [190].	57
Figura 18. Ovócitos com anomalias morfológicas. (A) Espaço perivitelino granulado; (B) Glóbulo polar fragmentado; (C) Espessamento e escurecimento da ZP; (D) Inclusões citoplasmáticas; (E) Espaço perivitelino alargado e granulado; (F) Vacúolo citoplasmático de grandes dimensões. Retirado de [190].	58
Figura 19. Representação do procedimento de microinjeção, observando-se a entrada da micropipeta de microinjeção, a deposição do espermatozoide no interior do citoplasma do ovócito, e a posterior retirada da micropipeta. Retirado de [219].	67
Figura 20. Ovócito com dois PNs visíveis e dois glóbulos polares no espaço perivitelino. Retirado de [479].	70
Figura 21. Representação esquemática do sistema de classificação Z-scoring, que combina a avaliação da orientação dos PNs com o padrão de distribuição dos CPN. Adaptado de [261].	71
Figura 22. Primeira divisão mitótica do zigoto. Retirado de [479].	72
Figura 23. Embrião ao 2º e 3º dia de desenvolvimento, apresentando, respetivamente, 4 e 8 células. Retirado de [479].	73
Figura 24. Embrião em fase de morula, ao 4º dia de desenvolvimento. Retirado de [479].	74
Figura 25. Embrião em fase de blastocisto. Retirado de [480].	75

Lista de Abreviaturas

PMA	Procriação Medicamente Assistida
GnRH	Hormona Libertadora de Gonadotrofinas
FSH	Hormona Folículo-Estimulante
LH	Hormona Luteinizante
ZP	Zona Pelúcida
GP	Glóbulo Polar
hCG	Gonadotrofina Coriónica Humana
PSA	Antigénio Específico da Próstata
ABP	Proteína de Ligação de Androgénios
CCO	Complexo <i>cumulus oophorus</i>
PN	Pronúcleo
TE	Trofoectoderme
MCI	Massa Celular Interna
OMS	Organização Mundial de Saúde
ISTs	Infeções Sexualmente Transmissíveis
IMC	Índice de Massa Corporal
SOP	Síndrome dos Ovários Poliquísticos
EROs	Espécies Reativas de Oxigénio
AZF	Fator de Azoospermia
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembranar Conductance Regulator</i>
AO	Azoospermia Obstrutiva
ANO	Azoospermia Não Obstrutiva
AMH	Hormona Antimülleriana
IIU	Inseminação Intrauterina

FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
ICSI	Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides
TESE	<i>Testicular Sperm Extraction</i>
CC	Citrato de Clomifeno
COH	Hiperestimulação Ovária Controlada
SHO	Síndrome de Hiperestimulação Ovária
VG	Vesícula Germinativa
AREL	Agregados de Retículo Endoplasmático Liso
CPN	Corpos Precursores de Nucléolos
PGT	Teste Genético Pré-Implantação
PVP	Polivinilpirrolidona
Eeva	<i>Early Embryo Viability Assessment</i>
FISH	Hibridização Fluorescente <i>in situ</i>
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
NGS	Sequenciação de Nova Geração
ETP	Estatística de Teste Padronizada

Capítulo 1 – PMA: Introdução

A Procriação Medicamente Assistida (PMA) trata-se um conjunto de abordagens médicas e técnicas laboratoriais cujo principal objetivo se baseia na obtenção de uma gravidez bem-sucedida em casais cuja fertilidade se encontra comprometida, em mulheres sem parceiro ou em casais de mulheres. A PMA trata assim da resolução de problemas relacionados com a reprodução humana, através da aplicação de técnicas cuja complexidade dependerá do grau de infertilidade e do tratamento em causa. Para o desenvolvimento dessas técnicas é necessário conhecer-se todos os processos inerentes ao processo da reprodução humana e, conseqüentemente, todos os fatores que poderão interferir, direta ou indiretamente, com esses mecanismos.

1. Sistema reprodutor

1.1. Controlo hormonal do sistema reprodutor

O eixo hipotálamo-hipófise-gónadas trata-se de um sistema endócrino complexo que exerce um papel essencial na regulação de todas as funções reprodutivas através de um controlo hormonal [1].

Tal como o nome indica, o primeiro nível de controlo incide sobre a estimulação do hipotálamo, uma pequena região do cérebro humano cujo principal objetivo se baseia na manutenção da homeostase do organismo, através da interligação entre os sistemas nervoso e endócrino [2]. Esta estimulação irá desencadear a produção hormonal a partir da hipófise anterior, uma vez que ambas as estruturas se encontram ligadas via vascular, pelo sistema porta-hipofisário, permitindo assim controlar e manter as funções endócrinas [3]. A hipófise anterior constitui parte da estrutura hipofisária localizada na base do crânio, numa cavidade óssea designada sela turca, que inclui também a hipófise posterior [1]. As hormonas produzidas na hipófise anterior irão, por sua vez, atuar sobre as gónadas, levando à estimulação da libertação de outras hormonas sexuais [4]. Todo este processo se inicia a partir da secreção, em resposta à estimulação no hipotálamo, da hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH – *Gonadotropin-releasing hormone*) que é transportada até à hipófise anterior, cujo efeito sobre a mesma levará à secreção de duas gonadotrofinas, a hormona folículo-estimulante (FSH – *Follicle-stimulating hormone*) e a hormona luteinizante (LH – *Luteinizing hormone*) [5]. A estimulação da GnRH irá depender de vários fatores, tais como o *feedback* hormonal, sendo ele positivo ou negativo, fatores ambientais e mecanismos regulatórios internos. As duas gonadotrofinas mencionadas irão incidir diretamente sobre as gónadas, levando à libertação de hormonas sexuais,

nomeadamente androgénios (testosterona), estrogénios e progesterona, as quais exercerão também um efeito de *feedback* sobre as gonadotrofinas e a GnRH em ocasiões específicas [5].

No aparelho reprodutor feminino, ambas as gonadotrofinas exercem um efeito sobre os ovários. A FSH encarrega-se da produção de células germinativas maduras, e a LH estimula a secreção de hormonas sexuais a partir dos ovários, levando, consequentemente, à libertação de um ovócito. No aparelho reprodutor masculino, a produção de células germinativas é igualmente da responsabilidade da FSH, ao passo que a LH promove a síntese de androgénios nas gónadas masculinas, os testículos [5].

A formação dos gametas femininos ou masculinos, *i.e.*, a gametogénese, envolve quatro fases distintas, semelhantes aos dois sistemas reprodutivos, sendo estas a génese e migração das células germinativas em direção às gónadas e a sua proliferação mitótica, a redução do número de cromossomas por meiose e finalmente, a maturação estrutural e funcional dos gametas [4].

1.2. Sistema reprodutor feminino

O sistema reprodutor feminino compreende uma rede complexa de órgãos e mecanismos fisiológicos associados, cujas principais funções são a reprodução, a produção de hormonas e a manutenção da gravidez. O aparelho reprodutor feminino (Figura 1) é constituído pela vagina e genitália externa, por dois ovários, as respetivas trompas de Falópio e o útero [5]. Estruturas como os lábios maiores e menores, clitóris, orifício vaginal e urinário fazem parte da genitália externa feminina, compondo a vulva. Ao contrário do que acontece no aparelho reprodutor masculino, os ductos urinários encontram-se separados dos reprodutores [1].

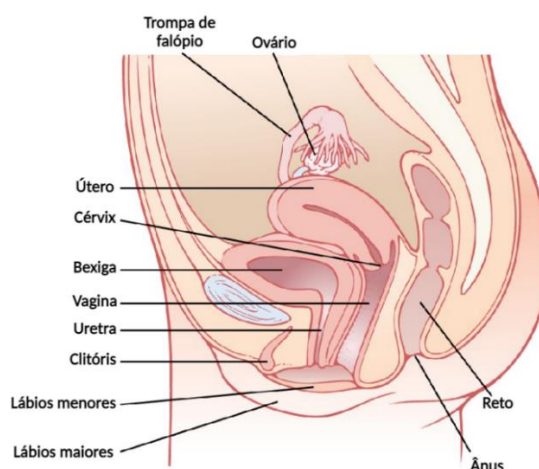


Figura 1. Representação ilustrativa do aparelho reprodutor feminino. Adaptado de [1].

A vagina, um canal muscular que se estende desde o cérvix até à vulva, desempenha várias funções reprodutivas e fisiológicas, entre as quais se destacam o facto de a mesma servir como canal de passagem do fluxo menstrual, canal de entrada do pénis durante as relações sexuais, e também como passagem do feto no nascimento [5]. Histologicamente, a parede vaginal é composta por três camadas diferentes, sendo duas delas a túnica mucosa e a túnica muscular, compostas, respetivamente, por células mucosas e por feixes de músculo liso e fibras elásticas, permitindo que as paredes da vagina se expandam de forma a cumprir com as suas funções. Ambas as camadas são sobrepostas por uma terceira camada adventícia de tecido conjuntivo [5, 6].

Relativamente ao útero, o mesmo é dividido em quatro regiões distintas, tal como evidenciado na Figura 2. O fundo uterino corresponde à porção superior do útero, o corpo uterino à zona central, e o istmo uterino e o canal cervical compõem a porção inferior do mesmo [5]. A parede uterina é organizada em três camadas que diferem na sua composição histológica, analogamente à parede vaginal. A primeira camada, e mais externa, trata-se do perimétrio, composta por tecido conjuntivo, seguindo-se o miométrio, organizado em fibras de músculo liso, e o endométrio, um revestimento mucoso dividido em duas camadas, o estrato funcional, que sofre descamação a cada ciclo menstrual, e um estrato basal, que ao contrário do funcional, permanece intacto. As alterações hormonais que acompanham o ciclo menstrual irão ter um impacto sobre as propriedades físicas do útero, nomeadamente em relação à espessura da camada funcional, mas também na secreção do muco que é produzido no cérvix, cuja composição e viscosidade irão alterar-se conforme as alterações hormonais [4].

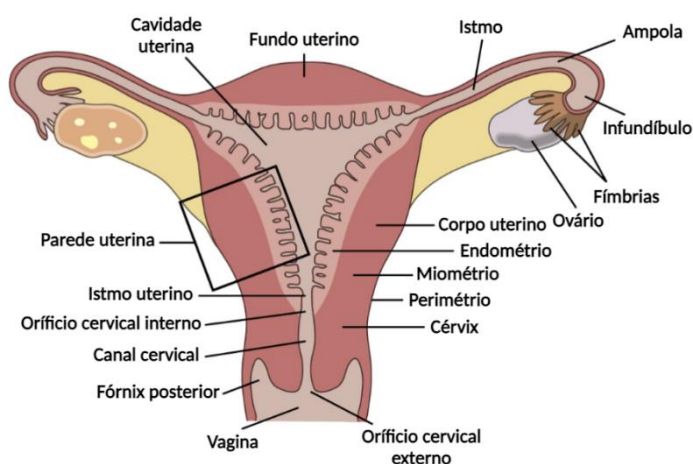


Figura 2. Representação ilustrativa do útero, ovários e trompas de Falópio. Adaptado de [5].

As trompas de Falópio, particularmente essenciais no transporte ovocitário e embrionário, estendem-se desde os ovários até ao topo do útero, e, histologicamente, dividem-se em quatro zonas distintas, o infundíbulo, a ampola, o istmo e a porção intramural. O infundíbulo e a porção intramural compõem as duas extremidades da trompa, sendo o primeiro a extremidade mais próxima do ovário, possuindo fímbrias que auxiliarão no transporte do ovócito na altura da ovulação, e a porção intramural aquela que conecta as trompas ao útero. Entre estas localizam-se a ampola e o istmo. A funcionalidade de cada uma destas zonas encontra-se diretamente relacionada com a espessura de cada uma das três camadas que compõem as paredes tubais, sendo elas a camada serosa, a muscular e a mucosa, composta por células ciliadas e não ciliadas [5]. Posto isto, a ampola e infundíbulo caracterizam-se por uma maior espessura da sua camada mucosa, ao contrário do istmo e da porção intramural, cuja camada muscular é mais espessa [6]. Alguns aspetos funcionais das trompas, tais como as contrações musculares, o aumento dos batimentos ciliares do epitélio e a produção de fluidos pelas células secretoras, irão ser diretamente influenciados pelo controlo hormonal, com o propósito de auxiliar o transporte ovocitário, assim como o embrionário, e também os movimentos dos espermatozoides [5].

A produção das células germinativas femininas, os ovócitos, é da responsabilidade dos ovários, que irão ter um papel igualmente fundamental na produção de hormonas, tais como a progesterona e o estrogénio [4]. Os dois ovários posicionam-se na porção superior da cavidade pélvica, um de cada lado do útero, sendo suportados por um conjunto de ligamentos que os conectam a órgãos vizinhos e, em conjunto com estes, se mantêm propriamente alinhados e seguros, um detalhe crucial para que o ovócito seja corretamente transportado do ovário até ao útero, através das trompas [5]. A superfície externa do ovário é coberta pelo epitélio superficial, ou epitélio germinativo, e por baixo deste posiciona-se a túnica albugínea, uma camada de tecido conjuntivo denso. A superfície interna do ovário é dividida entre o córtex e a medula, caracterizando-se, respetivamente, por zonas mais e menos densas. No córtex, situam-se as células germinativas femininas, designadas de ovócitos, que são incluídos numa estrutura designada de folículo ovárico, que poderá exibir diferentes estados de desenvolvimento no estroma do ovário. A zona medular é composta por largos vasos sanguíneos dispostos em espiral, vasos linfáticos e nervos. Entre o ovócito e a parede folicular encontra-se uma membrana transparente, a zona pelúcida (ZP), segregada pelo próprio ovócito [6].

1.2.1. Oogénese

Ao contrário do aparelho reprodutor masculino, as células germinativas femininas mantêm as divisões mitóticas apenas no período fetal, chegando a atingir um número entre 6 e 7 milhões até ao 5º mês de gestação. Os últimos meses da vida fetal caracterizam-se pelo início da primeira divisão meiótica, formando os ovócitos primários [7]. Estes ovócitos, no entanto, ficam suspensos na primeira divisão mitótica e assim que a puberdade é atingida, só aqueles que são selecionados para possível ovulação é que a retomam, enquanto outros acabam por se degenerar por atresia. A retoma da primeira divisão meiótica, que se dá na puberdade, dá origem a duas células filhas de diferente tamanho: uma célula maior que será o ovócito secundário, e uma célula mais pequena que corresponde ao primeiro glóbulo polar (GP). O ovócito secundário inicia a segunda divisão meiótica que ficará suspensa até que se dê a fertilização do ovócito por um espermatozoide. O final da meiose dá origem a um ovócito maduro e a uma outra célula mais pequena que corresponde ao segundo GP [4].

1.2.2. Desenvolvimento Folicular

Os ovócitos primários formados no início da vida fetal são envoltos por uma única camada de células da granulosa, compondo o folículo primordial. O número inicial de 6 a 7 milhões de ovócitos primários, desce para cerca de 1 milhão ao nascimento, fruto da incapacidade de alguns ovócitos serem incorporados em folículos. Por não existir reposição da linha celular germinativa após a vida fetal, o número de folículos diminui gradualmente, numa primeira fase, desde o nascimento até à puberdade, atingindo um número de 400 000 folículos. Durante a vida reprodutiva de uma mulher, este número continua a diminuir, até que se esgote o número de folículos presentes, pondo um fim à capacidade reprodutiva de uma mulher, evento a que se dá o nome de menopausa [7].

Numa primeira fase do desenvolvimento folicular (Figura 3), os folículos começam por ser primordiais, apresentando uma única camada de células da granulosa. Esta única camada é capaz de nutrir o ovócito durante a infância, e é responsável por libertar um fator que inibe a maturação do ovócito de modo que este se mantenha suspenso no seu estado primordial [1, 8]. Um folículo primordial transforma-se em primário assim que as suas células se desenvolvem em tamanho e passam de achatadas a cuboides. A secreção de glicoproteínas a partir destas células permite ainda que se forme a ZP à volta do ovócito [9, 10]. A formação do folículo secundário envolve a divisão mitótica das células da granulosa e o seu envolvimento pelas células da teca [10]. Esta camada irá diferenciar-se em duas distintas: a camada interna, com células fisiologicamente semelhantes às da granulosa, que adquire a capacidade de

libertar estrogénio e progesterona, e a camada externa, intensamente vascular, que irá ser a cápsula de tecido conectivo do folículo em desenvolvimento [1]. A continuação do desenvolvimento dos folículos até ao último estado de desenvolvimento depende se esses mesmos folículos são recrutados pela FSH a partir de um *pool* de folículos que, em caso contrário, sofrerão atresia [8]. Sob influência hormonal, observa-se um aumento da produção de fluido folicular, cuja acumulação leva à formação de uma cavidade antral, e à diferenciação das células da granulosa que rodeiam o ovócito, formando-se o folículo de Graaf [1, 5, 8]. A rutura da superfície do ovário que compõe o processo de ovulação é mediada pela libertação de enzimas que digerem a parede folicular. Imediatamente antes da ovulação, o ovócito completa a sua primeira divisão meiótica. O ovócito secundário é agora rodeado pela ZP e por uma massa de células da granulosa, denominada de *cumulus oophorus*, da qual faz parte a coroa radiata [7].

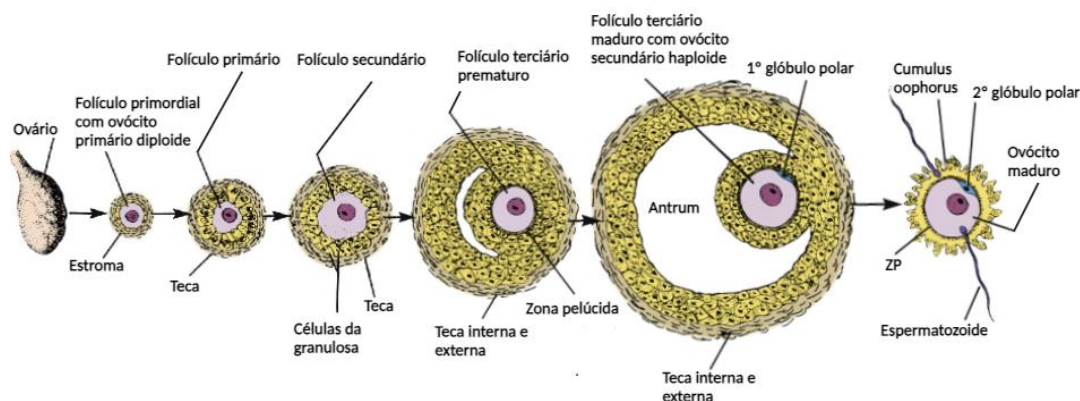


Figura 3. Ilustração esquemática do desenvolvimento folicular e oogenese. Adaptado de [5].

1.2.3. Regulação hormonal associada ao ciclo menstrual

A regulação controlada do ciclo menstrual tem como principal objetivo a coordenação da ovulação de um único ovócito e também a preparação do útero de forma a receber um possível embrião.

1.2.3.1. Ciclo ovárico

O ciclo ovárico (Figura 4) refere-se a todas as alterações que são observadas ao nível dos ovários, mais especificamente, ao nível do crescimento e desenvolvimento dos folículos. Este ciclo é composto pelas fases folicular e lútea, e pelo processo de ovulação intermediário às duas fases. Tendo como duração padronizada de 28 dias, a fase folicular dura desde o 1º até ao 14º dia, momento em que se dá a ovulação, e a fase lútea dá-se desde o 15º dia até ao 28º dia, ou seja, até ao início de um novo ciclo. A

primeira fase do ciclo tem o nome de fase folicular uma vez que corresponde ao momento de crescimento e desenvolvimento folicular. O ciclo inicia-se a partir da atividade da GnRH, que irá atuar sobre a hipófise, libertando as gonadotrofinas FSH e LH. Ambas as hormonas irão ter uma ação estimulante sob células alvo nos folículos através da ligação a recetores específicos para as hormonas – o resultado é um aumento da estimulação do crescimento dos folículos, acompanhado por um aumento nas taxas de secreção de hormonas a partir dos mesmos. Sob influência da FSH, ciclicamente, são recrutados um grupo de folículos que irão crescer e desenvolver até que apenas um seja escolhido como o dominante para ovular, enquanto os restantes degeneram por atresia [1].

Partindo da estimulação da FSH e LH a partir da GnRH, o crescimento dos folículos e a consequente produção de hormonas a partir destes irá envolver a ação da FSH sob as células da granulosa, e da LH sob as células da teca, em virtude da diferenciação dos recetores presentes para cada uma das hormonas nas diferentes células [9]. Ambas as células se encontram em sincronia, num processo enzimático denominado esteroidogénese, que consiste na produção de hormonas esteroideas a partir do seu precursor original, o colesterol. A presença de recetores de LH nas células da teca irá levar à síntese de androgénios, que serão difundidos para as células da granulosa, e ultimamente convertidos em estrogénio através da ação da enzima aromatase que é produzida sob influência da FSH nos recetores destas células. À medida que os folículos se desenvolvem, vai sendo também acumulado estrogénio que, em níveis médios, é capaz de induzir um mecanismo de *feedback* negativo sobre a GnRH, com a FSH a atingir valores mais baixos que LH devido à secreção da hormona inibina por parte das células da granulosa, que irá atuar especificamente sob a FSH. Esta supressão da estimulação da FSH irá levar à degeneração de todos os folículos, excetuando o dominante, que terá sido aquele cuja sensibilidade ao FSH foi maior devido a um aumento dos recetores para a hormona, e, portanto, cujo crescimento foi mais estimulado e que acumulou mais estrogénio [1, 5].

O aumento súbito da secreção dos níveis de estrogénio por parte do folículo dominante irá, no entanto, por *feedback* positivo, estimular um pico de libertação de LH, que irá ser o principal responsável por induzir a ovulação, assim como o resumo da primeira divisão meiótica do ovócito, permitindo que a vesícula germinal se desintegre e se forme um segundo ovócito e o primeiro GP. A LH irá atuar também sobre os recetores da granulosa, promovendo a sua luteinização, resultando na produção de progesterona. Os mecanismos de *feedback* exercidos pelo estrogénio sob as

gonadotrofinas, irão, portanto, depender da sua concentração e duração da exposição. A transição entre a supressão de LH mediada pelo estrogénio e a estimulação da libertação da mesma ocorre à medida que os níveis de estrogénio aumentam durante a fase folicular [7, 8].

O evento físico da ovulação inicia-se com a libertação de enzimas proteolíticas, estimuladas pela FSH, LH e progesterona [8], provocando a dissolução e enfraquecimento da parede folicular. Simultaneamente, observa-se uma proliferação vascular na parede folicular e a secreção de prostaglandinas, que levam a que o folículo inche, e, finalmente, rompa, libertando o ovócito [1]. Assim que se dá a expulsão do ovócito, as células da granulosa e da teca rapidamente se alargam e são preenchidas por inclusões lipídicas, processo a que se dá o nome de luteinização, formando o corpo lúteo. A presença do corpo lúteo vai, portanto, levar à segregação, a partir das células da granulosa, de altos níveis de progesterona e níveis moderados de estrogénio que, em conjunto, exercem um mecanismo de *feedback* negativo sobre os níveis de FSH e LH, impedindo que estes aumentem e se dê o desenvolvimento folicular [4, 5]. As células do corpo lúteo libertam inibina, que irá também contribuir para este *feedback* negativo exercido sobre a FSH e LH.

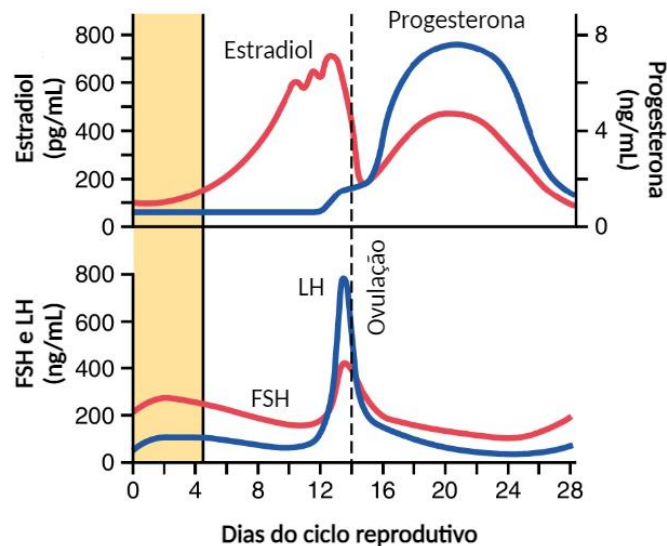


Figura 4. Representação gráfica da variação das concentrações da FSH, LH, estradiol e progesterona durante o ciclo menstrual. Adaptado de [1].

No caso de não haver fecundação, e, portanto, de não se dar a produção da gonadotrofina coriônica humana (hCG – *human chorionic gonadotropin*)¹ [8, 10], o corpo lúteo degenera-se, torna-se *corpus albicans* e deixa de haver produção de progesterona e estrogénio, resultando na degeneração do epitélio endometrial, iniciando-se, portanto, a menstruação [4, 5]. A diminuição dos níveis das hormonas libertadas pelo corpo lúteo permite também que a influência supressora sob a secreção da GnRH seja removida, observando-se um aumento dos níveis da FSH e também de LH, ainda que em menor número, na transição lúteo-folicular [8]. No caso de haver fecundação, a hCG mantém o corpo lúteo durante o primeiro trimestre da gravidez, e consequentemente, os valores de progesterona e estrogénio. Após esse tempo, a placenta é capaz de libertar uma quantidade suficiente de hormonas para manter a gravidez, dando lugar à involução do corpo lúteo a partir da 13ª ou 17ª semana de gestação [1].

1.2.3.2. Ciclo uterino

O ciclo uterino representa todas e quaisquer alterações do útero (Figura 5) em função das alterações hormonais inerentes ao sistema reprodutivo. Este ciclo é dividido em fase menstrual, que dura normalmente entre 1 e 6 dias, fase proliferativa, que se mantém até ao 14º dia, e fase secretora, que se dá após a ovulação e se mantém até ao início de um novo ciclo.

Começando pela fase menstrual, esta caracteriza-se pela degeneração do estrato funcional do endométrio, provocado pelo decréscimo dos valores de progesterona e estrogénio decorrentes da degeneração do corpo lúteo. O decréscimo destes valores e a consequente ausência do *feedback* negativo exercido sobre a GnRH permite que haja um aumento nos níveis de FSH, dando-se o início da fase folicular, e, consequentemente, o aumento dos níveis de estrogénio. Estes níveis irão induzir a proliferação do endométrio uterino, o alongamento das glândulas uterinas, a segregação de muco relativamente aquoso a partir das glândulas mucosas do cérvix, o aumento das células ciliadas nas trompas uterinas e também da atividade muscular do miométrio, tudo alterações que serão essenciais para facilitar a passagem dos espermatozoides no

¹ Gonadotrofina coriônica humana (hCG) é uma glicoproteína que tem a mesma estrutura molecular e função que a hormona luteinizante (LH) libertada pela hipófise. A sua função mais importante será impedir a involução do corpo lúteo, de forma que o mesmo continue a produzir quantidades cada vez maiores de progesterona e estrogénio, que permitirão que o endométrio continue a crescer e a armazenar grandes quantidades de nutrientes no decorrer da gravidez, ao invés de ser degenerado, tal como acontece durante a menstruação [1].

momento da ovulação, e para permitir também que esse mesmo ovócito que ovulou seja capaz de se deslocar até às trompas para que possa ser fecundado [4].

A fase secretora, após ovulação, é caracterizada pela presença combinada da progesterona e estrogénio, hormonas produzidas a partir do corpo lúteo, que irão manter o útero numa fase secretora, ou seja, o endométrio tornar-se-á altamente vascularizado, e irá libertar nutrientes que serão usados para nutrir um possível embrião. Também se diminuirão as contrações uterinas, de forma que não haja uma expulsão indesejada do mesmo [5]. O muco que é libertado a partir do cérvix tornar-se-á mais viscoso sob ação da progesterona, de modo a prevenir que haja entrada de bactérias no útero, a partir da vagina, funcionando assim como um bloqueio antibacteriano que irá proteger o embrião implantado [9].

O decréscimo dos valores de progesterona e estrogénio que decorrem a partir da degeneração do corpo lúteo levam a que o endométrio atravesse uma série de transformações que incluem uma diminuição substancial da espessura do mesmo. A queda dos níveis hormonais estimula ainda a secreção de prostaglandinas uterinas que levam à vasoconstrição dos vasos sanguíneos do endométrio, e, conseqüentemente, a uma redução nos níveis de oxigénio no sangue, levando à degeneração do endométrio, incluindo dos seus vasos sanguíneos. O sangramento resultante permite expulsar fragmentos de tecido endometrial. Todas estas alterações, em conjunto com outros eventos de apoptose celular, compõem a fase menstrual que inicia um novo ciclo menstrual [8, 9].

No caso de haver fecundação do ovócito, todas estas alterações que acompanham a fase menstrual são evitadas através da secreção da hCG a partir dos tecidos embrionários recentemente formados [1].

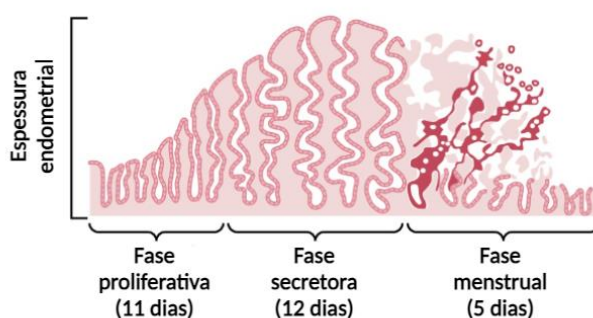


Figura 5. Ilustração representativa das variações da espessura do endométrio durante o ciclo uterino. Adaptado de [1].

1.3. Sistema reprodutor masculino

As funções do aparelho reprodutor masculino incluem a formação de espermatozoides (espermatogénese) e a regulação das funções reprodutivas através das diferentes hormonas [1].

Anatomicamente, o sistema masculino (Figura 6) é composto por dois testículos envolvidos num saco escrotal e suspensos fora da cavidade abdominal, responsáveis pela gametogénese e secreção da testosterona, um sistema de ductos que armazenam e transportam os espermatozoides até ao exterior, glândulas anexas que produzem e libertam secreções, e o pénis, um órgão copulador que tem como principal função depositar o ejaculado no fundo da vagina [7].

O grupo das glândulas anexas inclui a próstata, vesículas seminais e glândulas bulbouretrais [9]. A próstata (1) e as vesículas seminais (2) produzem grande parte do fluido que compõe o ejaculado, contribuindo, respetivamente, (1) com enzimas essenciais para a coagulação e fibrinolisa, que atua sobre a liquefação do esperma, assim como compostos que neutralizam as secreções acídicas da vagina, e (2) substâncias químicas, nomeadamente, frutose, prostaglandinas e fibrinogénio. As glândulas bulbouretrais contribuem com secreções mucosas lubrificantes [9].

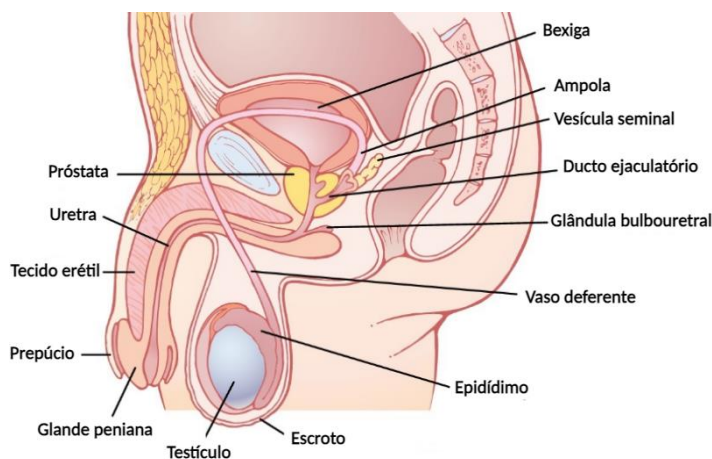


Figura 6. Representação ilustrativa do aparelho reprodutor masculino. Adaptado de [1].

Os testículos (Figura 7) têm a dupla função de produzir os gâmetas masculinos e libertar testosterona, uma hormona esteroide que deriva de uma molécula precursora do colesterol, tal como o estrogénio e a progesterona [7]. A produção dos gâmetas masculinos dá-se, mais especificamente, nos túbulos seminíferos, que se trata de uma rede de túbulos enovelados rodeados por tecido intersticial, onde permanecem as

células intersticiais [4]. Cada um dos túbulos seminíferos é composto, portanto, por espermatozoides que se situam no seu lúmen, e células germinativas ainda em desenvolvimento, para além das células de *Sertoli*, cuja função será estimular a produção dos espermatozoides. Os espaços intersticiais entre os túbulos dão lugar às células de *Leydig*, ou células intersticiais, responsáveis pela secreção de testosterona [9].

Os túbulos seminíferos são organizados em diferentes lóbulos testiculares, separados por septos de colagénio, que se originam a partir da túnica albugínea, que envolve todo o lóbulo testicular, sendo esta última envolvida por uma dupla camada denominada de túnica vaginal. Os túbulos seminíferos convergem numa rede testicular de onde partem pequenos ductos eferentes que transportam espermatozoides recentemente formados até ao epidídimo, transporte impulsionado pela secreção contínua de fluido tubular pelas células de *Sertoli* [7]. No epidídimo, os espermatozoides sofrem uma maturação final, adquirindo capacidades de movimento e fertilização [6]. A partir do epidídimo, os espermatozoides são transportados pelo vaso deferente e aí, recebem secreções da glândula prostática, e ainda das duas vesículas seminais presentes em cada um dos lados da próstata, sendo todo o conteúdo libertado no ducto ejaculatório, que segue até à uretra. Esta última beneficia do muco que provém das glândulas bulbouretrais, facilitando a passagem do esperma através da mesma [1].

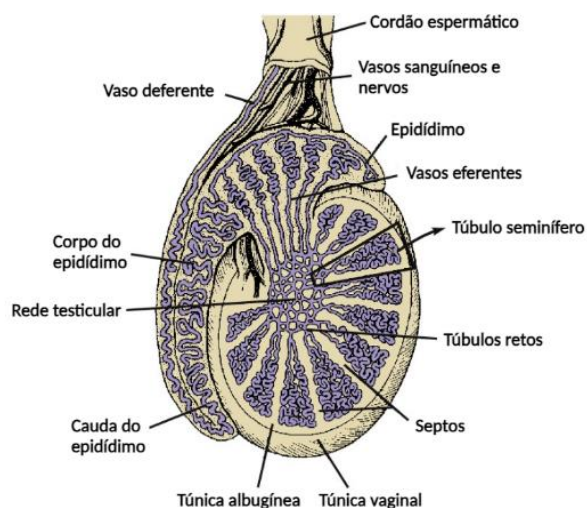


Figura 7. Representação ilustrativa do testículo e epidídimo, com respetiva legenda dos seus constituintes. Adaptado de [5].

O ejaculado final é composto, portanto, pelos espermatozoides e células germinativas que provêm dos testículos, pelo fluido das vesículas seminais e da

glândula prostática, e também por fluido mucoso proveniente das glândulas bulbouretrais. A coagulação e subsequente liquefação é realizada, respetivamente, por uma enzima coaguladora libertada pela próstata que permite ao fibrinogénio, proveniente das vesículas seminais, formar um coágulo de fibrina que previne que haja qualquer perda de espermatozoides no momento de deposição dos mesmos na parte superior da vagina. Posteriormente, este coágulo dissolve-se por ação de enzimas proteolíticas, nomeadamente o antigénio específico da próstata (PSA – *Prostate specific antigen*), libertado também a partir do fluido prostático [1]. As prostaglandinas libertadas pelas vesículas seminais desempenham um papel crucial em ambos os sistemas reprodutores feminino e masculino, ao estimular contrações do músculo liso que promovem o transporte dos espermatozoides [7].

Tal como mencionado anteriormente, as células de *Sertoli* têm um papel essencial na gametogénese masculina, promovendo essencialmente o desenvolvimento das células germinativas sob influência de sinais hormonais. As células de *Sertoli*, são, no entanto, também capazes de providenciar proteção e assegurar condições para o desenvolvimento e diferenciação destes gâmetas através da formação de uma barreira física formada pelas junções intercelulares entre estas células, que impede a passagem física de substâncias provenientes do sangue, tais como anticorpos e toxinas, para o interior dos túbulos. A esta barreira dá-se o nome de barreira hematotesticular [5]. Estando estas células dispostas em toda a extensão dos túbulos seminíferos, a formação desta barreira irá dividir cada um dos túbulos num compartimento basal, e num compartimento adluminal, próximo do centro do túbulo [11].

1.3.1. Espermatogénese e espermiogénese

A estrutura de um espermatozoide normal (Figura 8) consiste, de uma maneira simplista, numa cabeça e cauda. A cabeça compreende a informação genética do espermatozoide encapsulada no núcleo, revestida internamente por uma membrana citoplasmática, e externamente por uma vesícula formada a partir do complexo de *Golgi*, a que se dá o nome de acrossoma. Esta vesícula contém várias enzimas proteolíticas [1] que desempenham um papel essencial na fecundação do ovócito. A constituição da cauda consiste num flagelo composto por um esqueleto central com 11 microtúbulos, denominado de axonema, e ainda num conjunto de mitocôndrias que rodeiam o axonema numa zona proximal, formando a peça intermédia [1, 9].

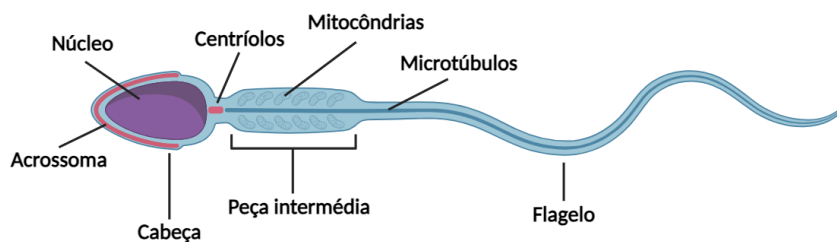


Figura 8. Representação ilustrativa de um espermatozoide e suas estruturas. Criado a partir do BioRender.

Para que sejam produzidos espermatozoides maduros, as células imaturas da linha germinativa têm de passar por um processo de espermatogénese e espermiognese.

Primeiramente, a espermatogénese (Figura 9) consiste na produção de células haploides a partir de uma célula diploide, as espermatognias, células germinativas primordiais. A proliferação mitótica destas células é o que d início ao processo da espermatogénese, sendo que, a partir de um ciclo de mitose, originam-se células filhas que continuam a sua proliferação, de modo a manter a linha celular germinativa, e outras que se dividem até produzirem espermátócitos primários. A segunda fase da espermatogénese inicia-se com uma primeira divisão metica, que permite que a partir de uma célula diploide, o espermtcito primário, surjam dois espermátócitos secundários. A segunda divisão metica dará origem a quatro células haploides, as espermátides, e estas sofrerão um processo de transformação, denominado de espermiognese, que consiste em etapas de diferenciação que lhes permitirão tornar-se em espermatozoides [1, 5]. Todo o processo se d desde a base do túbulo seminífero até ao lúmen do mesmo, sendo que no compartimento basal dos túmulos seminíferos d-se as divisoes mitóticas e diferenciação das espermatognias até espermátócitos, e estes movem-se então através da barreira hematotstica até ao compartimento central, onde se irão diferenciar em espermátides [9].

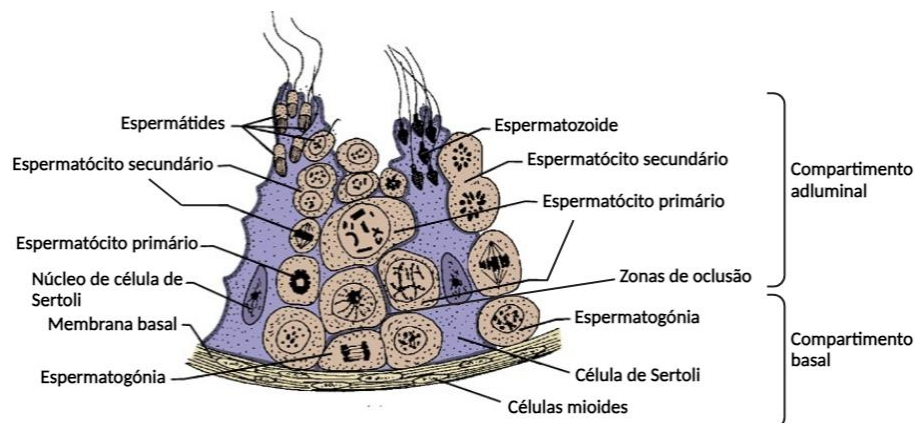


Figura 9. Representação ilustrativa de uma porção do túbulo seminífero onde se observa as várias fases da espermatogénese. Adaptado de [5].

A espermiogénese, ou seja, a diferenciação das espermátides, envolve a formação de um acrossoma na cabeça do espermatozoide, a redução progressiva do tamanho do núcleo e a sua condensação, o crescimento do flagelo e a disposição de mitocôndrias à volta do mesmo, e a extrusão de uma pequena parte do seu citoplasma pelas células de *Sertoli*, permitindo destruir células germinativas defeituosas que não finalizaram a espermiogénese [5, 7].

1.3.2. Controlo hormonal do sistema reprodutor masculino

As células de *Sertoli* e as células de *Leydig* estão em contacto direto com a FSH e LH para mediar os processos de espermatogénese e espermiogénese. A libertação de LH a partir de pulsos de ação da GnRH permite a estimulação das células de *Leydig* e a consequente segregação de testosterona, cuja concentração irá influenciar diretamente a espermatogénese. A testosterona, em conjunto com a FSH segregada também por pulsos de GnRH, irá atuar sobre as células de *Sertoli* nos túbulos seminíferos, que irão auxiliar a progressão meiótica das células germinativas e todo o processo subsequente de diferenciação até espermatozoide [5]. Portanto, para que se inicie a espermatogénese, é necessário que tanto a FSH como a testosterona estejam presentes [1].

Tal como referido anteriormente, os níveis de testosterona irão mediar a espermatogénese, portanto, quando estes níveis descem, os níveis de LH sobem em resposta e estimulam a libertação de mais testosterona por parte das células de *Leydig*. As células de *Sertoli* também participam neste mecanismo de regulação dos níveis de testosterona ao segregarem a proteína de ligação de androgénios (ABP - *Androgen Binding Protein*), que, ao ligar-se à testosterona, permite que a concentração da mesma

se mantenha elevada. Quando os níveis sobem, é exercido um mecanismo de *feedback* negativo sob a secreção de FSH e LH, e é libertada inibina a partir das células de *Sertoli*, que irá também ter um efeito inibitório sob a hipófise anterior, suprimindo a secreção de FSH, estabelecendo-se assim um sistema regulatório que permite manter uma produção constante e regulada de espermatozoides [5].

A testosterona, para além de ter efeitos ao nível da gametogénese e da secreção de gonadotrofinas, tem outras funções tais como a masculinização do trato reprodutivo e da genitália externa masculina antes do nascimento, assim como a estimulação da descida dos testículos para o saco escrotal. Na puberdade, e com o reinício da secreção da testosterona, que foi cessada após o nascimento, induzem-se alterações ao nível do tamanho dos caracteres sexuais primários, mas também ao nível dos caracteres sexuais secundários, nomeadamente, promoção do crescimento do pelo, engrossamento da voz, e aumento da massa muscular [7].

1.4. Desde o transporte dos gâmetas até à implantação

Para que haja fecundação, é imperativa a fusão dos núcleos dos gâmetas feminino e masculino, e como tal, é necessário que os mesmos se desloquem dentro do trato reprodutor feminino de modo a encontrarem-se.

Começando pelo transporte dos gâmetas masculinos, este inicia-se no próprio sistema reprodutor masculino, a partir dos túbulos seminíferos, e segue até ao epidídimo através da rede testicular [4]. A passagem pelo epidídimo permite que os espermatozoides sofram uma maturação bioquímica antes de os mesmos serem transportados através do vaso deferente e se misturarem com secreções da vesícula seminal, glândula prostática e glândulas bulbouretrais. Já no trato reprodutivo feminino, os espermatozoides são depositados na parte superior do canal vaginal, de onde seguirão em direção à ampola, uma porção das trompas onde o espermatozoide fará contacto com o ovócito. Durante todo este transporte, os espermatozoides sofrem processos de maturação que lhes permitirão mover-se com agilidade e adquirir a capacidade de fertilizar o ovócito [5].

Assim que os espermatozoides são depositados, dá-se a imediata coagulação do esperma, mediada pelo fibrinogénio presente no plasma seminal, impedindo que haja qualquer perda de espermatozoides na vagina. Para que os mesmos se possam direccionar ao cérvix, é preciso que posteriormente se dê a liquefação do esperma, através de uma enzima fibrinolítica, o PSA. A passagem dos espermatozoides através do canal cervical irá depender das contrações musculares da parede vaginal induzidas

pela libertação da hormona oxitocina que acompanha o orgasmo feminino, mas principalmente da composição física e viscosidade do muco que aí se encontra, que varia consideravelmente ao longo do ciclo menstrual.

Depois de atravessarem o canal cervical, os espermatozoides seguem até às trompas com o auxílio das contrações da musculatura uterina e dos batimentos ciliares que são progressivamente mais acentuados ao longo da fase proliferativa. À medida que os espermatozoides vão entrando no lúmen das trompas de Falópio, vão encontrando também um ambiente menos hostil e que lhes exige que viajem a uma velocidade mais lenta, em função do muco característico desta zona. Tal como foi referido anteriormente, o transporte dos espermatozoides através do trato reprodutivo feminino vai-lhes permitir adquirir a capacidade de fecundação, através do processo conhecido como capacitação. Este processo é caracterizado por três concretizações finais: a capacidade do espermatozoide se ligar à ZP, a capacidade de exercer a reação acrossómica, e a aquisição de hipermotilidade [8].

Ao entrar em contacto com os fluidos do sistema reprodutor feminino, os espermatozoides atravessam diversas mudanças que compõem o processo de capacitação, entre as quais a remoção de fatores descapacitantes que inibem a atividade espermática, tais como o colesterol, levando a uma destabilização do acrossoma, e o aumento da permeabilidade da membrana espermática a iões de cálcio, que irá permitir o consequente aumento do influxo de cálcio, levando à hiperativação da cauda, que consiste numa mudança da atividade do flagelo da cauda, dando-lhe movimentos mais propulsivos [1].

O ovócito, rodeado pela ZP e células do *cumulus*, é inicialmente libertado na cavidade peritoneal, e deverá ser transportado até uma das trompas de Falópio de modo a chegar ao útero [1]. Para isso, o ovócito é capturado pelas fímbrias que se estendem a partir do infundíbulo das trompas no momento da ovulação. O aumento do batimento das células ciliadas, assim como a atividade muscular das trompas em função das alterações hormonais pré-ovulatórias, permite que se efetue a captura do ovócito [4] e o transporte do mesmo em direção ao útero.

Uma possível fecundação é iniciada a partir do momento em que ovócito e espermatozoide se encontram na junção entre a ampola e istmo das trompas [5]. É importante referir que as células do complexo *cumulus oophorus* (CCO) atravessam um período de expansão pré-ovulatório que lhes permite aumentar a possibilidade de se encontrar com um dos muitos espermatozoides numa das trompas, no momento da

fecundação [8]. O espermatozoide começa por penetrar as células do CCO que rodeiam o ovócito, através da digestão das mesmas pela ação da enzima hialuronidase presente na cabeça do espermatozoide, chegando, por fim, à ZP [5]. Aqui o espermatozoide adere-se, através de zonas de ligação na sua membrana plasmática, a uma das glicoproteínas presentes na ZP. A ZP é composta por glicoproteínas libertadas pelo ovócito, conhecidas como ZP1, ZP2, ZP3 e ZP4, sendo a proteína ZP3 a mais abundante [8]. Esta ligação induz a reação acrossómica, que depende de um aumento de influxo de cálcio a partir da membrana celular do espermatozoide, levando a que haja uma fusão entre a membrana do acrossoma e a membrana plasmática adjacente do espermatozoide, resultando na libertação de enzimas a partir da rutura de vesículas acrossómicas. Estas enzimas hidrolíticas, como por exemplo a acrosina, irão degradar parte da ZP, que fará com que o espermatozoide consiga penetrar no espaço perivitelino. Depois de o espermatozoide ter penetrado com sucesso, há necessidade de prevenir a polispermia, ou seja, a possibilidade de outro espermatozoide penetrar também o ovócito. Para que isto seja evitado, dá-se a reação cortical, que consiste na fusão das membranas dos grânulos corticais do ovócito com a membrana celular adjacente, em resposta a um aumento dos níveis de Ca^{2+} disponíveis no citoplasma do ovócito [5]. Estes grânulos corticais libertam o seu conteúdo e inativam os locais de ligação dos espermatozoides na ZP, para além de levarem a um endurecimento da mesma [1]. Esta reação cortical irá fazer parte de uma série de processos que compõem a ativação do ovócito, tais como a finalização da meiose, o aumento da atividade metabólica, a síntese de proteínas, entre outros. A finalização da meiose irá levar à extrusão do segundo GP, permitindo que se forme o pronúcleo (PN) feminino, e posteriormente, e em função da descondensação do DNA nuclear, do PN masculino, cuja fusão se dá pelo nome de singamia, criando finalmente um zigoto diploide [5].

Com o processo de formação do zigoto inicial finalizado, é importante que o mesmo seja transportado desde a sua posição atual, as trompas, até ao útero, onde terá oportunidade de se implantar na parede uterina [4].

O transporte do ovócito fecundado até ao útero dura entre 3 e 5 dias, durante os quais irão ocorrer sucessivas divisões mitóticas que permitem que o ovócito se desenvolva até à fase de blastocisto, onde poderá implantar-se eficazmente no útero [1]. Durante os três primeiros dias de desenvolvimento, o embrião entra em fase de clivagem, formando vários blastómeros, até que os mesmos começam a entrar em processo de compactação celular, ao 4º dia, formando uma estrutura a que se dá o nome de mórula [5]. A formação de um blastocisto ao 5º dia de desenvolvimento envolve

um processo de cavitação, formando-se uma camada exterior de células denominada trofoectoderme (TE), e a massa celular interna (MCI) junto a um dos polos do embrião, que irão dar origem, respetivamente, a estruturas extraembrionárias e ao embrião em si.

As contrações uterinas e batimentos ciliares característicos desta fase do ciclo menstrual irão auxiliar o transporte do embrião ao 4º dia de desenvolvimento em direção ao útero. A entrada do embrião no útero só ocorre quando há uma subida da progesterona em função do desenvolvimento do corpo lúteo. No útero, irá subsistir durante alguns dias, sendo nutrido pelas glândulas uterinas, até que uma enzima libertada pelo útero, a protease, começa a dissolver a ZP, levando à libertação do embrião e iniciando o processo de implantação, que começa pela aposição do blastocisto no epitélio uterino e a posterior adesão do mesmo através da produção de moléculas de adesão [8]. Posteriormente, dá-se a invasão do endométrio, que envolve a degeneração das células do endométrio através da libertação de enzimas proteolíticas a partir da TE. Em resposta a esta invasão, dá-se o processo de decidualização que consiste no crescimento de uma matriz celular massiva a partir das células do endométrio, denominada decídua, que engloba todo o embrião implantado [1, 4].

Assim que se dá a implantação, as células da TE e outras restantes proliferam-se rapidamente, formando a placenta e outras membranas características da gravidez. A placenta consiste numa combinação de tecidos maternos e fetais que servirá como o principal órgão de contacto e de troca de substâncias entre mãe e feto durante o resto da gravidez [1].

A progesterona e o estrogénio libertados pela placenta serão importantes para a progressão da gravidez: a progesterona irá permitir que as células decíduas se desenvolvam, que as contrações uterinas diminuam de modo a que não haja risco de abortamento espontâneo, e que as secreções tubais aumentem para que o embrião seja apropriadamente nutrido, enquanto que o estrogénio será importante para a preparação física da gestante, de modo a que seja mais fácil, no momento do parto, a passagem do feto e também para que se dê a preparação da lactação [1].

2. Infertilidade

A infertilidade é definida, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), como uma doença que se caracteriza pela incapacidade de atingir uma gravidez clínica após 12 meses de relações sexuais desprotegidas e regulares [12]. Mais recentemente, esta definição foi atualizada de modo a incluir qualquer indivíduo cuja capacidade de conceber fosse restringida, quer seja individualmente ou em conjunto com o seu parceiro ou parceira, e como tal, necessitasse de intervenção, nomeadamente, a doação de embriões ou gâmetas [13, 14]. A esterilidade, contrariamente à infertilidade, dá-se como um estado permanente, e não apenas como um período restrito de infertilidade [15].

Ainda dentro do conceito da infertilidade, esta pode ser classificada como primária ou secundária, sendo que a infertilidade primária ocorre em casais que nunca atingiram uma gravidez clínica, e a secundária refere-se àqueles casais que não conseguem conceber naturalmente ou levar uma gravidez a termo, depois de já o terem feito no passado [16].

2.1. Prevalência da infertilidade

De acordo com um novo relatório publicado pela OMS, feito a partir da análise de vários estudos entre 1990 e 2021, estima-se que, globalmente, a prevalência de infertilidade ao longo da vida seja de 17,5%, e a periódica seja de 12,6% [17]. Nesse mesmo relatório, reportam-se taxas de 9,6% e 6,5% para a infertilidade primária e secundária, respetivamente. Foi também reportada uma variação regional dos valores de prevalência de infertilidade, ainda que não seja totalmente conclusiva por falhas no registo dos dados – a região do Pacífico Ocidental reporta as taxas mais altas de prevalência da infertilidade ao longo da vida (23,2%), seguida da região das Américas (20,0%) e da Europa (16,5%). Relativamente às taxas de infertilidade periódica, a região que engloba os países africanos reporta os maiores valores (16,4%), seguida da região do Pacífico Ocidental (13,0%) e Europa (12,4%), com a região do Mediterrâneo Oriental a ter os valores mais baixos (10,7%) [17]. Um estudo feito em 2004 que permitia caracterizar a infertilidade em Portugal concluiu que a prevalência da infertilidade ao longo da vida situa-se entre os 9 e os 10%, verificando-se que existe um maior número de casais inférteis nas regiões do Norte e Lisboa e Vale do Tejo, devido ao facto de serem aquelas que possuem maior densidade populacional [18].

Ao comparar as taxas de prevalência entre países de diferentes rendimentos, verificou-se que estas eram bastante semelhantes entre si, com a infertilidade ao longo

da vida a atingir percentagens de 17,8% para países de altos rendimentos e 16,5% para países de baixos e médios rendimentos [17]. Esta aproximação de valores de prevalência de infertilidade entre países desenvolvidos e subdesenvolvidos foi também já reportada noutro estudo [19], podendo este fenómeno ser justificado pelos diferentes motivos que estão por detrás da prevalência de infertilidade em ambas as regiões. Isto é, nos países em desenvolvimento, maior parte dos casos de infertilidade devem-se a infeções por infeções sexualmente transmissíveis (ISTs) [20], o que não é o caso nos países desenvolvidos, onde as taxas de infertilidade se devem geralmente ao aumento da infertilidade relacionada com a idade. Em função da diminuição drástica de casos de ISTs nos últimos anos em países subdesenvolvidos, e de um aumento da tendência de adiamento da maternidade em países desenvolvidos, verifica-se então esta aproximação de prevalências [21, 22].

Em virtude do aumento das taxas de infertilidade, a procura por tratamentos tem vindo a aumentar, e como tal, acresce a necessidade de os países implementarem serviços que sejam capazes de oferecer soluções aos seus pacientes. Alguns exemplos de países cujas taxas de utilização de tratamentos de fertilidade se revelaram as mais altas são Israel, Grécia, Bélgica, Austrália e Líbano, contrariamente a países como a Indonésia, Nicarágua, Mali e a região da África subsariana [23]. Isto deve-se principalmente à disponibilidade limitada de serviços de PMA em países subdesenvolvidos, justificada nomeadamente pelos altos custos que os mesmos envolvem [24], mas também pelo facto de haver um maior interesse no investimento em políticas de contraceção e programas de planeamento familiar [24, 25].

Alguns dos fatores limitantes que mais se evidenciam por serem tão díspares em relação a países mais desenvolvidos são o estado civil e a orientação sexual, ao contrário da restrição do recurso a tratamento conforme a idade da mulher, que parece ser uma das regulamentações mais adotadas globalmente [24]. O tema de religião tem sido também bastante influente na determinação do acesso a tratamentos de PMA em alguns países, com algumas religiões tais como o judaísmo, o hinduísmo e o budismo a serem mais complacentes com alguns procedimentos e, o catolicismo romano, pelo contrário, a rejeitar maior parte deles [26]. Apesar de muitas das restrições que foram impostas pela Igreja Católica em certos países, nomeadamente Itália [26, 27], terem sido desmanteladas, algumas minorias tais como casais do mesmo sexo e mulheres solteiras continuam a ser impedidas de aceder a tais tratamentos [28]. As limitações impostas em certas regiões levam a que muitos casais optem por escolher serem tratados em países que não o seu [15], de modo a receberem um tratamento de melhor

qualidade e mais centrado nas suas preferências e também evitar listas de espera, questões legais respetivas ao seu país de origem e custos financeiros que não sejam proporcionais aos rendimentos do casal [29 - 33].

Perante a persistência que se observa relativamente às desigualdades no acesso a tratamentos de PMA, nomeadamente em países menos desenvolvidos, é imperativo que sejam reunidos esforços para que se criem programas que abordem o tema da infertilidade nestas populações, apelem à divulgação da informação e à diminuição do estigma que envolve o tema e, por conseguinte, permitir que haja menos restrições ao diagnóstico e tratamento da infertilidade [24].

2.2. Causas de infertilidade

A possibilidade de se atingir uma gravidez e de a manter depende de uma série de mecanismos fisiológicos que irão influenciar a produção de gâmetas ou a função e qualidade reprodutiva dos órgãos [24]. As causas de infertilidade poderão ser de origem feminina ou masculina, com taxas de incidência igualmente distribuídas na população geral [34], rondando os 40% e 30%, respetivamente [35].

A fertilidade é influenciada por fatores não patológicos tais como a frequência de relações sexuais e a idade feminina ou por fatores patológicos que afetam a fertilidade feminina ou masculina, ainda que alguns deles não exclusivamente. As causas mais frequentes de infertilidade são a disfunção ovulatória, infertilidade de fator masculino e doença tubária [36]. A infertilidade poderá ainda ser influenciada e agravada por alterações genéticas, que se estimam já ser responsáveis por 50% dos casos de infertilidade observados [37].

A fertilidade poderá ser também afetada pela adoção de alguns hábitos de estilo de vida considerados prejudiciais tais como o consumo de álcool, de tabaco ou substâncias estupefacientes, ou ainda por restrições alimentares, frequência de atividade física, stress ou obesidade. O consumo de tabaco, por estar associado diretamente a um aumento de metais pesados e outros compostos químicos nocivos no organismo, irá influenciar negativamente qualquer processo inerente à função reprodutiva feminina ou masculina [12]. Assim como o tabaco, também o consumo de álcool frequente, por ser um conhecido agente teratogénico, vai influenciar o processo reprodutivo [38]. As restrições alimentares, que levam consequentemente a uma restrição calórica, aliado à prática de exercício físico intenso, poderá resultar na ausência de ovulação e a um desenvolvimento deficitário do endométrio. No aparelho reprodutor masculino, o exercício físico intenso poderá estar relacionado com uma

diminuição da concentração de espermatozoides, assim como a percentagem de motilidade progressiva e de morfologia considerada normal [39]. A obesidade, situando-se num espectro completamente contrário, irá também ter um efeito prejudicial na fertilidade feminina, contribuindo para possíveis anovulações ou decréscimo de qualidade ovocitária [12]. Nos homens, a obesidade irá comprometer as funções endócrinas e sexuais [40]. O stress parece estar também relacionado com uma diminuição das probabilidades de conceção natural, ainda que não seja totalmente confirmado ou justificado por estudos.

2.2.1. Fatores não patológicos

A idade feminina e a frequência das relações sexuais são dois fatores que, não sendo patológicos, têm um grande impacto sobre a fertilidade. A influência que a idade feminina tem na fertilidade reside no facto da capacidade reprodutiva feminina diminuir à medida que a idade avança, sendo que este declínio se torna mais pronunciado a partir dos 30 anos de idade [12], fruto da diminuição da quantidade e qualidade ovocitária [41].

O facto de os ovócitos terem uma idade mais avançada fará com que as suas divisões meióticas sejam comprometidas, podendo levar a que o PN feminino tenha um número anormal de cromossomas [42]. O adiamento da maternidade que se tem observado nos últimos anos é em parte responsável pelo aumento de casos de infertilidade, sendo que em maior parte dos países europeus, a idade da primeira gravidez chega a aproximar-se dos 30 anos [43] em virtude da priorização da carreira e de uma vida economicamente estável.

Outro fator a ser controlado para facilitar uma conceção natural é a frequência das relações sexuais, que deverá ser regular e temporizada conforme o ciclo menstrual feminino. Considerando, portanto, que os espermatozoides são capazes de sobreviver até 5 dias no aparelho reprodutor feminino, e os ovócitos apenas 24 horas após o momento da ovulação, as relações sexuais deverão manter-se regulares durante um período de 6 dias, para uma maior probabilidade de conceção [7, 44, 45].

2.2.2. Fatores patológicos femininos

De acordo com a OMS, os fatores femininos com maior incidência são as disfunções ovulatórias (25%), endometriose (15%), adesões pélvicas (12%), obstruções tubais (11%), anormalidades uterinas e tubais (11%), e hiperprolactinemia (7%) [35].

As disfunções ovulatórias devem-se a uma perturbação do funcionamento do eixo hipotálamo/hipófise/ovário [24], e, portanto, do processo ovulatório que ocorre em cada ciclo menstrual [46]. A OMS propõe uma divisão em três grupos com base em fatores endócrinos. O primeiro e o segundo grupo incluem, respetivamente, disfunções ovulatórias que surgem a partir de falha do hipotálamo e hipófise, e distúrbios do eixo reprodutivo hipotálamo/hipófise/ovário. O terceiro grupo corresponde às disfunções ovulatórias equivalentes a insuficiência ovárica primária [47].

A disfunção hipotalâmica/hipofisária caracteriza-se por um decréscimo na disponibilização das gonadotrofinas FSH e LH a partir da estimulação da GnRH no hipotálamo, levando a cenários de desenvolvimento folicular anormal, anovulação e baixos níveis de estrogénio, característicos de condições como a amenorreia hipotalâmica e hipogonadismo hipogonadotrófico [46, 48]. Este tipo de disfunção ovulatória está geralmente associado a quadros de baixo índice de massa corporal (IMC), provocado por restrições alimentares e exercício físico intenso [49], e como tal, o seu tratamento centra-se na suplementação hormonal, ganho de peso e normalização da atividade física [47].

O segundo grupo de disfunções ovulatórias é aquele com maior representatividade, tendo taxas de incidência a rondar os 85%. A síndrome dos ovários poliquísticos (SOP), hiperprolactinemia e endometriose são algumas das condições com maior incidência dentro deste grupo, caracterizando-se por desequilíbrios gonadotróficos e níveis normais de estrogénios [47]. A SOP é a doença endócrina de maior prevalência entre a população feminina, com taxas de incidência entre os 5 e 10% [50]. Esta é causada por altos níveis de testosterona e LH, e baixos níveis de FSH, que consequentemente prejudicam a formação dos ovócitos nos folículos, levando à formação de quistos ováricos. Segundo os critérios de Roterdão, a SOP poderá ser diagnóstica pela presença de dois de três critérios: oligo/anovulação, hiperandrogenismo e ovários poliquísticos [51].

A hiperprolactinemia manifesta-se como uma elevada concentração da hormona prolactina na circulação sanguínea [52, 53], sendo um dos distúrbios mais prevalentes associado ao eixo reprodutivo hipotalâmico-hipofisário, e poderá incidir sobre homens e mulheres, ainda que esteja mais presente nas últimas [47, 54], exibindo taxas de incidência entre os 9 e os 17% [55]. O aumento dos níveis desta hormona no sistema reprodutor feminino, que usualmente ocorre apenas para iniciar e manter a lactação [56], irá comprometer a secreção de gonadotrofinas e, consequentemente diminuir a

concentração de LH [46], levando a distúrbios ovulatórios, tais como anovulação ou amenorreia [35, 52].

A endometriose refere-se à implantação de tecido endometrial fora da cavidade uterina, afetando cerca de 10 a 15% de mulheres em idade reprodutiva [57]. Dependendo da gravidade da inflamação, esta poderá comprometer as funções tubais e ováricas, e consequentemente, o desenvolvimento folicular, fecundação e implantação [58]. Em casos mais graves, a formação de adesões pélvicas decorrentes da deposição de endometriomas poderá distorcer a anatomia pélvica, prejudicando o transporte ovocitário, embrionário e dos espermatozoides através dos ovidutos [59].

A insuficiência ovárica primária, que corresponde ao terceiro grupo de disfunções ovulatórias, define-se como uma condição de hipogonadismo hipergonadotrófico, que se caracteriza pela cessação de ciclos menstruais em mulheres abaixo dos 40 anos [42, 60, 61]. Em termos hormonais, a FSH apresenta valores anormalmente altos, afetando o desenvolvimento folicular e, consequentemente a presença de ovócitos, afetando também a concentração sérica de estrogénio [47].

A diminuição da reserva ovárica, na generalidade dos casos, é influenciada por fatores desconhecidos [47], mas poderá também ser devido a um historial de cirurgia ovárica, quimioterapia, radioterapia, menopausa prematura, síndrome de *Turner* ou síndrome do X-Frágil [46]. A síndrome de *Turner* trata-se de uma anomalia cromossomática, na qual um dos cromossomas X sofreu uma deleção parcial ou completa, manifestando-se sob a forma de uma monossomia do cromossoma X (45X), ou sob um padrão de mosaicismo do cromossoma. Estas anomalias cromossomáticas surgem, usualmente, a partir de erros na divisão meiótica, resultando em células germinativas com um número anormal de cromossomas [62]. Algumas alterações monogénicas são capazes de afetar também a capacidade reprodutiva feminina, podendo levar a cenários de falência ovárica prematura, como é o caso da mutação do gene FMR1, também conhecida como a síndrome do X frágil [42].

Os fatores uterinos ou tubais estão diretamente ligados ao comprometimento das funções uterinas e das trompas de Falópio, podendo ter taxas de incidência entre os 11% e os 67% [35, 63]. Geralmente, estes fatores referem-se a qualquer alteração anatómica ou funcional que comprometa o desenvolvimento embrionário inicial ou o seu transporte em direção à cavidade uterina, e consequente implantação [42]. Estes fatores incluem a presença de adesões uterinas ou tubais, pólipos endometriais, fibromas

uterinos, hidrossalpinges², ou ainda alterações congénitas como é o caso da presença de um útero septado [12, 46, 64]. As adesões pélvicas ou tubais têm como principal fator causal a doença inflamatória pélvica, que, na maior parte dos casos, se manifesta pela infeção pelo microrganismo *Chlamydia trachomatis* [46]. A presença de episódios recorrentes da infeção por clamídia tem um efeito cumulativo sob o comprometimento do potencial reprodutivo feminino [65].

O fator cervical consiste em qualquer perturbação que interfira com a progressão natural dos espermatozoides no trato reprodutor feminino. Estes fatores poderão ser anormalidades anatómicas, cicatrizes pós-cirúrgicas ou diminuição do muco cervical. O uso de teste pós-coital, que serve para avaliar a viabilidade da interação entre os espermatozoides e muco cervical, foi descontinuado, uma vez que não tem qualquer valor preditivo na taxa de gravidez [36, 66].

2.2.3. Fatores patológicos masculinos

As principais causas de infertilidade masculina são geralmente categorizadas dependendo se as mesmas atuam ao nível da função pré-testicular, testicular ou pós-testicular. Uma disfunção ao nível pré-testicular poderá afetar os mecanismos de controlo hormonal e neural que antecipam qualquer função testicular. Esta última, poderá ser comprometida por disfunções que atuam diretamente ao nível dos testículos e que, portanto, interferem com o processo da espermatogénese. As disfunções pós-testiculares correspondem a qualquer perturbação dos ductos de transporte espermático, e a consequente deposição do esperma [67].

O hipogonadismo hipogonadotrófico [68], ou hipogonadismo secundário, trata-se de uma condição que surge a partir de uma disfunção do sistema hipotálamo/hipófise [69], e que, portanto, irá afetar a função pré-testicular, inibindo a secreção de testosterona [67]. Este tipo de hipogonadismo caracteriza-se por baixos níveis de testosterona, uma redução da espermatogénese e diminuição da concentração das gonadotrofinas. Pelo facto de o hipogonadismo secundário surgir a partir de disfunções ao nível do complexo hipotalâmico/hipofisário, o mesmo poderá ser revertido através de terapias que reponham os níveis de gonadotrofinas [69]. O hipogonadismo secundário poderá ter causas congénitas, nomeadamente a síndrome de *Kallman*, uma condição genética que combina os sintomas do hipogonadismo com uma ausência completa do sentido olfativo (anosmia) [70], ou adquiridas, entre as quais a hiperprolactinemia [71]

² A hidrossalpinge trata-se de um tipo de anomalia tubar que se caracteriza por uma alteração estrutural das trompas, provocada por episódios de inflamação aguda ou crónica, levando à obstrução das trompas e à acumulação de fluido tubar. A presença deste tipo de anomalias poderá comprometer severamente o potencial reprodutivo, devido ao facto de as mesmas interferirem com a recetividade do endométrio [46].

ou dano hipofisário resultante de tumores ou medicações (glucocorticoides, opioides) [69].

O hipogonadismo primário, ou hipogonadismo hipergonadotrófico, resulta, por outro lado, de disfunções ao nível testicular, exibindo baixas concentrações de testosterona e altos níveis de gonadotrofinas, comprometendo severamente a espermatogénese. No hipogonadismo primário, e ao contrário do secundário, é impossível repor os níveis de fertilidade através de terapia hormonal. O comprometimento da espermatogénese irá refletir-se em aspetos como o número, motilidade e morfologia dos espermatozoides [72]. Estas disfunções testiculares classificam-se como congénitas ou adquiridas, tendo diferentes etiologias [72]. Uma disfunção testicular congénita pode apresentar-se sob a forma de disgenesias testiculares, nomeadamente anorquia e criptorquidia bilateral ou unilateral, que correspondem, respetivamente, à ausência de ambos os testículos, e à falha de descida de um ou ambos os testículos para o escroto [67]. A criptorquidia, representando um potencial risco para a degeneração das células germinativas logo no primeiro ano de vida, deverá ser corrigida o mais rapidamente possível de maneira a conservar a espermatogénese, especialmente em casos de criptorquidia bilateral [72]. As disfunções testiculares podem ser adquiridas, principalmente, a partir de traumas ou torsões testiculares, varicocele, orquiectomia, tumores testiculares ou cirurgias que comprometam a vascularização testicular e originem atrofia testicular [12]. A varicocele consiste num inchaço proveniente da dilatação das veias que drenam o sangue dos testículos, estando presente em 25% dos homens que apresentam valores anormais de parâmetros espermáticos [73]. Esta condição irá comprometer a regulação da temperatura escrotal, levando a uma degradação progressiva da função testicular, e consequentemente, à deterioração da qualidade espermática. As inflamações testiculares, ou orquite, são provocadas geralmente por ação de agentes bacterianos tais como *C. trachomatis* e *Neisseria gonorrhoea* [74], poderão, assim como qualquer disfunção testicular adquirida, afetar a função testicular [75]. No caso de se tratar de uma orquite bacteriana, a mesma poderá ser precedida de prostatite e coincidir com epididimite [76]. Os processos inflamatórios, para além de deteriorarem a espermatogénese, estão associados a um aumento dos níveis da fragmentação do DNA dos espermatozoides, resultante de um aumento da presença de espécies reativas de oxigénio (EROs), associado a uma maior produção de leucócitos como parte da resposta inflamatória [77].

As alterações genéticas ou cromossomáticas poderão estar também na génese de um quadro de hipogonadismo hipergonadotrófico, comprometendo igualmente o processo da espermatogénese [12]. As alterações cromossomáticas poderão ser estruturais ou numéricas, sendo a síndrome de *Klinefelter* a anomalia cromossomática mais reportada em casos de infertilidade masculina [78], consistindo na presença de dois ou mais cromossomas X e um Y. Fenotipicamente, esta síndrome caracteriza-se pela deterioração de caracteres sexuais secundários, pela presença de atrofia testicular bilateral, podendo manifestar-se também casos de ginecomastia [67]. As microdeleções ao nível do cromossoma Y posicionam-se em segundo lugar como a causa genética mais prevalente de infertilidade masculina [69]. Estas microdeleções tornam-se especialmente influentes se as mesmas forem aplicadas ao fator de azoospermia (AZF - *azoospermia factor*), que contém inúmeros genes ligados à espermatogénese [79]. A remoção parcial ou completa de uma ou mais regiões do locus AZF (AZFa, AZFb, AZFc) representa uma das causas moleculares mais frequentes de casos severos de azoospermia e oligozoospermia [80]. A deleção completa da região AZFa leva à síndrome de Só Células de *Sertoli*, que se caracteriza pela aplasia das células germinativas, enquanto uma deleção da região AZFb induz uma paragem na maturação espermática. As deleções da zona AZFc são as mais frequentes, e apresentam-se fenotipicamente sob a forma de oligozoospermias severas ou azoospermias [68].

A função testicular poderá ser também comprometida pela exposição a altas temperaturas, nomeadamente em trabalhos que o exijam, ou pela frequência de banhos turcos ou saunas. A exposição a agentes quimioterápicos ou a certos níveis de radiação, incluindo radiação eletromagnética de alta frequência e radiação ionizante, está também associada a eventuais casos de infertilidade [81, 82]. No caso da quimioterapia, os seus efeitos tóxicos sobre as gónadas relacionam-se diretamente com a sua dose cumulativa, que poderá, ou não, permitir que as células germinativas mantenham a sua viabilidade e, portanto, resumam a espermatogénese após a cessação do tratamento [69].

A exposição prolongada a certos poluentes químicos, denominados disruptores endócrinos, tem também um efeito notável no declínio da qualidade espermática, e consequentemente, sobre as funções reprodutivas masculinas [83, 84]. Estes disruptores endócrinos definem-se como qualquer químico que interfira negativamente com qualquer aspeto hormonal. Os mais comuns são os bisfenóis, ftalatos, atrazina, entre outros. Para além de interferirem com o aparelho reprodutor masculino, estes

disruptores irão também comprometer processos do aparelho reprodutor feminino, tais como o desenvolvimento folicular, ovulação, meiose e implantação embrionária [12].

Tal como as disfunções testiculares, também as pós-testiculares, que se traduzem, na maior parte dos casos, numa obstrução no transporte espermática ou numa disfunção ejacutória, poderão ser adquiridas ou congénitas [85]. O exemplo mais influente de obstrução congénita dos ductos de transporte espermático trata-se da ausência bilateral congénita do vaso deferente, que está intimamente relacionada com a presença de mutações no gene CFTR (*Cystic Fibrosis transmembrana conductance regulator*). Para além do gene CFTR codificar uma proteína membranar que funciona como um canal de iões, o mesmo também influencia a formação do ducto ejacutório, das vesículas seminais, do ducto deferente e do epidídimo [72]. Por este mesmo motivo, a presença de obstruções aos níveis do epidídimo e do ducto ejacutório, e de anomalias nas vesículas seminais, poderá ser indicativo da presença de mutações no gene CFTR [68]. Estes tipos de obstruções resultam, geralmente, em casos de azoospermia obstrutiva (AO), que se refere à ausência de espermatozoides no ejaculado, sendo a obstrução do epidídimo a causa mais frequente de azoospermia obstrutiva [86]. Uma azoospermia não obstrutiva (ANO), pelo contrário, implica que haja uma disfunção testicular [87], não havendo produção de espermatozoides [36].

Os bloqueios nos ductos de transporte são também, geralmente, associados a traumas ou procedimentos cirúrgicos, nomeadamente sobre as zonas da área inguinal, pélvica ou escrotal. As infeções por ação de agentes bacterianos transmitidos sexualmente, como a *C. trachomatis* e *N. gonorrhoea*, levam a intensas reações inflamatórias dos ductos de transporte e à consequente obstrução dos mesmos, como é o caso da epididimite, que acompanha normalmente casos de orquite, como já foi referido anteriormente [68].

As disfunções ejacutórias referem-se a um grupo de condições nas quais se manifesta uma dificuldade no processo ejacutório, afetando o volume e a qualidade do ejaculado. Os principais tipos são a ejaculação prematura, a ejaculação retrógrada e a anejaculação, *i.e.*, ausência de ejaculação. Uma ejaculação retrógrada refere-se à ausência de espermatozoides no ejaculado, mas presença dos mesmos na urina. Todos estes tipos de disfunções podem originar-se a partir do uso de medicamentos tais como antidepressivos ou antipsicóticos [88].

As funções espermáticas e a motilidade dos espermatozoides poderão ainda ser alteradas ao nível pós-testicular, através de defeitos na maturação, de reações

imunológicas e infecciosas, e através da manifestação de condições como a discinesia ciliar primária [68]. Esta última trata-se de uma condição autossómica recessiva, cujo efeito patológico consiste na imobilidade severa dos espermatozoides, resultante de um movimento flagelar deficiente [42]. Esta condição irá comprometer os mecanismos de transporte de espermatozoides e, podendo também manifestar-se no sistema reprodutor feminino, irá igualmente interferir com o mecanismo de transporte embrionário, levando a que os mecanismos de fecundação e implantação sejam altamente prejudicados [89].

2.2.4. Infertilidade idiopática

Aos casais que não aparentem apresentar qualquer causa de infertilidade conhecida que justifique a sua aparente incapacidade de conceber naturalmente, atribui-se um diagnóstico de infertilidade idiopática, *i.e.*, inexplicável [90]. É um diagnóstico que parece aplicar-se a 1/3 de casais heterossexuais [91]. A veracidade deste diagnóstico tem sido intensamente questionada nos últimos tempos, fruto de o mesmo depender maioritariamente da quantidade e qualidade dos testes de diagnóstico aplicados aos pacientes [92] e não da inexistência de uma causa que explique a infertilidade.

2.2.5. Impacto social e psicológico da infertilidade

A incapacidade de conceber naturalmente ou mesmo de atingir uma gravidez clínica em contexto de tratamento de fertilidade pode dar origem a situações de ansiedade, stress e depressão em ambos os membros do casal [93, 94].

Estas experiências, no entanto, variam conforme as características sociodemográficas e socioculturais entre países e mesmo entre regiões do mesmo país. Em regiões como a África subsariana, o tema da infertilidade ainda carrega um forte sentido de desaprovação e estigma social [95 - 97], pelo facto de, na generalidade, a responsabilidade de um problema de infertilidade ser atribuído à mulher, ainda que homens e mulheres tenham as mesmas probabilidades de serem diagnosticados com algum tipo de infertilidade [98 - 100].

Em países considerados de altos rendimentos, há maior tendência de os pacientes serem privados de qualquer estigma decorrente de um diagnóstico de infertilidade, ou mesmo da opção individual de não seguir um projeto paternal [101]. Isto não significa, no entanto, que os mesmos não sejam confrontados com situações de stress e de depressão, muitas vezes mais incidentes nas mulheres do que nos homens, fruto do facto da infertilidade masculina ser ofuscada [102].

Um dos maiores problemas que impõem barreiras aos pacientes que necessitam de tratamentos de infertilidade são os altos custos financeiros que os mesmos impõem, criando-se sérias dificuldades financeiras [103, 104], agravadas pelo facto de que maior parte dos países não conta com programas de seguros de saúde que consigam cobrir qualquer tratamento de fertilidade [105 - 108].

O esclarecimento de fatores de risco associados à infertilidade e medidas preventivas poderá ser um ponto chave na redução da magnitude da infertilidade, uma vez que esta é, em muitos casos, potenciada por hábitos de vida e condições de saúde que prejudicam a saúde reprodutiva. Muitas vezes, são os grupos socioeconómicos mais desfavorecidos que estão mais expostos a estes fatores de risco, e, portanto, a incorporação de medidas preventivas em programas de saúde pública poderá ser um ponto de partida para que estes grupos estejam mais informados sobre os fatores de risco relacionados com a infertilidade [109].

2.3. Abordagem do casal infértil

A investigação de uma provável causa de infertilidade deverá ser realizada em ambos os membros do casal, uma vez que esta poderá resultar de uma combinação de fatores que impedem o casal de conceber naturalmente. Esta avaliação deverá ser também aplicada a mulheres solteiras ou casais de mulheres, de forma a identificar causas singulares de infertilidade feminina e discutir quais as melhores opções de tratamento [110].

Usualmente, e aplicado a casais de sexo diferente, é recomendada uma avaliação de infertilidade após 12 meses de relações sexuais desprotegidas e regulares. No entanto, em mulheres com idade superior a 35 anos, poderá ser aconselhada uma avaliação mais precoce, normalmente depois de 6 meses sem qualquer conceção natural.

Para que os pacientes sejam corretamente avaliados em relação à sua situação específica, é necessário que, em primeiro lugar, se proceda à recolha do seu historial médico, e em segundo, a uma examinação física, tanto feminina como masculina. Na recolha do historial médico, o casal deverá ser abordado quanto às suas tentativas de conceção, incluindo questões que permitam que se saiba a frequência das relações e problemas associados. A duração da infertilidade e o desfecho de ciclos de tratamento anteriores são pontos cruciais a ser avaliados para que seja feito um diagnóstico apropriado, e se crie um plano de tratamento adequado [110, 111]. Ambos os elementos deverão ser ainda questionados acerca dos seus hábitos sociais, tais como consumo

de tabaco e álcool, e também em relação à eventual exposição a poluentes ou radiação que possa comprometer o seu potencial reprodutivo [112].

Cada elemento do casal deverá ser também avaliado individualmente. A avaliação de um elemento do sexo feminino inclui tópicos como o historial ginecológico e obstétrico da paciente [112]. A história menstrual deverá compreender aspetos tais como a idade da menarca, duração do ciclo menstrual, caracterização do fluxo e presença de dismenorreia ou amenorreia. Deverão ser também abordadas questões relacionadas com o historial médico da paciente, tais como crescimento anormal do pelo, acne, ganho de peso, sintomas de hipertiroidismo ou hipotiroidismo, dor abdominal ou pélvica, medicação de uso recorrente, tipo de método contraceptivo usado e ocorrência de cirurgias pélvicas [110]. É importante que se saiba ainda se há ocorrência de infeção por doenças sexualmente transmissíveis, doença inflamatória pélvica, e ainda o resultado de um último exame para o rastreio do colo do útero. Deverão ainda ser feitos testes para a identificação de inflamação por *C. trachomatis* [113]. A paciente deverá ser também interpelada acerca do historial de doenças na família, nomeadamente infertilidade, doenças da tiroide, SOP, obesidade, doenças genéticas, casos de abortamento recorrente e ainda eventuais casos de cancro ovárico e da mama [64].

Relativamente ao elemento do sexo masculino, o mesmo deverá ser avaliado quanto ao seu historial reprodutivo, que inclui a descrição de casos de conceção prévios e, eventualmente, com outra parceira, e também quanto ao seu historial genital, que inclui problemas associados a disfunções testiculares ou ejaculatórias conhecidas, relato de infeções genitais prévias, e ainda de traumas na região pélvica. Deverão ser também reportadas quaisquer cirurgias que possam comprometer de alguma forma o aparelho reprodutor tais como orquiectomia, reparação de hérnia inguinal ou vasectomia. O paciente deverá ser ainda questionado acerca da toma de medicamentos que possam interferir com a produção de espermatozoides, como por exemplo, administração exógena de testosterona [112].

Ambos os membros do casal deverão ainda ser testados para a presença de infeção por doenças virais tais como hepatite B, hepatite C ou vírus da imunodeficiência humana (VIH) [66].

2.3.1. Avaliação física feminina

O exame físico feminino deverá incluir o cálculo do IMC e a percentagem de gordura, de forma a despistar quaisquer problemas que estejam a comprometer o

processo ovulatório [110]. A presença de fatores que sejam indicativos de excesso de androgénios, como acne e hirsutismo, deverá ser avaliada pelo facto de estarem normalmente associados à SOP, assim com outras anomalias associadas ao sistema endócrino, tais como a presença de nódulos na região do pescoço [110]. Deverá ser também realizado um exame ginecológico que inclua um exame mamário, importante para deteção de galactorreia, e da genitália externa e interna [42]. O exame pélvico recorre, usualmente, à examinação com recurso ao espéculo para avaliar a anatomia da vagina e cérvix, e a uma examinação bimanual para avaliar o tamanho, consistência e forma do útero [112]. A avaliação pélvica é ainda complementada com a ultrassonografia transvaginal, para verificar, com maior precisão, dimensões do útero e ovários, e quaisquer anomalias cuja presença possa ser confirmada, nomeadamente miomas uterinos ou quistos ováricos [46, 112].

A avaliação do elemento feminino envolve, para além de um exame físico geral, a deteção da ovulação, a avaliação tubar e uterina, e ainda a testagem da reserva ovárica feminina [112].

A deteção de ovulação poderá ser feita com recurso a testes ovulatórios que poderão ser de confirmação ou preditivos. A quantificação dos níveis de progesterona sérica ao 21º dia do ciclo menstrual, ou seja, na fase lútea, é o método mais usado para confirmação da ovulação [111]. Valores de progesterona sérica acima de 3 ng/mL são indicativos da ocorrência da ovulação, sendo que pacientes que apresentem valores inferiores deverão ser avaliadas para a presença de anovulação [110, 114]. Existem ainda outras alternativas que permitem identificar o momento da ovulação como é o caso do uso de *kits* que são capazes de prever o momento da ovulação através da quantificação dos níveis de LH [115], não sendo o seu uso recomendado em pacientes que sofram de SOP, uma vez que os valores caracteristicamente altos de LH poderão induzir um falso-positivo [110]. A medição da temperatura corporal basal é outro método de confirmação da altura da ovulação, baseando-se no pressuposto que a temperatura corporal basal aumenta aproximadamente 0,5°C na fase lútea do ciclo menstrual, logo após o surgimento do pico de LH [116]. Apesar deste último ser, em termos de custo-benefício, o melhor método de confirmação de ovulação, a quantificação dos níveis de progesterona sérica continua a ser o método preferencial e de maior eficácia [110]. A monitorização folicular por ultrassonografia transvaginal é também um dos métodos usados para avaliar o crescimento folicular, e, portanto, a ocorrência de ovulação [42, 64]. Se qualquer um dos testes levantar suspeitas acerca da uma disfunção ovulatória, são feitas, posteriormente, análises que permitam avaliar a função endócrina e inferir

acerca da possibilidade de a paciente apresentar alguma causa que leve a situações oligovulação ou anovulação, incluindo a avaliação de valores da FSH, LH, prolactina, estradiol e androgénios [112].

A medição da reserva ovárica permite prever, através da quantidade e qualidade ovocitária, a resposta da paciente a um ciclo de tratamento de infertilidade. Para isso, recorre-se a diferentes métodos, entre os quais a contagem do número total de folículos antrais, da concentração da hormona antimülleriana (AMH – *Anti-Müllerian hormone*) e da FSH. Enquanto os níveis da FSH refletem a integridade hormonal do folículo ovárico, parâmetros como os níveis de AMH e o número de folículos antrais são capazes de refletir com maior precisão o número de ovócitos que residem no ovário [112]. Os níveis de FSH são medidos, geralmente, ao 3º dia do ciclo menstrual, devendo os valores situar-se abaixo de 10 mIU/mL, em combinação com valores de estradiol abaixo dos 80 pg/mL, caso contrário, conclui-se que a paciente poderá ter uma reserva ovárica comprometida [46, 110, 111].

A quantificação da AMH é o marcador da reserva ovárica que se sobrepõe a outros por ter a conveniência de poder ser realizado em qualquer altura do ciclo [112]. A AMH é uma hormona libertada a partir das células da granulosa de folículos antrais e, como tal, reflete eficazmente a quantidade de folículos que residem no ovário, observando-se uma redução gradual dos seus níveis durante a vida reprodutiva de uma mulher, até à menopausa [46]. A contagem dos folículos antrais é um método que, por se basear na contagem de aqueles folículos que aparentem ter dimensões entre 2 e 10 mm, poderá ser um método mais subjetivo [112, 117]. Na maior parte dos casos, recorre-se simultaneamente ao uso dos três métodos referidos de medição da reserva ovárica [112].

A investigação de um possível fator tubar é normalmente feita por recurso a procedimentos tais como histerossalpingografia ou laparoscopia [46]. A histerossalpingografia deverá ser recomendada apenas a mulheres que não evidenciem uma obstrução nítida das trompas. Este tipo de procedimento permite a visualização de eventuais estruturas ou lesões intrauterinas, através de um método menos invasivo e com potenciais efeitos terapêuticos [113, 118], envolvendo a injeção de um meio de contraste radiopaco através do colo do útero, permitindo que o mesmo preencha a cavidade endometrial e as trompas de Falópio, revelando a presença de potenciais anomalias anatómicas [112]. A laparoscopia, por ser um método mais invasivo e de maior sensibilidade, permite analisar possíveis adesões pélvicas, casos de endometriose ou outras patologias pélvicas [46]. A histeroscopia é o método preferencial

para avaliação das patologias intrauterinas, que permite, simultaneamente, a visualização e a correção das mesmas, através de procedimento cirúrgico [46].

2.3.2. Avaliação física masculina

A primeira etapa no diagnóstico de uma possível infertilidade masculina passa por realizar uma análise ao espermatozoide, também denominada de espermograma, que permite avaliar parâmetros tais como a concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides [42]. Este estudo, no entanto, poderá ter algumas limitações em relação ao seu valor no diagnóstico, nomeadamente devido à subjetividade inerente ao estudo e ao facto de poder haver diferenças de análise entre laboratórios e técnicos [46]. Se os parâmetros espermáticos se revelarem anormais em comparação com os valores de referência estipulados pela OMS [119], deverá ser pedida uma nova análise para assegurar consistência dos resultados [112].

Dependendo dos resultados do espermograma, poderá ser necessário proceder-se a uma avaliação de certas características físicas que poderão ser confirmativas de algum problema relacionado com parâmetros espermáticos anormais evidenciados, tais como hipogonadismo, ausência do canal deferente, entre outros. Este exame físico inclui uma avaliação geral do peso e altura do paciente e das suas características sexuais secundárias. Na eventualidade de ser necessário um exame pélvico de maior detalhe, são avaliadas características tais como o desenvolvimento peniano, consistência e volume testicular e presença ou ausência de eventuais casos de varicocele ou hérnias [64, 112]. A suspeita de um eventual caso de hipogonadismo deverá ser confirmada pela quantificação dos valores de FSH e testosterona, que deverão, idealmente, situar-se num intervalo de valores de 1,5 a 12,4 mIU/mL e 240 a 950 ng/dL, respetivamente. A diferenciação entre um caso de hipogonadismo primário ou secundário baseia-se no pressuposto de que os valores altos de FSH e valores baixos de testosterona são normalmente indicativos da primeira situação, e valores baixos para ambos os parâmetros atribuir-se-ão a um caso de hipogonadismo secundário [111].

Poderão ser ainda necessários outros tipos de análises para confirmar casos de oligozoospermia ou azoospermia, tais como a biópsia testicular, que é feita para efeitos de uma possível recolha de espermatozoides, que poderão ser usados em futuros tratamentos de infertilidade [111]. Através de análises sanguíneas é possível ainda identificar possíveis infeções do trato urinário não tratadas e doenças sexualmente transmissíveis, ambas sendo extremamente prejudiciais para a fertilidade masculina

uma vez que podem causar uma obstrução parcial ou completa do ducto ejaculatório, vesículas seminais ou próstata.

2.3.3. Tratamentos

Mediante o diagnóstico feito a partir das avaliações do historial dos pacientes, é formulado um plano de tratamento que irá depender das causas de infertilidade associadas, ou das necessidades de cada paciente [110]. Dentro das técnicas de PMA, a inseminação intrauterina (IIU) é a menos invasiva, considerando-se uma técnica de 1º linha. A IIU, para além de ser utilizada em casos de problemas de ovulação ou de infertilidade idiopática, é também o método de tratamento indicado em casos de mulheres sem parceiro e casais de mulheres que necessitem de doação de espermatozoides. A fertilização *in vitro* (FIV) e injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) são tratamentos de 2º linha e, como tal, são aplicados em casos de infertilidade mais severos. A FIV tem como principais indicações casos de obstrução ou ausência bilateral das trompas uterinas, endometriose ou insucesso nos tratamentos de IIU. A ICSI é um método indicado em casos de infertilidade masculina grave ou em casos de insucesso de tratamento com FIV [64]. Em situações de fator de infertilidade masculina ou feminina grave, é aconselhado recorrer-se à doação de gâmetas (espermatozoides ou ovócitos), ou mesmo à doação de embriões. Graças ao método de criopreservação, é possível manter gâmetas, embriões ou tecido reprodutivo em armazenamento até à sua utilização.

Capítulo 2 – Técnicas de Reprodução Assistida

1. Colheita, preparação e seleção de gâmetas

1.1. Gâmetas masculinos

A recolha dos gâmetas masculinos, *i.e.*, os espermatozoides, é feita com recurso a uma colheita de amostra seminal através de masturbação. Esta amostra é posteriormente analisada e, para efeitos de uso em tratamentos de PMA, processada de forma que sejam selecionados os gâmetas com maior potencial de fecundação.

1.1.1. Análise espermática

A análise do esperma e dos seus parâmetros associados é o método preferencial de investigação da infertilidade masculina uma vez que reflete a capacidade testicular de produção de espermatozoides, a permeabilidade do sistema de ductos pós-testicular e a eficácia da contração muscular do epidídimo e ducto eferente em transportar os espermatozoides até à uretra [119, 120]. O volume do fluido ejaculatório irá, por outro lado, refletir a atividade secretora das glândulas acessórias [119].

A análise espermática envolve a avaliação das propriedades físicas do esperma, ou seja, uma observação macroscópica, e uma observação microscópica, que inclui parâmetros tais como a avaliação da motilidade, da vitalidade, concentração e morfologia dos espermatozoides.

Para proceder à colheita da amostra, o paciente, em primeiro lugar, deverá, para além de fornecer os seus dados pessoais, informar acerca do tempo de abstinência sexual, que não deverá ser mais do que 2-3 dias [119]. O facto de os espermatozoides se acumularem no epidídimo e estes não serem completamente esvaziados numa só ejaculação, faz com que a qualidade dos espermatozoides seja influenciada no ejaculado [121, 122], daí o tempo de abstinência ideal ser de 2-3 dias, uma vez que permite que o armazenamento de espermatozoides no epidídimo se esgote [123, 124]. Ultimamente, o período de abstinência sexual tem sido debatido pelo facto de alguns estudos recentes terem reportado uma melhoria dos parâmetros espermáticos quando o período de abstinência é reduzido a poucas horas [125, 126]. Como tal, uma revisão deste período de abstinência poderá estar em vista, a favor de beneficiar a qualidade dos espermatozoides usados para avaliação espermática ou para tratamentos de PMA.

Posteriormente, o paciente recebe um frasco, que se encontra à temperatura ambiente e devidamente esterilizado, para que possa proceder à colheita por masturbação. É importante salientar que a colheita não deverá ser feita por coito

interrompido, apenas em casos excepcionais, uma vez que poderá levar a uma colheita incompleta ou a contaminação com fluidos vaginais e células. Em caso de extrema necessidade, poderá recomendar-se o uso de preservativos especialmente concebidos para investigação de fertilidade, não eliminando, no entanto, a hipótese de haver contaminações [120]. Na eventualidade de o paciente preferir fazer a colheita em casa, a mesma deverá ser cuidadosamente transportada, tendo o cuidado da mesma estar sempre junto ao corpo de forma a manter uma temperatura próxima dos 37°C até chegar às instalações [120]. O tempo entre a colheita e a colocação do frasco numa estufa a 37°C não deverá exceder os 30 minutos [119].

Após a colheita, o frasco é colocado na estufa a 37°C, para que posteriormente se dê a análise da liquefação que em condições normais ocorre entre 15 e 30 minutos após ejaculação [119].

1.1.1.1. Observação Macroscópica

A análise macroscópica da amostra inicia-se com a examinação do processo de liquefação, passando-se a uma rotina geral de avaliação da viscosidade, aparência, cor, volume e pH.

1.1.1.1.1. Liquefação

A amostra permanece durante 15-20 minutos na estufa a 37°C até que esteja completamente liquefeita, ou seja, quando a sua aparência for homogénea e tiver uma consistência líquida. Na eventualidade de a amostra não evidenciar uma liquefação completa, poderá aplicar-se um método mecânico ou enzimático para aumentar a fluidez da amostra.

1.1.1.1.2. Cor

Uma amostra normal de esperma liquefeita tem uma aparência homogénea e uma cor cinzenta-esbranquiçada opaca. As amostras que aparentem uma cor mais transparente, em princípio, terão uma menor concentração de espermatozoides [120].

O ejaculado poderá ainda ter outras colorações tais como ligeiramente amarelado, proveniente de um longo tempo de abstinência, vermelho acastanhado quando se trata de um caso de hemospermia, ou amarelo-claro em pacientes que estejam a tomar certas vitaminas [119].

1.1.1.1.3. Cheiro

O cheiro é um parâmetro que, ainda que tenha tendência para ser subjetivo, é importante para que se possa despistar alguma alteração no caso, de, por exemplo, se

sentir um grande odor a urina ou odor putrefacto. As amostras normais têm um cheiro característico, *sui generis*.

1.1.1.1.4. Viscosidade

A viscosidade refere-se às propriedades elásticas da amostra após liquefação, sendo que a maneira como a amostra é expulsa através da pipeta indicará o seu nível de viscosidade - se cair em pequenas gotas, terá uma viscosidade normal, se, pelo contrário, formar um filamento com mais de 2 cm, será uma amostra com viscosidade aumentada [127]. Na eventualidade de a amostra ter uma viscosidade bastante aumentada, esta poderá ser mecânica ou enzimaticamente processada para facilitar as análises microscópicas procedentes. Um processamento mecânico envolve a diluição da amostra com um pouco de meio de cultura [127], enquanto o enzimático envolve a adição de enzimas proteolíticas, como, por exemplo, a quimiotripsina [128].

1.1.1.1.5. Volume

Uma medição precisa do volume do ejaculado é importante para inferir acerca das funções secretórias das glândulas auxiliares, para além de que será necessário para calcular o número total de espermatozoides no ejaculado.

De acordo com os valores de referência da OMS, uma amostra de esperma deverá ter, pelo menos 1,5 mL [119]. A medição deste volume deverá ser feita com uma pipeta serológica graduada.

1.1.1.1.6. pH

O pH do ejaculado irá resultar da contribuição das secreções ácidas prostáticas e a da secreção alcalina da vesícula seminal. A medição do pH é feita através do uso de uma tira de papel indicador de pH, a qual nos indicará um valor de pH entre 6.0 e 8.0 através da comparação entre a cor resultante, depois de se colocar uma gota da amostra na tira, e a escala de cores associada à embalagem [129]. De acordo com os valores referência da OMS, o pH deverá ter um valor mínimo de 7.2 e não deverá ser superior a 8 [119].

1.1.1.2. Parâmetros microscópicos

A avaliação microscópica de uma amostra envolve parâmetros tais como a aglutinação, motilidade, concentração, vitalidade e morfologia.

Para avaliação de preparações a fresco não coradas utiliza-se um microscópio de contraste de fase. Antes de qualquer avaliação pormenorizada deverá, no entanto, analisar-se a amostra a partir de um plano geral para detetar agregados ou aglutinação

de espermatozoides, e a presença de outras células para além de espermatozoides, tais como leucócitos e células da linha germinativa [119]. A preparação de uma lâmina a fresco passa por, em primeiro lugar, agitar bem a amostra para que os valores entre alíquotas não sejam significativamente diferentes, e, posteriormente, coloca-se um volume de 10 μL na lâmina e cobre-se com uma lamela de 22 μm x 22 μm [119].

1.1.1.2.1. Aglutinação

A aglutinação refere-se à ligação entre os espermatozoides móveis quer através das suas cabeças ou caudas. A presença de aglutinados poderá comprometer não a motilidade individual de cada espermatozoide, mas sim o movimento em geral, dependendo do nível de aglutinação [119].

1.1.1.2.2. Motilidade

A avaliação da motilidade trata-se de uma avaliação qualitativa do movimento dos espermatozoides, sendo um dos parâmetros mais importantes numa avaliação da qualidade dos espermatozoides e da sua competência para fecundação [130]. De acordo com a 6ª edição do manual da OMS, um sistema de quatro categorias de motilidade deverá ser usado para avaliação das amostras [119], sendo entre elas a motilidade progressiva rápida, progressiva lenta, não progressiva, ou imóvel. Os espermatozoides com motilidade progressiva movem-se ativamente, e numa trajetória consistente, sendo que os progressivos rápidos apresentam uma maior velocidade de movimento ($\geq 25 \mu\text{m/s}$), em comparação com os progressivos lentos ($5 \text{ a } < 25 \mu\text{m/s}$). Os espermatozoides não progressivos apresentam movimentos da cauda, ainda que sem qualquer progressão, e os imóveis permanecem sem qualquer movimento ativo da cauda [119]. Uma amostra que tenha uma percentagem de espermatozoides com motilidade progressiva abaixo dos valores de referência poderá ser indicativa de um caso de astenozoospermia [131].

A motilidade deverá ser um dos primeiros parâmetros a ser avaliado, uma vez que a exposição da amostra a alterações de pH, temperatura ou ao efeito da desidratação poderá comprometer o movimento dos espermatozoides e, consequentemente, um resultado fiável. O procedimento para avaliação passa pela preparação de uma lâmina a fresco com 10 μL de amostra, que será observada ao microscópio para contagem de 200 espermatozoides, começando-se pelo progressivos, não progressivos e, no final, imóveis. Enquanto se faz a contagem da motilidade dos espermatozoides, a amostra deverá permanecer numa superfície aquecida, uma vez que a mobilidade dos espermatozoides é dependente da temperatura [119]. Deverão ser feitas duas contagens a partir de duas alíquotas diferentes, e no fim, se os valores

se encontrarem próximos entre si, reporta-se os valores na forma de percentagem média para cada categoria.

1.1.1.2.3. Vitalidade

A avaliação da vitalidade dos espermatozoides permite distingui-los entre espermatozoides vivos ou mortos. Esta análise baseia-se na avaliação da integridade da membrana celular do espermatozoide [120], podendo ser feita com recurso a um teste de eosina e/ou teste de hipoosmolaridade.

O teste de eosina permitirá avaliar a vitalidade dos espermatozoides através da sua coloração com Eosina Y a 0.5%. Em primeiro lugar, faz-se uma diluição de 1:1 com a Eosina Y que irá penetrar apenas o núcleo dos espermatozoides que o permitam, ou seja, aqueles que apresentem algum dano na sua membrana, apresentando-se assim como uma coloração vermelha ao microscópio. Os restantes espermatozoides não corados e, portanto, vivos, apresentam-se sem coloração [119]. O corante deverá atuar durante 5 minutos sobre os espermatozoides antes de se fazer uma lâmina com esfregação e observar ao microscópio de contraste de fase. O teste da vitalidade deverá ser feito para 200 espermatozoides, e a percentagem de células mortas não deverá exceder a percentagem de espermatozoides imóveis reportados na motilidade. No caso de os valores da vitalidade serem baixos e, conformemente, a percentagem de espermatozoides imóveis ser alta, a amostra poderá ser característica de um caso de necrozoospermia [131].

O teste da hipoosmolaridade baseia-se no princípio que apenas células vivas irão reagir quando expostas a condições hipoosmóticas. O influxo do fluido hipoosmótico nos espermatozoides reflete-se pelo enrolamento das caudas dos espermatozoides (Figura 10) [119].

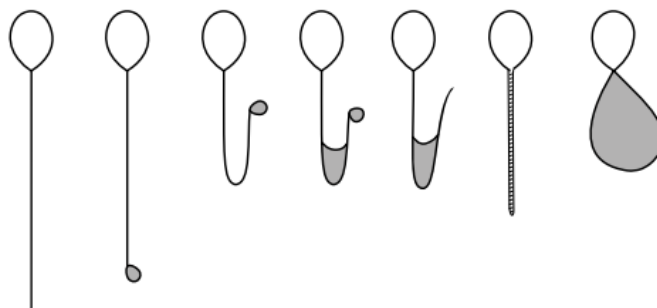


Figura 10. Representação ilustrativa das mudanças morfológicas típicas em espermatozoides humanos expostos a stress hipoosmótico. Retirado de [119].

Para esta análise prepara-se uma diluição de 1:10, com 10 μL de amostra de esperma e 90 μL de solução hipoosmótica, composta por citrato de sódio di-hidratado e D-frutose. Esta diluição deverá ser colocada na incubadora a 37°C durante cerca de 30 minutos, e, após esse tempo, prepara-se uma lâmina a fresco para ser observada ao microscópio de contraste de fase. Tal como nas outras análises, são contados 200 espermatozoides, distinguindo-se os espermatozoides com cauda enrolada e cauda intacta. A percentagem de espermatozoides com cauda enrolada corresponde à percentagem de espermatozoides vivos.

1.1.1.2.4. Concentração

A concentração de espermatozoides é definida como o número de espermatozoides por mL de ejaculado [119].

Para a contagem dos espermatozoides, é necessário recorrer-se a uma câmara de *Neubauer*, procedendo-se, em primeiro lugar, à preparação de uma diluição apropriada, dependendo da concentração da amostra de espermatozoides em causa, sendo que quanto maior for a concentração, maior quantidade de solvente será necessário utilizar. Um valor mínimo de 50 μL de amostra deverá ser usado para fazer a diluição com um fixador que é capaz de imobilizar os espermatozoides, sendo que o mais usado é uma solução salina de formol a 3.5%. Este fixador é preparado através da combinação de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e uma solução de formaldeído. Para fazer a diluição, recorre-se a uma pipeta de deslocamento positivo para retirar o volume exato de amostra, uma vez que estas pipetas são ideais para o manuseio de líquidos mais viscosos. Depois da amostra ser diluída, um volume de 10 μL é carregado numa das câmaras de contagem, sendo que a mesma deverá ser colocada em câmara húmida para facilitar a sedimentação dos espermatozoides.

A contagem dos espermatozoides deverá ser feita com recurso a um microscópio de contraste de fase. Numa câmara de *Neubauer*, é possível identificar 9 compartimentos, no qual uma zona central é dividida em 25 quadrados, em que cada um se encontra dividido por linhas triplas (Figura 11). A contagem dos espermatozoides será feita consoante a sua concentração, isto é, quanto maior o número de espermatozoides que se encontra no quadrado superior esquerdo, menor é o número de quadrados onde se procede à contagem.

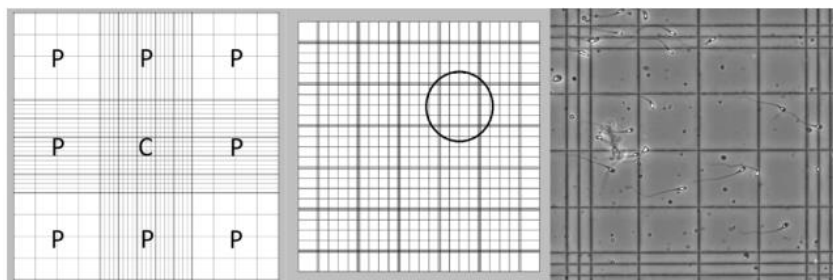


Figura 11. Representação esquemática da área inscrita numa câmara de *Neubauer*: no painel do lado esquerdo observam-se os 9 compartimentos, e no painel do meio, o compartimento central (C) dividido em 25 quadrados, contendo todos eles 16 quadrados, delimitados todos eles por linhas triplas, tal como representado no painel do lado direito. Retirado de [119].

A partir da contagem, é possível calcular a concentração de espermatozoides através de uma fórmula que divide o número de espermatozoides contados por um fator de conversão próprio (Tabela 1) para a câmara de contagem *Neubauer Improved*, dependendo da diluição e do número de quadrados contados.

Tabela 1. Tabela com fatores de conversão próprias para uma câmara de contagem *Neubauer Improved*, dependendo do número de quadrados contados e da diluição realizada. Adaptado de [119].

Nº de quadrados contados	Diluição 1:1 (1+1)	Diluição 1:5 (1+4)	Diluição 1:10 (1+9)	Diluição 1:20 (1+19)	Diluição 1:50 (1+49)
25	100	40	20	10	4
10	40	16	8	4	1.6
5	20	8	4	2	0.8

A partir do valor da concentração de espermatozoides, é possível calcular o número total de espermatozoides no ejaculado, através do valor do seu volume. No caso de o valor da concentração, ou número, ser inferior aos valores de referência mínimos publicados pela OMS, pode tratar-se de um caso de oligozoospermia [131].

1.1.1.2.5. Morfologia

A avaliação dos aspetos morfológicos dos espermatozoides não só traduz a qualidade da amostra e o estado funcional do aparelho reprodutor masculino, como também é importante para inferir o prognóstico de uma tentativa de conceção espontânea ou tratamento de PMA [119]. O sistema de avaliação morfológica proposto pelo manual da OMS [119] baseia-se nos critérios estritos de *Kruger* [132].

Numa avaliação morfológica, anomalias relacionadas com a constituição dos espermatozoides em questão deverão ser tidas em contas, nomeadamente anomalias da cabeça, peça intermédia, cauda e ainda restos citoplasmáticos. Um valor mínimo de 4% de formas normais é um parâmetro essencial para que a amostra em questão seja considerada de boa qualidade, ou normal. Se a amostra tiver um valor abaixo desse valor de referência, poderá tratar-se de um caso de teratozoospermia [131].

Para que um espermatozoide seja, na sua plenitude, considerado normal (Figura 12), este terá de ter uma cabeça oval, lisa e com uma região acrossómica bem definida, ocupando cerca de 40-70% da cabeça [133]. A peça intermédia deverá ser regular e com o mesmo comprimento da cabeça, para além do seu eixo central, que deverá estar alinhado com o da cabeça. A cauda deverá ter uma menor largura que a peça intermédia, mas deverá ter um calibre uniforme em todo o seu comprimento, que deverá ser de 45 μm [119]. Espermatozoides que pareçam anormais devido a uma forma irregular da cabeça estão normalmente associados a uma diminuição do seu potencial de fecundação e a uma maior probabilidade de haver fragmentação de DNA, por isso mesmo, é importante fazer-se uma avaliação detalhada da morfologia das cabeças dos espermatozoides [119].

Antes da análise, é necessário proceder-se à preparação da lâmina de morfologia, que começa pela colocação de uma gota da amostra numa lâmina, fazendo-se um esfregaço na mesma. A mesma lâmina será depois fixada em metanol durante cerca de 10 segundos, procedendo-se, posteriormente, à coloração da lâmina, recorrendo a uma técnica designada coloração de Papanicolau, que permite que as diferentes regiões do espermatozoide fiquem coradas de diferentes modos, isto é, a cabeça fica corada de azul-claro na região do acrossoma e azul-escuro na região pós acrossómica, a peça intermédia de vermelho e a cauda de azul ou avermelhado. Os restos citoplasmáticos normalmente são corados de verde, ou vermelho, sendo essa cor indicativa de outras anormalidades. Para corar a lâmina, primeiro mergulha-se em solução Papanicolau durante 10 segundos, passando-se a lâmina logo de seguida para uma solução de *Shorr* durante 20 segundos. Passado esse tempo, passa-se em água corrente para retirar o excesso de corante. A lâmina deverá secar completamente antes de ser observada ao microscópio de campo brilhante, na ampliação de 1000x, com a objetiva de imersão. Registam-se, portanto, as percentagens de espermatozoides normais, de anomalias de cabeça (Figura 13), peça intermédia (Figura 14) e cauda (Figura 15), e ainda percentagem de restos citoplasmáticos. Poderá ainda registar-se percentagens de células para além de espermatozoides (Figura 16), como leucócitos,

hemácias, células da linha germinativa, bactérias ou células epiteliais. A presença de eritrócitos no ejaculado poderá tratar-se de um caso de hemospermia, enquanto a presença de leucócitos indicará um caso de leucospermia [131].

Para amostras com pouca concentração de espermatozoides, e que, portanto, impeçam a análise de certos parâmetros, é necessária uma centrifugação e posterior montagem de uma nova lâmina de morfologia. Se foram observados espermatozoides no precipitado resultante da centrifugação, tratar-se-á de um caso de critopzoospermia. Se, pelo contrário, não for observado qualquer espermatozoide depois da centrifugação, trata-se de um caso de azoospermia [131].

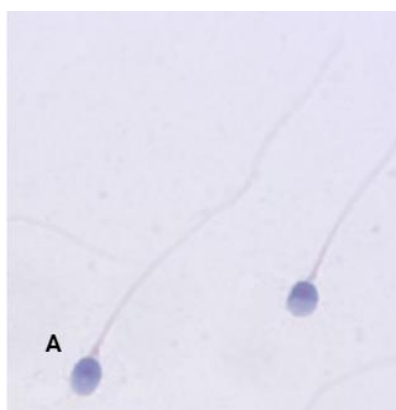


Figura 12. Foto representativa de um espermatozoide morfologicamente normal (A). Retirado de [119].

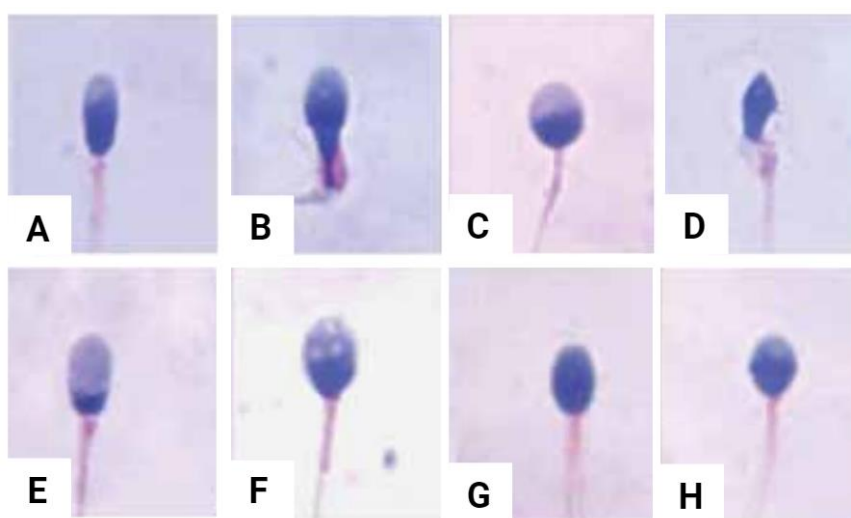


Figura 13. Fotos representativas de espermatozoides com anomalias de cabeça. (A) Afunilada; (B) Piriforme, (C) Redonda; (D) Amorfa; (E) Acrossoma grande; (F) Vacuolizada; (G) Acrossoma pequeno; (H) Pequena. Retirado de [131].

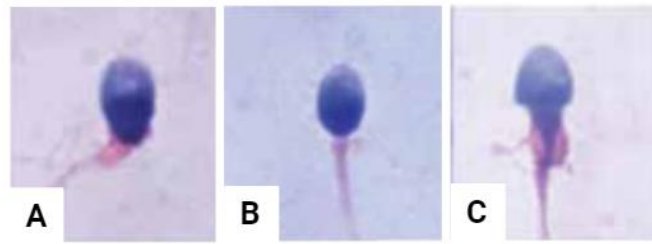


Figura 14. Fotos representativas de espermatozoides com anomalias de peça intermédia. (A) Dobrada; (B) Espessa; (C) Restos citoplasmáticos. Retirado de [131].

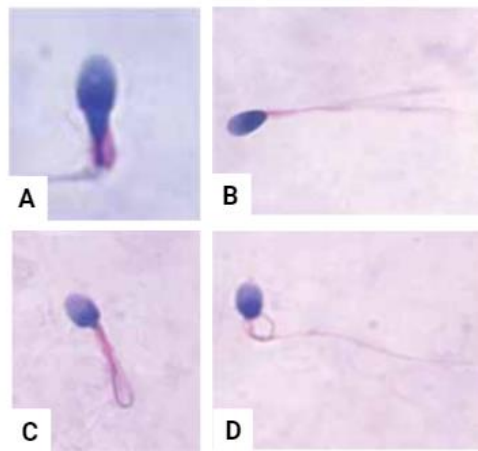
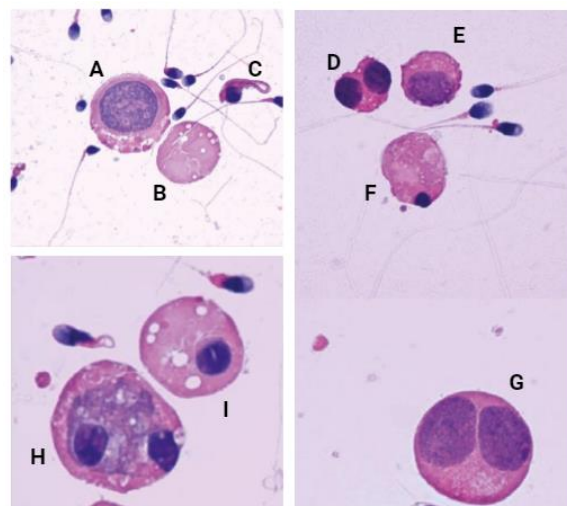


Figura 15. Fotos representativas de espermatozoides com anomalias de cauda. (A) Dobrada; (B) Dupla; (C) Em *loop*; (D) Enrolada. Retirado de [131].



Sepa

Figura 16. Representação em fotografia de outras células para além de espermatozoides. (A) Macrófago; (B) Citoplasma; (C) Espermatozoide anormal; (D) Espermátide em divisão; (E) Espermatócito; (F) Espermátide em degeneração; (G) Espermatócito em divisão; (H) Macrófago em fagocitose; (I) – Espermátide. Retirado de [119].

1.1.1.3. Valores de referência

De modo a haver um termo de comparação para os parâmetros avaliados numa análise à amostra seminal, foram publicados pela OMS um conjunto de valores de referência (Tabela 2) que indicam qual será o valor mínimo aceitável para que uma amostra seja, na generalidade, considerada de boa qualidade. Qualquer valor que se encontre abaixo desses níveis de referência poderá ser indicativo da presença de um fator masculino associado à amostra em questão.

Tabela 2. Valores de referência mínimos para uma análise espermática, atualizados conforme o manual da OMS de 2021 [119].

Parâmetro	Valor de referência mínimo
Volume (mL)	1,4 (1,3 – 1,5)
Número total de espermatozoides (10^6 por ejaculado)	39 (35 - 40)
Concentração de espermatozoides (10^6 por mL)	16 (15 - 18)
Motilidade total (PR + PL + NP, %)	42 (40 - 43)
Motilidade progressiva (PR + PL %)	30 (29 - 31)
Vitalidade (%)	54 (50 - 56)
Morfologia (%)	4 (3,9 – 4,0)
pH	$\geq 7,2$
Leucócitos (10^6 por mL)	< 1.0

1.1.2. Processamento da amostra seminal

1.1.2.1. Métodos de colheita da amostra

Em situações normais, uma amostra seminal é colhida através de masturbação, podendo-se imediatamente processar a mesma para ser usada posteriormente em tratamentos de PMA. No entanto, no caso de se identificar, através da análise da amostra, uma situação de possível azoospermia, opta-se por recorrer a outros métodos de colheita da amostra que permitam obter espermatozoides diretamente a partir dos testículos, epidídimo ou canal deferente [134].

A azoospermia caracteriza-se pela ausência evidente de espermatozoides no ejaculado, depois da observação de duas amostras centrifugadas [134]. Esta condição afeta 1% da população em geral e cerca de 15% de homens inférteis [135], podendo ser dividida em obstrutiva e não obstrutiva. A AO deve-se, tal como o nome indica, à

obstrução do trato reprodutivo, impedindo que os espermatozoides formados nos testículos e epidídimo se juntem ao restante ejaculado [134], sendo esta condição caracterizada, portanto, por níveis normais de espermatogénese [136]. A ANO resulta de anormalidades congénitas ou genéticas que afetam diretamente a funcionalidade testicular, observando-se uma redução na produção de espermatozoides [134]. No caso de ser obstrutiva, esta irá afetar a passagem dos espermatozoides através do trato reprodutivo, a partir dos testículos, logo, a colheita dos espermatozoides poderá ser feita a partir diretamente do vaso deferente, epidídimos ou testículos. Na azoospermia não obstrutiva, no entanto, a falha de espermatozoides no ejaculado dá-se pela deficiência de produção dos mesmos ao nível testicular e, como tal, a colheita estará limitada aos testículos [134]. Homens com azoospermia obstrutiva apresentam, na sua generalidade, um tamanho testicular normal, assim como parâmetros hormonais. Contrariamente ao observado na AO, a ANO caracteriza-se por um aumento dos valores da FSH e uma diminuição do tamanho dos testículos [137].

1.1.2.1.1. Colheita de espermatozoides em casos de AO

Os principais métodos de colheita de espermatozoides são divididos conforme o seu local de aplicação, isto é, se a colheita é feita ao nível do canal deferente, epidídimo ou testículo.

Homens que tenham qualquer obstrução congénita ou adquirida ao nível da próstata ou canal deferente poderão recorrer a uma aspiração de espermatozoides ao nível do canal deferente. Estes pacientes deverão ter um volume testicular normal e valores de testosterona e FSH também normais [134]. Neste procedimento, é aspirado fluido rico em espermatozoides a partir de uma incisão feita na parede muscular do canal deferente [134]. Os espermatozoides recolhidos poderão ser criopreservados ou usados no próprio dia caso se tenha previsto a sincronização da ovulação da mulher com a aspiração. A aspiração dos espermatozoides poderá ser feita através de uma pequena punção na pele (*Percutaneous Vasal Sperm Aspiration* - PVSA) ou então por uma pequena incisão diretamente no canal deferente através do escroto (*Microscopic Vasal Sperm Aspiration* - MVSA).

Em casos onde o canal deferente está obstruído ou mesmo ausente, a aspiração dos espermatozoides poderá, em alternativa, ser feita ao nível do epidídimo. Tal como no método anterior, esta aspiração pode ser feita através de aspiração microcirúrgica, aspirando-se o fluido dos túbulos do epidídimo através de uma pequena incisão no escroto (*Microsurgical epididymal sperm aspiration* - MESA) ou através de aspiração percutânea (*Percutaneous epididymal sperm aspiration* - PESA), onde se procede à

punção do epidídimo para recolha de fluido rico em espermatozoides móveis [134, 137, 138]. A diferença entre a aspiração percutânea ou microscópica é que esta última permite a amostragem individual dos túbulos do epidídimo, ao contrário da aspiração percutânea, em que vários túbulos são puncionados sem critério, resultando, evidentemente, em espermatozoides com menor motilidade [134, 138].

A extração de espermatozoides ao nível testicular é usada rotineiramente para casos de AO, assim como em casos de disfunção testicular, ou seja, ANO. Nos casos de AO, poderá fazer-se a recolha através de aspiração testicular (*Testicular Sperm Aspiration* - TESA) ou através de extração por biópsia percutânea ou cirúrgica (*Testicular Sperm Extraction* - TESE). A aspiração testicular envolve a colocação de uma agulha no parênquima testicular através do saco escrotal, permitindo a aspiração de tecido, que será posteriormente colocado numa placa de Petri com meio de lavagem e dissecado com recurso a bisturi para que seja possível libertar o fluido dentro dos túbulos no tecido. Esse mesmo fluido é visto ao microscópio para possível identificação dos espermatozoides [139]. A extração testicular envolve, tanto em biópsia percutânea ou aberta, a recolha de tecido testicular que irá ser posteriormente processado para identificação de espermatozoides ao microscópio. Na biópsia percutânea, a pistola de biópsia é inserida através da pele até à túnica albugínea, enquanto na cirúrgica a pele escrotal sofre uma incisão, expondo a túnica vaginal e posteriormente a túnica albugínea, que sofrerá também uma incisão para que sejam excisados os fragmentos testiculares. A biópsia cirúrgica poderá, comparativamente à biópsia percutânea, estar associada à diminuição da produção de testosterona no caso de serem retirados vários fragmentos testiculares, ou de grandes tamanhos [134].

1.1.2.1.2. Colheita de espermatozoides em casos de ANO

Para a azoospermia não obstrutiva, outros métodos terão de ser empregues para efetivamente identificar a presença de espermatozoides. Nestes pacientes, uma avaliação física geralmente revela uma atrofia testicular e níveis de FSH bastante elevados. Adaptada a esta condição, existem três métodos que permitem extrair espermatozoides através dos testículos - o *Multibiopsy* TESE que, ao contrário do método de TESE normal, recorre a várias incisões para extrair tecido para identificação de espermatozoides, o *Microdissection* TESE, que recorre à observação dos túbulos seminíferos ao microscópio para selecionar aqueles que serão biopsados [134, 140] e o *Fine Needle Aspiration Map-guided* TESE, que consiste na identificação e localização de espermatozoides em porções de tecido que foram recolhidos e posteriormente

corados, para posterior recolha dos espermatozoides conforme posicionamento da aspiração precedente [141, 142].

1.1.2.2. Processamento da amostra seminal

Após a colheita da amostra seminal, a mesma é processada para que possa ser utilizada em casos IIU, FIV ou ICSI. Poderá também ser preparada para efeitos de criopreservação de gâmetas, isto em casos de preservação de fertilidade, ou por exemplo, na preservação de espermatozoides de dador.

De entre os meios usados para o processamento da amostra, o meio que servirá de gradiente de separação³ deverá ser colocado à temperatura ambiente pelo menos duas horas antes da sua utilização, ou de véspera. O meio de cultura⁴ utilizado para lavagem e *swim-up* deverá ser preparado pelo menos com 3 horas de antecedência e colocado na estufa a 37°C, 6% CO₂.

Depois da colheita da amostra num frasco de recolha estéril, o mesmo deverá ser colocado na estufa a 37°C até que se complete a liquefação da amostra. Posteriormente, prepara-se uma lâmina a fresco da amostra para verificar a sua concentração e motilidade - com base nestas informações, decide-se qual o volume de meio usado para fazer a separação por gradientes. Para uma amostra de valores de concentração e motilidade normais, o volume final preparado é de 1 mL, mas na eventualidade de a concentração ser baixa, poderá reduzir-se este volume para metade, ou mesmo para menos de metade.

Para um volume final de 1 mL, preparam-se gradientes de densidade de 80% e 40% que deverão ser misturadas num mesmo tubo, de modo que o gradiente de 80% esteja em posição inferior ao de 40%. Assim que a amostra estiver completamente liquefeita, a mesma é colocada na parte superior da coluna formada pelos dois gradientes, procedendo-se à sua centrifugação durante 25 minutos, a 1000rpm. Depois da amostra ser centrifugada, aspira-se o conteúdo do tubo, exceto o sedimento correspondente aos espermatozoides, que deverá ser transferido para um novo tubo para posterior lavagem com meio de cultura. No novo tubo, o sedimento será misturado

³ O meio usado como gradiente de separação é composto por pequenas partículas de sílica que permitem a seleção dos espermatozoides com melhor capacidade fecundante, separando-os de outras células de acordo com a sua densidade.

⁴ O meio utilizado para lavagem e *swim-up* contém todos os componentes, nomeadamente albumina sérica humana, glucose, frutose e uma combinação de antioxidantes, que permitem sustentar as funções dos espermatozoides e também dos ovócitos no momento da fecundação. Para além do seu uso no processamento da amostra seminal, o meio é também aplicado para as técnicas de processamento de gâmetas femininos, técnicas de fecundação e cultura embrionária.

com meio de lavagem, e centrifugado durante 10 minutos a 1000 rpm. Após a centrifugação, aspira-se de novo o sobrenadante, deixando, desta vez, apenas a porção do sedimento e um volume mínimo de meio acima do mesmo. A este sedimento será adicionado meio de cultura para que a amostra passe por um processo de *swim-up*. O volume adicionado irá depender da concentração de espermatozoides e da técnica que se irá utilizar.

Para fazer o *swim-up*, ou seja, a migração dos espermatozoides em meio de cultura, coloca-se o tubo com os espermatozoides preparados numa posição inclinada durante cerca de 30 minutos à temperatura ambiente.

Na eventualidade da amostra ter um volume bastante diminuído (hipospermia), ou uma concentração baixa, a centrifugação em gradiente de densidade não é feita, passando-se logo a um processo de lavagem com meio de cultura. Esse processo passa pela centrifugação, durante cerca de 13 min a 1000 rpm, da amostra juntamente com o meio. Após a centrifugação, rejeita-se o sobrenadante, e ao sedimento é adicionado meio para que se dê o *swim-up*.

1.2. Gâmetas femininos

A colheita e preparação dos gâmetas femininos inicia-se pelo processo de estimulação ovárica que permite induzir o desenvolvimento multifolicular, ao qual se procede a recolha dos ovócitos através de punção folicular.

1.2.1. Estimulação ovárica

A estimulação ovárica controlada trata-se de um processo complexo que permite induzir o desenvolvimento de múltiplos folículos ováricos, de forma que a partir de um ciclo ovárico se obtenha mais que do um ovócito maduro. O protocolo de estimulação ovárica deverá ser adaptado conforme as necessidades específicas de cada paciente, tendo em consideração aspetos como idade, reserva ovárica e historial clínico [143, 144]. A medição de parâmetros tais como a AMH e o número de folículos antrais serão cruciais para, respetivamente, discutir qual será a melhor abordagem de estimulação de forma a reduzir o risco de uma hiperestimulação, e para prever o número de ovócitos que serão recolhidos nesse ciclo de estimulação [143].

Um ciclo de estimulação ovárica baseia-se no pressuposto de que, num ciclo normal, apenas um folículo dominante irá subsistir e desenvolver-se completamente, devido ao facto de exibir uma maior sensibilidade ao FSH, cujos níveis começam a diminuir a meio da fase folicular. O principal objetivo de uma estimulação ovárica é, portanto, estender a duração do recrutamento folicular e, conseqüentemente, o desenvolvimento de

múltiplos folículos, e para isso, estaria em vista a administração exógena de estimuladores ovários [143]. De entre os vários tipos de estimuladores, aqueles cuja utilização é mais frequente são o citrato de clomifeno (CC), letrozole e gonadotrofinas, entre as quais preparações recombinantes de hormonas como a FSH, LH e hCG [145].

O CC e o letrozole são compostos orais normalmente utilizados para estimulações mais leves, podendo ser usados isoladamente ou em conjunto com gonadotrofinas [144]. O CC trata-se de um antagonista de estrogénio que se liga aos seus recetores intranucleares, impedindo que o estrogénio se ligue aos mesmos. Em resposta a um estado hipoestrogénico criado pela ligação aos recetores, o hipotálamo responde e aumenta a secreção de FSH e LH através do aumento da frequência de ação da GnRH. O CC é indicado para tratamentos de primeira linha, em situações de correção de disfunções ovulatórias, nomeadamente, em caso de SOP [146], infertilidade idiopática ou endometriose [147, 148].

O letrozole define-se como um inibidor de enzima aromatase, que exerce um papel crucial na biossíntese dos estrogénios [149]. A inibição desta enzima leva a uma diminuição dos níveis de estrogénio pelo bloqueio da produção dos mesmos, o que resulta num aumento de libertação de FSH pelo eixo hipotálamo-hipófise [146]. O letrozole, tal como CC, é indicado como um tratamento de primeira linha em casos de oligo/anovulação, SOP, endometriose, ou em casos de resistência ao CC e também em pacientes com cancro da mama [148]. O letrozole, no entanto, demonstra, em comparação com a utilização do CC, uma maior eficácia no tratamento de casos de SOP e maiores taxas de gravidez [150]. Esta superioridade em termos clínicos, aliada ao facto do letrozole não ter qualquer efeito prejudicial sobre o muco cervical ou o epitélio endometrial, ao contrário do CC [146, 151, 152], levou a que este substituísse o CC como a principal recomendação para tratamentos de primeira linha [150, 153, 154].

A administração de gonadotrofinas exógenas é indicada em casos de hipogonadismo hipogonadotrófico, disfunções hipotalâmicas ou hipofisárias, ou mesmo em situações de resistência ao CC [148]. Estes compostos injetáveis são integrantes dos protocolos de hiperestimulação ovária controlada (COH – *Controlled ovarian hyperstimulation*), sendo usados, usualmente, para ciclos de IVF ou ICSI [155], podendo também ser usados, como referido anteriormente, em conjunto com o letrozole em protocolos de estimulação mais leves. De entre os vários tipos de gonadotrofinas produzidas, as que são mais usadas para protocolos de hiperestimulação são a gonadotrofina menopáusica humana (hMG), a FSH e LH recombinantes (rFSH; rLH), e a hCG recombinante (rhCG) [144, 145, 156].

Um problema associado à administração destas gonadotrofinas é o aumento dos níveis de estradiol resultante do crescimento dos folículos, que levará à precipitação do surgimento do pico de LH. Para prevenir esta situação, opta-se por administrar um agonista ou antagonista de GnRH, que permitem provocar a dessensibilização da hipófise anterior, e consequentemente, suprimir a secreção de gonadotrofinas [143]. Esta supressão permite que haja como consequência a supressão da produção de hormonas esteroides sexuais e, portanto, a prevenção do surgimento do pico de LH que permite que se dê a ovulação [157]. Desta maneira, poderá controlar-se a altura da ovulação de forma a haja um maior número de folículos desenvolvidos [158]. O regime de supressão da hipófise é acompanhado pela indução de ovulação assim que o número de folículos seja adequado, assim como as suas dimensões.

Os agonistas ou antagonistas tratam-se de péptidos análogos de GnRH nos quais a estrutura original da GnRH foi alterada pela deleção ou substituição de um ou mais aminoácidos [159]. Os agonistas de GnRH (GnRH-a) caracterizam-se por um padrão bifásico de secreção de gonadotrofinas, sendo que o início da administração irá induzir uma libertação inicial de FSH e LH, seguindo-se da dessensibilização da hipófise que se caracteriza pela diminuição dos recetores de GnRH, levando a uma redução progressiva da síntese de gonadotrofinas que será mantida enquanto a administração do agonista se mantiver, e, consequentemente, enquanto os recetores continuarem ligados ao agonista [158]. Assim que se cessar esta administração, dá-se um período refratário onde não se observa a ação endógena de GnRH, sendo a duração deste período dependente da dose e formulação do agonista. A administração do agonista poderá ser feita sob a forma de um protocolo de longa duração ou de curta duração [159]. No protocolo de longa duração, a administração do agonista de GnRH inicia-se durante o meio da fase lútea do ciclo precedente [158]. Assim que a supressão hipofisária e, consequentemente, a regulação negativa da GnRH for confirmada por ecografia transvaginal, inicia-se a estimulação ovárica através de injeções de gonadotrofinas diárias. Deverá iniciar-se a monitorização ecográfica para avaliar o recrutamento e desenvolvimento folicular, e prever a posterior indução da ovulação. O protocolo de longa duração, apesar de ter sido o mais predominantemente usado durante muitos anos, mostrou ter algumas desvantagens nomeadamente em relação ao longo tempo de duração de tratamento, e um risco elevado de ocorrência de síndrome de hiperestimulação ovárica (SHO) [143]. Esta última trata-se de uma complicação iatrogénica que se caracteriza por um escapamento de fluido através da vasculatura dos ovários, em consequência da dilatação dos mesmos e do aumento da permeabilidade

vascular [143]. Com taxas de incidência entre os 0,2 e 1% [160], esta síndrome poderá ser de sintomatologia média ou severa, podendo mesmo, em casos críticos, levar a falência renal aguda ou coagulação intravascular, ambos casos fatais. O risco de desenvolvimento de SHO é amplificado em pacientes que apresentem uma resposta excessiva aos tratamentos de COH, sendo recomendada a adaptação do protocolo de estimulação nestes casos, optando-se, geralmente, por um protocolo de antagonistas em virtude do mesmo evidenciar um menor risco de desenvolvimento de SHO sem qualquer impacto sobre as taxas de gravidez [143].

O protocolo de curta duração prevê o início da administração do agonista no início da fase folicular, entre o 1º e 2º dia do ciclo menstrual, concomitante com o início das injeções de gonadotrofinas. Existem protocolos que poderão encurtar ainda mais o período de administração do agonista para 3 dias, sendo interrompido assim que a injeção de gonadotrofinas for introduzida.

Os antagonistas de GnRH diferenciam-se dos agonistas por causarem um efeito imediato e reversível da supressão hipofisária, sem haver um aumento inicial de libertação de FSH e LH, como acontece com os agonistas. O protocolo de antagonista começa pela administração das gonadotrofinas no início da fase folicular, sendo que ao 6º dia começa o antagonista, ou então, assim que o tamanho folicular atingir os 14 mm. As injeções gonadotróficas continuam até ao dia da indução da ovulação [143].

Assim que os folículos tenham atingido um tamanho aceitável, procede-se à indução da maturação dos mesmos através da administração de hCG, uma gonadotrofina que é semelhante à LH. Esta administração deverá ser feita 36 horas antes da punção folicular, permitindo que se dê a luteinização das células da granulosa e, conseqüentemente, a produção de progesterona, levando à reiniciação da maturação meiótica do ovócito. A hCG, por ter uma semivida mais longa que o LH, cria um efeito luteotrófico mais prolongado sobre as células dos ovários, contribuindo para a gênese da SHO [145].

1.2.2. Suporte da fase lútea

O suporte da fase lútea é, atualmente, imperativo num ciclo de tratamento com recurso a transferência de embriões a fresco [144]. A administração exógena da progesterona é o método mais adotado, havendo, no entanto, outras opções tais como o uso de hCG, agonistas de GnRH ou suplementação com estrogénio [161].

Esta suplementação na fase lútea é de extrema importância, derivado da insuficiência da produção de progesterona [162], em virtude do uso de medicação que

compromete o funcionamento do corpo lúteo e, portanto, a produção de progesterona. Este comprometimento está usualmente associado ao tipo de medicação usado, às doses administradas, que não deverão chegar a níveis suprafisiológicos [163], e também ao efeito prolongado que a medicação poderá ter mesmo após descontinuação do tratamento [164, 165].

Por estes motivos, a administração de progesterona é recomendada para suporte de fase lútea, devendo ser mantida, pelo menos, até ao dia da realização do teste de gravidez [161].

1.2.3. Punção folicular

A recolha dos ovócitos através de aspiração folicular do ovário é feita a partir da punção transvaginal folicular com recurso a controlo ecográfico. O procedimento consiste na introdução de uma agulha de aspiração numa sonda transvaginal, que posteriormente irá perfurar a parede do ovário de modo a aspirar o líquido folicular no qual se encontra os CCO. A agulha de aspiração encontra-se conectada a um sistema de vácuo que permite que se crie pressão negativa dentro das paredes foliculares, para garantir que todo o conteúdo folicular é aspirado [166]. Todo o processo é feito sob anestesia [167].

Todo o líquido folicular é aspirado para tubos de poliestireno dispostos num suporte metálico aquecido a 37°C. No final da punção, os tubos são transportados até ao laboratório de embriologia, onde serão observados para que se possa proceder à recolha dos ovócitos.

Numa bancada de fluxo laminar de superfície aquecida a 37°C, procede-se à pesquisa ovocitária, que consiste na observação do líquido folicular ao estereomicroscópio, e na identificação de qualquer ovócito ligado às células do *cumulus*. Todos os CCO passam por um processo de lavagem numa placa com meio tamponado⁵, para que se possa remover quaisquer fragmentos celulares e vestígios de sangue, e os mesmos serão posteriormente transferidos para uma placa com meio de cultura aquecido a 37°C. Os ovócitos são incubados numa estufa a 37°C, 5% O₂ e 6% CO₂.

1.2.3.1. Desnudação e avaliação da maturidade ovocitária

Os ovócitos recolhidos no líquido folicular são rodeados por células foliculares denominadas células do *cumulus* [168], que conseguem interagir com o ovócito de modo

⁵ O meio tamponado é composto por albumina sérica humana, aminoácidos, antibióticos e um conjunto de antioxidantes que permitem a manipulação segura de ovócitos e embriões fora de um ambiente controlado de uma incubadora, assegurando a manutenção dos níveis de pH e osmolaridade por um período de tempo razoável.

a providenciar-lhe nutrição e condições para que o mesmo amadureça até ao estado de MII [169, 170].

Ainda que a relação entre a competência de desenvolvimento embrionário e o aspeto morfológico do complexo das células do CCO não seja totalmente definida [171], este poderá ser indicativo do estado de maturação do ovócito. A avaliação do aspeto morfológico do CCO é feita pelo seu grau de expansão, estabelecendo-se uma categorização binomial que classifica como ovócitos maduros aqueles em que as células do *cumulus* se encontram expandidas e a coroa radiata difundida, e imaturos aqueles cujas células do *cumulus* estejam compactadas à volta do ovócito [171]. Este tipo de avaliação de maturidade não é, no entanto, a mais correta e padece de uma subjetividade e imprecisão inerentes à técnica, para além do facto de que a qualidade e o grau de expansão das células poderão também depender do tipo de protocolo de estimulação ovárico usado [172 – 176].

Uma observação direta da morfologia do ovócito, incluindo os seus componentes extracitoplasmáticos e intracitoplasmáticos [177], só será possível depois de o mesmo ter passado por um processo de desnudação, que consiste na remoção das camadas de células do *cumulus* [178]. Este processo geralmente aplica-se na preparação dos gâmetas femininos para casos de ICSI ou vitrificação de ovócitos, de modo a determinar quais os que apresentam maturidade ovocitária. O processo de desnudação de gâmetas femininos engloba métodos enzimáticos e mecânicos, os quais devem ser aplicados após um tempo de incubação mínimo de 3 horas [178], desde a sua colheita. Para a desnudação, deverá ser preparada uma placa para o efeito contendo pelo menos um poço com enzima hialuronidase, que será responsável por digerir os componentes da matriz das células do *cumulus*, e os restantes poços com meio tamponado, sendo todos os poços cobertos com óleo que irá prevenir a evaporação do meio e minimizar flutuações de osmolaridade e, conseqüentemente, pH. Esta placa é incubada entre 30 e 60 minutos a 37°C. Após este tempo, os ovócitos que foram previamente colocados nas placas de meio de cultura, são colocados na gota de enzima para que se proceda à remoção enzimática das células de *cumulus* que formam o complexo CCO. Para este efeito, os CCO são aspirados repetidamente durante 25 segundos, sendo logo de seguida transferidos para os poços com meio tamponado. É importante que o tempo de exposição à enzima seja devidamente respeitado de forma que não haja qualquer comprometimento do ovócito. Nos poços com meio tamponado, procede-se à desnudação mecânica através da repetição das aspirações sucessivas. É importante referir que no processo de desnudação mecânica são usadas pipetas de desnudação

de diâmetro apropriado, para que seja possível uma correta desnudação, que implica a remoção completa de vestígios celulares e de eventuais vestígios de enzima. Depois de o ovócito ser desnudado, poderá proceder-se à avaliação da sua maturidade nuclear através da sua observação num microscópio invertido.

A maturidade nuclear é confirmada pela presença do primeiro GP (Figura 17) no espaço perivitelino e pela ausência da vesícula germinativa (VG), que encapsula a cromatina dos ovócitos. Os ovócitos serão considerados como imaturos se a VG ainda estiver presente, ou então se se encontrarem na interrupção da primeira meiose (MI), em que não se observa a VG ou a extrusão do GP. Estes ovócitos poderão, eventualmente, sofrer maturação *in vitro*. Apenas os ovócitos que se considerem maduros é que serão vitrificados ou usados em ciclos de ICSI [168].



Figura 17. Ovócitos em diferentes estados de maturação conforme a fase meiótica. (A) Ovócito imaturo, com a vesícula germinal presente; (B) Ovócito imaturo em metáfase I, onde já não se observa vesícula germinal; (C) Ovócito maduro, em metáfase II, com desaparecimento da vesícula germinal e extrusão do 1º GP. Retirado de [190].

Os ovócitos deverão também ser avaliados quanto à sua morfologia e presença de anomalias intracitoplasmáticas ou extracitoplasmáticas (Figura 18), uma vez que para o ovócito ser completamente competente para posterior fecundação, o mesmo terá de atingir maturidade nuclear e citoplasmática [177]. Considera-se como ovócito normal aquele que apresente uma ZP nítida e redonda, um pequeno espaço perivitelino que inclua o primeiro GP não fragmentado, e um citoplasma que não apresente qualquer inclusão e seja apenas moderadamente granular [179 - 182]. Exemplos de anomalias intracitoplasmáticas serão a presença de vacúolos, granularidade citoplasmática aumentada, e agregados de retículo endoplasmático liso (AREL), enquanto anomalias extracitoplasmáticas incluem uma ZP anormal, espaço perivitelino de larga dimensão, GP fragmentado ou degenerado, e uma forma ovocitária irregular. Uma granularidade citoplasmática aumentada tem sido associada a uma fraca qualidade ovocitária e, consequentemente, a uma fraca qualidade embrionária [183, 184]. A presença de vacúolos

é também considerada uma característica possivelmente prejudicial para as taxas de fecundação, especialmente quando estes têm uma dimensão elevada ($> 14 \mu\text{m}$) [171, 185, 186]. Os AREL são considerados de alto risco, existindo a recomendação de que qualquer ovócito com esta característica seja eliminado do grupo de ovócitos que serão inseminados [171, 187].

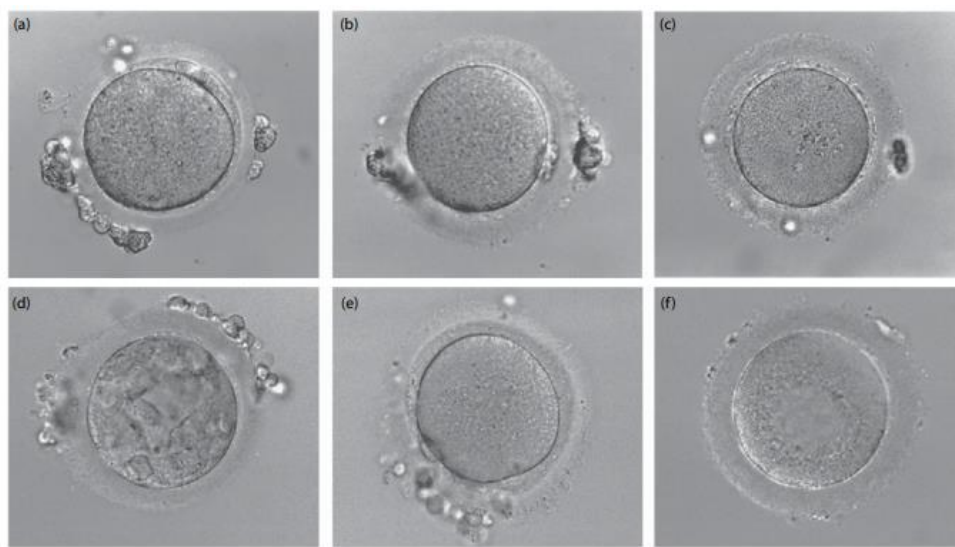


Figura 18. Ovócitos com anomalias morfológicas. (A) Espaço perivitelino granuloso; (B) Glóbulo polar fragmentado; (C) Espessamento e escurecimento da ZP; (D) Inclusões citoplasmáticas; (E) Espaço perivitelino alargado e granuloso; (F) Vacúolo citoplasmático de grandes dimensões. Retirado de [190].

Relativamente às anomalias extracitoplasmáticas, características como a cor e largura da ZP deverão ser tidas em conta na avaliação de um ovócito, assim como a largura do espaço perivitelino ou a presença de inclusões no mesmo, uma vez que poderão interferir seriamente com as taxas de fecundação e a morfologia dos PNs [171, 184]. A presença de um GP de grandes dimensões é consensualmente considerada como uma característica de risco num ovócito, uma vez que poderá ser indicativo de aneuploidia no ovócito [171]. A degeneração desse mesmo GP poderá também refletir uma assincronia entre a maturação nuclear e citoplasmática [188]. Um ovócito de formas irregulares ou de dimensões excessivas poderá, ainda que em rara ocasião, não ser adequado para posterior inseminação, uma vez que os mesmos poderão conter um conjunto extra de cromossomas e, portanto, dois fusos meióticos, gerando embriões com anomalias cromossômicas [189]. Todos estes parâmetros de maturidade e morfologia deverão ser avaliados uma vez que poderão facilitar posteriormente uma

análise das taxas de fecundação, do desenvolvimento embrionário e das taxas de sucesso do ciclo respetivo [190].

2. Procedimentos

2.1. Inseminação intrauterina (IIU)

A IIU trata-se de uma técnica de PMA de caráter pouco invasivo, considerando-se, portanto, de 1º linha, sendo usada, em maior parte dos casos, por casais de sexo diferente que possam, ou não, ter algum fator de infertilidade masculino [191]. Atualmente, este procedimento é também utilizado para casos onde é necessário recorrer a um dador, não por motivos de infertilidade, mas por se tratar de casos onde um casal de mulheres ou mulher solteira precisem de tal dádiva.

O principal objetivo deste tratamento consiste em aumentar as probabilidades de conceção através do aumento do número máximo de espermatozoides que atingem o local de fecundação [192, 193], mas também ultrapassar algum tipo de fator cervical que porventura impeça uma conceção espontânea. Desde a introdução do tratamento em 1962 [194], tem-se observado uma rápida evolução do mesmo em virtude do aperfeiçoamento de técnicas de preparação de amostras de espermatozoides [195], permitindo potenciar a capacidade fecundante dos espermatozoides [196].

A IIU é geralmente indicada para casos de infertilidade idiopática, problemas de endometriose ligeiros, ou em casos de fator masculino que requeiram o uso de amostra de dador [191, 192, 197], não sendo recomendada em casos severos como atresia cervical, endometrite, obstrução tubar bilateral ou amenorreia severa [192].

Existem potenciais fatores que poderão servir como prognóstico do tratamento, nomeadamente a causa de infertilidade, a idade da mulher, a qualidade espermática e duração de infertilidade [191]. Sabe-se que, por exemplo, em relação às causas de infertilidade, um fator masculino agravado ou um caso de endometriose terão maiores complicações do que problemas de anovulação [198, 199]. A idade feminina é também um importante fator devido ao notável decréscimo da fertilidade com a idade que irá, inevitavelmente, influenciar o sucesso de um tratamento de PMA [200, 201]. Relativamente à qualidade espermática, apesar de não haver um consenso acerca de um número limite estabelecido, recomenda-se que, para um procedimento de IIU, o número de espermatozoides com motilidade progressiva seja igual ou superior a 1 milhão, de forma a garantir uma maior probabilidade de conceção [196, 202, 203].

Um tratamento por IIU poderá ser feito com ou sem recurso a um ciclo de estimulação ovárica, que permitirá induzir o desenvolvimento folicular e assim aumentar o número de ovócitos disponível para fecundação, levando a um aumento na probabilidade de conceção [197]. A abordagem por ciclo natural está normalmente associada a baixas taxas de sucesso e poderá não ser a mais indicada em mulheres que tenham uma disfunção ovulatória. No caso de se optar por esta abordagem, a paciente recebe instruções para antecipar o dia da ovulação através de um teste de urina. No caso de se optar por um ciclo com estimulação ovárica, o CC ou o letrozole poderão ser duas alternativas de indução ovulatória, que poderão, no entanto, ser substituídas por uma terapêutica mais forte, por exemplo, administração exógena de gonadotrofinas, que são especialmente recomendadas em mulheres com mais de 35 anos, que, à partida, exibem uma menor reserva ovárica e que, portanto, precisarão de uma indução mais forte [197]. Poderá ainda ser adicionado ao plano de estimulação um antagonista de GnRH que permite prevenir um pico prematuro de LH, tendo esta opção já demonstrado taxas de sucesso promissoras [204 - 206].

2.1.1. Procedimento

A amostra de espermatozoides é processada no dia da inseminação através do método usual de separação por gradientes de densidade e posterior lavagem com meio de cultura, tal como descrito na secção 1.1.2.2. Esta preparação permite que se remova o plasma seminal de modo a evitar contrações uterinas induzidas pelas prostaglandinas características da sua composição [192], para além de permitir a remoção de toxinas ou bactérias que possam levar a infeções pélvicas [195].

Para realizar a inseminação, a paciente é monitorizada continuamente através de ecografias transvaginais de forma a acompanhar o desenvolvimento folicular. Assim que os folículos atingem um tamanho específico (18 mm), é administrado o indutor da ovulação, a hCG, e a inseminação é feita 36 horas depois.

A inseminação inicia-se com uma rápida avaliação e limpeza do cérvix. A amostra de espermatozoides é colocada dentro de um cateter de inseminação, e o mesmo é inserido na cavidade uterina através do canal cervical. O procedimento não deverá causar quaisquer complicações e a paciente poderá retomar a sua atividade normal. Duas semanas após inseminação, a paciente deverá realizar um teste de gravidez urinário para confirmar, ou não, a ocorrência de gravidez bioquímica. Caso seja confirmada, procede-se à realização de uma ecografia abdominal para verificação da presença de saco gestacional uterino, assumindo-se gravidez clínica.

Apesar de ser um procedimento que, em comparação aos restantes, envolve menos despesas e complicações, este poderá não ter as mesmas taxas de sucesso do que, por exemplo, um ciclo de FIV ou ICSI [191, 197]. A IIU deverá ser então substituída por tratamento com FIV em casos onde os fatores femininos sejam agravados, e também em virtude de resultados de ciclos anteriores de IIU e da resposta ovárica da paciente [191]. A duração prolongada da infertilidade poderá também levar a que se opte por recorrer a FIV ou mesmo a ICSI, de modo a evitar insucessos recorrentes do tratamento com IIU [207, 208].

2.2. Fertilização *in vitro* (FIV)

A FIV é a técnica de PMA mais amplamente utilizada no mundo, tendo sido pioneira no tratamento da infertilidade, nomeadamente em casos de fator feminino [209]. O primeiro nascimento resultante da aplicação de um tratamento de FIV foi o de Louise Brown, em 1978 [210], marcando o início de um progresso contínuo nas tecnologias de PMA, cuja eficácia tem melhorado significativamente desde então [211].

A técnica em si consiste na união dos gametas femininos e masculinos em meio de cultura apropriado para promover a fecundação do ovócito pelo espermatozoide. O(s) embrião(ões) que resultar(em) deste processo será(ão) posteriormente transferido(s) para o útero da paciente.

Apesar de, inicialmente, a FIV ter sido criada para tratamento de infertilidade devido a fator tubar [210, 212], atualmente é empregue em muitos outros fatores causadores de infertilidade tais como a endometriose, infertilidade idiopática, baixa reserva ovárica ou disfunção ovulatória que implique doação de ovócitos [209]. Relativamente aos fatores masculinos, para um procedimento de FIV, recomenda-se que sejam entre moderados a graves, estabelecendo-se um limite mínimo de 0,2 milhões de espermatozoides com motilidade progressiva, e uma percentagem de espermatozoides morfolologicamente normais igual ou superior a 5% [213].

2.2.1. Procedimento

O procedimento da FIV envolve várias etapas, começando pela estimulação ovárica da paciente, que resultará na recolha dos ovócitos que serão posteriormente inseminados. Para um ciclo de FIV, geralmente a estimulação ovárica é feita com recurso à administração exógena de gonadotrofinas para desenvolvimento folicular, em conjunto com análogos da hormona GnRH que irão permitir suprimir o pico de LH procedente ao desenvolvimento dos folículos. A administração da injeção de hCG para

permitir a indução da ovulação é feita assim que um número considerável de folículos tenham atingido um tamanho ideal [209].

Os CCO são recolhidos através de punção folicular 36 horas após administração da hCG, e os mesmos são mantidos em meio de cultura a 37°C numa atmosfera de 6% CO₂ e 5% O₂ até que os mesmos possam ser inseminados *in vitro* com os espermatozoides.

Depois da colheita da amostra seminal, a mesma é processada através do método usual de separação por gradientes de densidade e posterior lavagem com meio de cultura, tal como descrito na secção 1.1.2.2. Cerca de 5 horas após a colocação dos ovócitos na estufa, os mesmos são inseminados com a amostra de espermatozoides previamente preparada. O volume de espermatozoides inseminado irá depender da concentração da amostra, tendo, portanto, que ser previamente estimado para que cada um dos poços inseminados tenha aproximadamente uma concentração de espermatozoides de 1 x 10⁵ /mL. Para isso, é feita uma contagem do número de espermatozoides (*N*) numa alíquota de 10 µL, com recurso a câmara de *Neubauer*, contando-se 5 quadrados. O volume é calculado através da seguinte fórmula:

$$\text{Volume da amostra} = \frac{1}{N} \times 1000$$

O processo de inseminação, feito sob estereomicroscópio e numa bancada de superfície aquecida, consiste na junção física de ambos os gâmetas masculinos e femininos, numa placa com meio de cultura. As placas de cultura deverão ser observadas ao microscópio para verificar a concentração de espermatozoides móveis, que deverá ser suficiente para garantir uma fecundação, não excedendo os limites razoáveis. Os ovócitos são posteriormente incubados a uma temperatura de 37°C, 6% CO₂ e 5% O₂ [209].

A verificação da fecundação é feita 17 ± 1 horas após inseminação através da avaliação da presença dos dois PNs, feminino e masculino, e pela extrusão do 2º GP. Para que seja feita esta mesma verificação, é necessário que se proceda à desnudação prévia dos ovócitos, que implica a remoção das células do *cumulus*. Esta desnudação trata-se apenas de um processo mecânico, consistindo na pipetagem sucessiva dos ovócitos, uma vez que maior parte das células já sofreram dispersão pela atividade dos espermatozoides.

Os ovócitos fecundados são colocados numa placa com meio de cultura apropriado para incubação⁶, e os mesmos são colocados no sistema time-lapse, onde é possível fazer a monitorização dos embriões ao longo dos dias de cultura. O processo finda com a transferência dos embriões a fresco, ou criopreservação dos mesmos para serem transferidos num ciclo desfasado.

2.3. Injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)

2.3.1. Antecedentes da ICSI

O desenvolvimento da técnica de ICSI surgiu de outras três técnicas de micromanipulação que, ainda que partilhassem a mesma finalidade, não tiveram o mesmo sucesso de aplicação. Todas estas técnicas tinham o objetivo comum de facilitar a passagem do espermatozoide através da ZP.

A primeira técnica, designada por *zona drilling* (ZD), permitia que se criasse uma abertura na ZP, através da utilização do tampão ácido de *Tyrode*, para que os espermatozoides pudessem interagir diretamente com o citoplasma do ovócito. O insucesso da técnica deveu-se ao aumento da degeneração dos ovócitos provocada pelo meio acídico usado e também a um aumento na taxa de polispermia [214, 215]. A segunda técnica, intitulada de disseção parcial da ZP (PZD), consiste, tal como o nome indica, na realização de uma pequena abertura da ZP através de meios mecânicos e na colocação do ovócito numa suspensão de espermatozoides [216]. Esta técnica, no entanto, não permitiu ultrapassar o problema do aumento das taxas de polispermia [217], e, portanto, desenvolveu-se uma terceira técnica denominada inseminação subzonal (SUZI) [218], na qual alguns espermatozoides eram inseridos, com recurso a uma micropipeta, no espaço perivitelino dos ovócitos. Este procedimento levou a que se comesçassem a fazer experimentos envolvendo a injeção direta do espermatozoide no ovócito, e a partir daí, o surgimento da ICSI.

A ICSI surgiu como uma técnica alternativa à FIV para dar resposta a casos em que os parâmetros espermáticos, nomeadamente morfologia e motilidade, pudessem comprometer a taxa de fecundação dos ciclos de FIV, precisamente por não refletirem uma boa qualidade espermática [219]. Os primeiros casos de nascimentos frutos de ciclo de ICSI foram reportados em 1992 [220], e desde então, o número de ciclos que recorreram a ICSI tem mais que duplicado, tendo já ultrapassado a aplicação da técnica tradicional de FIV [211, 23, 221]. O facto de esta técnica poder atingir altas taxas de

⁶ Este meio de incubação trata-se de um meio tamponado bicarbonado composto por ácido hialurónico e albumina sérica humana, especificamente para uso em time-lapse, permitindo a cultura contínua dos embriões.

fecundação e de gravidez, independentemente das características dos espermatozoides usados, fez com que a mesma fosse considerada como o procedimento de micromanipulação com maior capacidade de tratamento de fator masculino [222]. Sendo assim, a realização da ICSI será aconselhada como tratamento em casos de oligozoospermia (menos de 5 milhões de espermatozoides móveis), astenozoospermia (menos de 5% de motilidade progressiva), teratozoospermia (menos de 4% de espermatozoides de morfologia normal) e azoospermia. Neste último caso, os espermatozoides poderão eventualmente ter de ser recolhidos através da realização de biópsia testicular [223]. A técnica de ICSI é assim indicada principalmente em casos de fator masculino moderado a grave, mas também em casos de uso de ovócitos criopreservados, falha de fertilização em ciclos anteriores de FIV, ou em ciclos em que os embriões resultantes serão testados para anomalias genéticas por teste genético pré-implantação (PGT), isto para evitar contaminação na ZP por parte dos espermatozoides.

2.3.2. Equipamento de micromanipulação

A micromanipulação de gâmetas, por ser um processo reduzido ao nível microscópico, deverá ser dotado de um alto nível de rigor e precisão. Para isso, é crucial que se proceda à instalação de um sistema de micromanipulação adequado, composto por um microscópio invertido de alta magnificação equipado com micromanipuladores que permitam ao operador manipular os gâmetas com refinamento [224]. O microscópio inclui também dois suportes para as pipetas de microinjeção e de sustentação. A pipeta de sustentação, ou *holding*, permite fixar o ovócito para que a pipeta de microinjeção insira o espermatozoide aspirado no seu interior. Ambas as extremidades das pipetas são inclinadas a um ângulo de 30° para que as mesmas estejam paralelamente posicionadas à placa no momento de microinjeção [219]. O microscópio invertido deverá incluir objetivas de magnificação de 10x, 20x e 40x, e um sistema ótico de contraste de modulação de *Hoffman*, que permite visualizar as células dispostas nas placas de microinjeção de plástico [225]. Dada a sensibilidade dos ovócitos à descida da sua temperatura considerada ideal, o microscópio deverá ser equipado com uma platina de aquecimento para assegurar que a microinjeção é realizada a uma temperatura constante de 37°C [226].

O sistema de micromanipulação é composto por dois conjuntos idênticos de micromanipuladores, responsáveis pelo controlo individual das pipetas de microinjeção e de sustentação. Um dos conjuntos permite o controlo mecânico das pipetas, controlando o posicionamento das mesmas e o seu movimento tridimensional [226], e o

segundo conjunto de micromanipuladores trata-se de um sistema de manipulação que garante a realização de movimentos delicados por recurso a controlo hidráulico através do uso de um *joystick* [226]. Cada um dos conjuntos de micromanipuladores é complementado por um sistema de microinjetores que permitem a aspiração/libertação e a injeção controlada dos ovócitos e espermatozoide, respetivamente [224, 227]. Este sistema, composto por uma seringa de vidro e um tubo de *Teflon* flexível que o liga ao suporte das micropipetas [226], é todo ele preenchido por óleo mineral, cujo fluxo é controlado por um micrómetro [227], sendo importante evitar a criação de bolhas de ar dentro do mesmo [226].

A instalação de todos os componentes deverá ser feita num ambiente apropriado e devidamente controlado, nomeadamente no que toca ao controlo de vibrações que poderão interferir com o procedimento da microinjeção, mas também em relação à manutenção da temperatura e humidade [224, 225].

2.3.3. Procedimento

O procedimento de ICSI consiste na microinjeção de um espermatozoide diretamente no citoplasma do ovócito, ultrapassando a barreira da ZP.

Todo o processo que leva à recolha dos gâmetas femininos é idêntico ao da FIV convencional, podendo-se alterar o protocolo de estimulação ovárica consoante as características de cada paciente e finalidade do tratamento. A preparação dos gâmetas femininos envolve a desnudação enzimática e química das células do *cumulus* que envolvem o ovócito, tal como descrito na secção 1.2.3.1. De entre todos os ovócitos desnudados, apenas aqueles que apresentarem maturidade nuclear serão microinjetados.

A recolha dos gâmetas masculinos geralmente é feita pelo modo convencional, com recurso a masturbação, ou por biópsia testicular, em caso de azoospermia não obstrutiva. O processamento dos espermatozoides é feito tal como nos procedimentos anteriores, permitindo a seleção dos melhores espermatozoides, *i.e.*, aqueles que, dentro do possível tenham os melhores valores de motilidade e morfologia.

Cerca de 30 minutos antes de se iniciar o procedimento, é preparada a placa de microinjeção onde serão colocados os ovócitos desnudados e a suspensão de espermatozoides. Nesta placa são colocadas pequenas gotas de meio tamponado, previamente aquecido a 37°C, onde serão posteriormente colocados os ovócitos, e também duas gotas ovais de meio onde serão colocados os espermatozoides. Este último meio tem na sua composição albumina humana recombinante e PVP

(polivinilpirrolidona), responsável por dar viscosidade ao meio e assim facilitar a imobilização do espermatozoide e posterior injeção do mesmo no ovócito [219, 228]. Esta placa é coberta de imediato com óleo, de modo a isolar o ambiente e manter as condições de temperatura e osmolaridade adequadas para micromanipulação dos gâmetas. Momentos antes da injeção, os espermatozoides são colocados na gota de PVP mais à esquerda para que se proceda à seleção dos melhores espermatozoides. A viscosidade característica do meio com PVP permite desacelerar o espermatozoide para que se facilite a avaliação morfológica do mesmo [219]. Nas gotas de meio tamponado são colocados os ovócitos desnudados.

A placa de microinjeção é colocada na platina do microscópio e em seguida, alinham-se as duas pipetas de maneira que estejam ambas paralelas à placa de microinjeção [225]. Com a placa de microinjeção no microscópio, procede-se à focagem da pipeta de sustentação e de microinjeção e à aspiração do meio tamponado e de meio PVP, respetivamente. O procedimento da microinjeção inicia-se pela seleção do espermatozoide e imobilização do mesmo. Ao aspirar o espermatozoide com a melhor aparência em termos de morfologia e motilidade, o mesmo é colocado na gota de meio PVP sem espermatozoides para que se proceda à quebra da sua cauda, um processo que irá permitir imobilizá-lo e simultaneamente permeabilizar a membrana plasmática, resultando posteriormente na ativação do ovócito [229-231]. Na prática, esta quebra da cauda resulta da compressão exercida pela pipeta de microinjeção contra a placa, finalizando-se o processo com um movimento brusco que induz o corte [227]. Assim que o espermatozoide evidenciar imobilidade, o mesmo é aspirado pela cauda, e procede-se à deslocação da platina até à gota de meio tamponado com o ovócito que será microinjetado. Previamente à injeção do espermatozoide no ovócito, este último deverá ser estrategicamente reposicionado até que o GP esteja às 6 ou 12 horas e perpendicular em relação à pipeta de microinjeção [226], de maneira a evitar dano do fuso meiótico no momento da injeção. Assim que se assegura o posicionamento do ovócito, aplica-se uma ligeira sucção sobre o mesmo de maneira a fixar o ovócito, e aproxima-se a pipeta de microinjeção da ZP, com o espermatozoide na ponta da pipeta. Com a ajuda do micromanipulador, a pipeta de microinjeção é empurrada e perfura a ZP e a membrana citoplasmática do ovócito no plano equatorial do ovócito, exatamente às 3 horas (Figura 19). No momento da perfuração do ovócito, aspira-se um pouco de citoplasma do ovócito e este deverá evidenciar, idealmente, uma aceleração brusca dentro da pipeta de microinjeção, fenómeno indicativo da rutura da membrana [227]. A aspiração deverá ser imediatamente cessada, e de seguida rejeita-se o espermatozoide

juntamente com o conteúdo citoplasmático aspirado, até que o mesmo fique completamente envolvido no citoplasma do ovócito. Esta aspiração do citoplasma irá funcionar como um estímulo para a ativação do ovócito [219]. Finalmente, retira-se, lentamente, a pipeta de microinjeção e liberta-se o ovócito da pipeta de sustentação.

Após a microinjeção de todos os ovócitos, os mesmos são colocados na placa de cultura, sendo previamente lavados em poços com meio de cultura. A placa de cultura é colocada no sistema time-lapse para que se proceda à monitorização da fecundação e desenvolvimento embrionário.



Figura 19. Representação do procedimento de microinjeção, observando-se a entrada da micropipeta de microinjeção, a deposição do espermatozoide no interior do citoplasma do ovócito, e a posterior retirada da micropipeta. Retirado de [219].

2.4. Cultura embrionária

O cultivo dos embriões *in vitro*, *i.e.*, a cultura embrionária, tem como principal objetivo manter os embriões em condições de cultura estáveis e análogas à de um ambiente *in vivo*, ou seja, do aparelho reprodutor feminino. Deste modo, parâmetros como a temperatura, composição e qualidade do ar e das estufas, composição do meio de cultura e tipo de materiais usados, deverão ser extensivamente controlados e otimizados de maneira a proporcionar um ambiente propício ao desenvolvimento dos embriões.

2.4.1. Condições de cultura

Os embriões deverão ser cultivados em estufas capazes de controlar variáveis tais como a temperatura, pH, osmolaridade, concentrações de gases e humidade, uma vez que as suas flutuações poderão comprometer severamente o desenvolvimento dos embriões [232]. A temperatura à qual os embriões são expostos constitui um dos fatores mais importantes e, como tal, deverá ser minuciosamente controlada de forma a manter-se nos 37°C [233]. A manutenção de níveis apropriados de humidade nas estufas é crucial para que a osmolaridade se mantenha entre níveis adequados, nomeadamente,

entre 270 e 290 mOsm [234]. Assim como a humidade, também o pH irá influenciar a osmolaridade, e este poderá variar conforme as concentrações de gases na estufa, mais especificamente, as concentrações de CO₂, que deverão rondar os 6% [232, 235]. Em relação aos níveis de oxigénio, estes deverão rondar os 5% [236], mimetizando assim o intervalo de valores característico do trato reprodutivo feminino [237]. Os embriões não deverão ser expostos às mesmas tensões de oxigénio atmosféricas por longos períodos de tempo, correndo o risco de comprometer a integridade do genoma e o seu metabolismo [238-240], em consequência de uma produção aumentada de EROS [241]. A qualidade do ar que circula nos laboratórios é igualmente de extrema importância, nomeadamente, devido à possível presença de compostos orgânicos voláteis que, perturbando gravemente a cultura *in vitro*, deverão ser eliminados através da instalação de filtros [242].

O tipo de meio de cultura empregue influencia grandemente o desenvolvimento dos embriões e, conseqüentemente, as suas taxas de implantação e gravidez. A definição da composição ótima de um meio de cultura baseia-se no pressuposto que esse mesmo meio deverá ser o mais análogo possível com o ambiente *in vivo* que o embrião enfrentaria entre as trompas e o útero [233, 243]. Face a estas condições, foram criadas a cultura sequencial e a cultura contínua, ou monocultura. A cultura sequencial baseia-se no uso de um meio que tem uma composição nutricional especificamente adaptada às necessidades do embrião ao longo do seu desenvolvimento, sendo que até à compactação, o embrião tem preferência pelo piruvato como fonte de energia, e, à medida que se vai aproximando da fase de blastocisto, exibe um maior consumo de oxigénio e a glicose torna-se a sua fonte preferencial de energia. Posto isto, o embrião é transferido entre meios de cultura ao 3º dia de desenvolvimento embrionário [244].

O facto de o embrião precisar de ser transferido entre meios e, conseqüentemente, ser exposto a flutuações ambientais, levou a que se criasse um meio de cultura que pudesse ser mantido continuamente durante todo o processo de desenvolvimento embrionário, até à fase de blastocisto. Este meio contínuo consiste, portanto, no fornecimento de todos os nutrientes dos quais os embriões poderão beneficiar, permitindo que os mesmos os metabolizem conforme sua necessidade [245, 246].

Apesar de a superioridade de um dos meios não ser nitidamente comprovada em termos de resultados clínicos, é inegável que a minimização da disrupção das condições de cultura com o uso do meio contínuo seja altamente benéfica para a

diminuição do stress provocado nos embriões com as alterações exigidas quando se usa um meio sequencial [247].

Estes meios de cultura têm, na sua composição, componentes como fatores de crescimento peptídicos, aminoácidos, suplementos séricos, antibióticos, antioxidantes, substratos energéticos, vitaminas e outros elementos, todos com concentrações não definidas [248, 249]. A albumina sérica humana é uma das fontes proteicas mais comumente usada nos meios de cultura, sendo uma fonte de hormonas, energia e vitaminas.

2.4.2. Avaliação morfológica

Com a implementação de um sistema de cultura embrionário altamente controlado, tornou-se possível selecionar, de entre todos os embriões cultivados, aquele com maior potencial de implantação, possibilitando assim a transferência de um único embrião, de forma a evitar uma gravidez múltipla e as complicações que a mesma poderá trazer [250]. A seleção deste embrião baseia-se na avaliação dos seus parâmetros morfológicos e da qualidade do seu desenvolvimento.

Em 2011, foi apresentado um documento que propunha um sistema de classificação embrionário que pudesse ser implementado internacionalmente de modo a uniformizar ao máximo as terminologias de classificação de ovócitos, zigotos e embriões. Este sistema de classificação inclui pontos importantes tais como os *timings* de avaliação de fenómenos como a fecundação, singamia, clivagem, compactação e formação do blastocisto, e ainda os critérios de classificação embrionária ao nível morfológico.

2.4.2.1. Avaliação da fecundação

A classificação embrionária inicia-se precisamente pela avaliação da fecundação nos ovócitos inseminados. Esta avaliação deverá ser feita cerca de 17 ± 1 horas após a inseminação, tendo em consideração que, caso os ovócitos tenham sido inseminados com recurso a FIV, estes irão exibir um atraso na fecundação em relação aos ovócitos inseminados com recurso a ICSI [251], atraso este atribuído ao facto de os espermatozoides necessitarem de ultrapassar autonomamente as células do CCO e ZP [252].

O evento da fecundação, que se inicia com a entrada do espermatozoide no ovócito, culmina com a formação de uma nova membrana nuclear que envolve ambos os núcleos do espermatozoide e do ovócito, formando o PN masculino e feminino,

respetivamente [253]. A formação dos PNs é acompanhada pela extrusão do 2º GP, que confirma a finalização do processo meiótico do ovócito [252]. Ambos os PNs, através de movimentos rotativos, posicionam-se um junto do outro, no centro do ovócito, enquanto se dá simultaneamente a diferenciação dos corpos precursores de nucléolos (CPN). Os últimos são locais ativos de síntese de rRNA, que será utilizado nos processos de tradução inerentes à ativação do genoma embrionário [254].

A avaliação da fecundação é feita, desta forma, pela confirmação da presença do PN feminino e masculino e ainda pela extrusão do 2º GP (Figura 20). O posicionamento dos PNs, assim como a localização e simetria são aspetos importantes na avaliação de um zigoto, e preditivos do desenvolvimento embrionário [10]. Como tal, um zigoto deverá ter ambos os PNs centralmente posicionados e alinhados pelo seu eixo central em relação ao 2º GP, controlando assim o plano da primeira divisão mitótica [255 – 257]. Caso contrário, o zigoto possivelmente apresentará anomalias de clivagem que poderão comprometer a qualidade embrionária futura.



Figura 20. Ovócito com dois PNs visíveis e dois glóbulos polares no espaço perivitelino. Retirado de [479].

Os PNs são ainda avaliados quanto ao número e tamanho. Idealmente, deverão estar presentes 2 PNs, no entanto, a presença de apenas um PN poderá dever-se simplesmente a uma assincronia na formação ou à fusão dos mesmos, podendo assim o zigoto ser diploide e apresentar dois corpos polares, apesar da anormalidade nos PNs [257, 258]. Zigotos 3PN poderão dever-se a casos de triploidia disgénica, em que não se observa a extrusão do 2º GP [257, 259], ou então à incapacidade de inibição de polispermia, levando à entrada de 2 espermatozoides no ovócito [257]. Estas anomalias deverão ser tidas em conta no momento da transferência do embrião, uma vez que a sua transferência poderá resultar numa gravidez inviável [252, 260]. Assimetrias em

relação ao tamanho dos PNs poderão ser indicativas de uma possível aneuploidia ou de uma paragem no desenvolvimento embrionário [257].

Tal como os PNs, também os CPN são avaliados quanto à simetria de número, tamanho e padrão de distribuição entre os PNs [10, 171]. Com base nisto, foi proposta uma classificação baseada no antigo sistema *Z-scoring* (Figura 21) [261], que combinava a avaliação da orientação dos PNs com o padrão de distribuição dos CPN. Este sistema de classificação classifica como simétricos os PNs que exibam uma morfologia idêntica à categoria Z1 e Z2 do sistema *Z-scoring*, ou seja, PNs com CPN em igual número, alinhados ou não, respetivamente. Consideram-se como não simétricos aqueles que tenham outros tipos de distribuições, e anormais os PNs que apresentem ausência parcial ou total dos CPN [171, 257]. Esta avaliação deverá, no entanto, ter sempre em conta o método de inseminação usado e as características da paciente, devido às diferenças temporais que existem e à influência da idade sobre a qualidade ovocitária, respetivamente [257]. Qualquer assimetria reportada em número ou padrão de distribuição poderá ter influência no desenvolvimento posterior do embrião, nomeadamente, devido a anomalias cromossômicas [262 – 264].

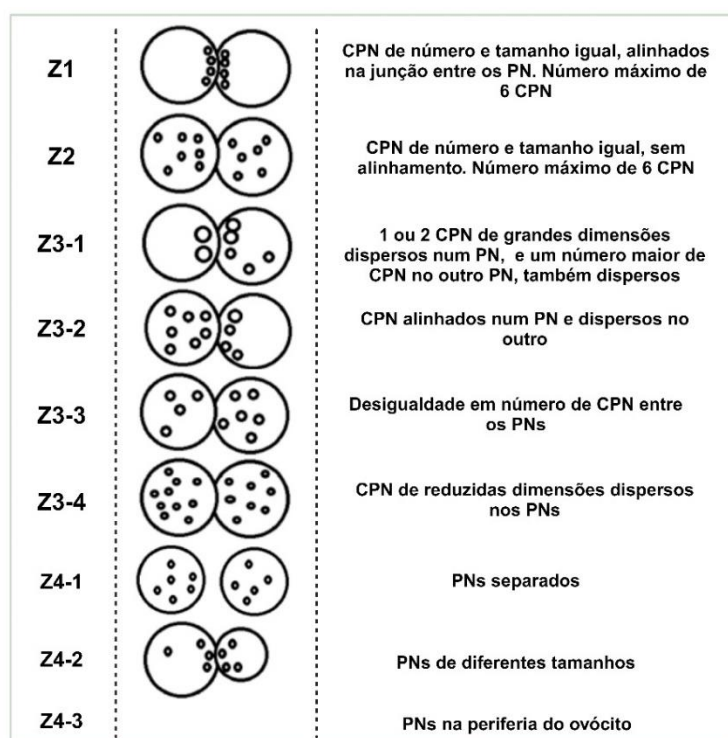


Figura 21. Representação esquemática do sistema de classificação *Z-scoring*, que combina a avaliação da orientação dos PNs com o padrão de distribuição dos CPN. Adaptado de [261].

O citoplasma dos zigotos é também avaliado de forma a identificar quaisquer anomalias que possam impor um risco ao desenvolvimento embrionário, nomeadamente a presença de vacúolos de grandes dimensões ($> 14 \mu\text{m}$), AREL e agregados de organelos [171]. Contrariamente, a presença de um halo cortical (zona cortical transparente), que se desenvolve a partir dos movimentos rotativos que posicionam os PNs, é correlacionada com uma melhor qualidade embrionária, aumento da formação de blastocistos e taxa de gravidez [265, 266]. A granulosidade do citoplasma é também avaliada conforme o diâmetro e profundidade das áreas mais granulares, que irá ditar a severidade da anomalia.

Poderá ainda ser feita uma segunda avaliação do ovócito recentemente fecundado no 1º dia (26 ± 1 após ICSI ou 28 ± 1 após FIV) para avaliar singamia dos PNs ou uma possível clivagem precoce [171], clivagem esta que está relacionada com altas taxas de formação de blastocistos [267], de implantação [268] e de gravidez [269, 270]. A singamia envolve a degradação das membranas de ambos os PNs de forma que haja fusão entre os dois conjuntos de genomas haploides. A partir daqui, dá-se a primeira divisão mitótica (Figura 22) [253].



Figura 22. Primeira divisão mitótica do zigoto. Retirado de [479].

2.4.2.2. Avaliação em fase de clivagem

A avaliação ao 2º e 3º dia ($44 \pm 1\text{h}$ e $68 \pm 1\text{h}$), ou seja, na fase de clivagem, deverá compreender parâmetros como o número de células, nível de fragmentação e multinucleação, e tamanho dos blastómeros [171]. Para que um embrião seja considerado de mínima qualidade, o mesmo deverá ter o número de células apropriado ao seu nível de desenvolvimento, isto é, um embrião de 2º dia deverá ter idealmente 4 células, dispostas sob a forma de um tetraedro, e um embrião de 3º dia deverá ter 8 células (Figura 23).



Figura 23. Embrião ao 2º e 3º dia de desenvolvimento, apresentando, respetivamente, 4 e 8 células. Retirado de [479].

Qualquer embrião que evidencie um atraso de clivagem em relação seu período de desenvolvimento, não terá um grande potencial de implantação e, como tal, não será considerado um embrião de boa qualidade. O mesmo acontece em embriões que tenham uma taxa de divisão anormalmente acelerada.

Assim como o número, também o tamanho das células deverá ser equivalente entre si na grande maioria das células, e apropriado ao período de desenvolvimento [171], uma vez que uma divisão irregular poderá resultar numa distribuição desigual de conteúdos citoplasmáticos essenciais para manter a viabilidade do embrião [271, 272]. Como tal, um embrião que apresente um número de células que não 2, 4 e 8 ao 1º, 2º e 3º dia, respetivamente, deverá ter blastómeros de diferentes tamanhos, justificada por uma assincronia na divisão de 1 ou mais blastómeros [273]. Se isso não se verificar, considera-se que esses embriões terão uma distribuição desigual de proteínas, mRNA e outros organelos [262, 274, 275].

O nível de fragmentação corresponde ao nível de ocupação de estruturas citoplasmáticas anucleadas inferiores a 45 μm e 40 μm , provenientes de blastómeros em embriões de 2º e 3º dia, respetivamente. Desta forma, um embrião é considerado de boa qualidade se o nível de fragmentação for baixo o suficiente para que não cause qualquer impacto significativo, isto é, se for abaixo de 10% [276]. Se esse nível for entre 10 e 25%, ou acima de 25%, o embrião já terá uma classificação média ou fraca, respetivamente, uma vez que poderá comprometer as interações entre células e processos como a compactação e cavitação [264]. Embriões com altos níveis de fragmentação são propensos a apresentar um alto risco de anomalias cromossómicas [259, 277 – 280].

A evidência de multinucleação nos blastómeros é outro aspeto a ser avaliado uma vez que a presença de mais do que um núcleo nos blastómeros poderá estar associado a um alto risco de anomalias cromossómicas e a um baixo potencial de implantação e, conseqüentemente, a risco de aborto espontâneo [271, 281].

Os embriões em estado de clivagem são agrupados em três níveis diferentes de avaliação dependendo da descrição destes três diferentes parâmetros, fragmentação, multinucleação e tamanho e número de células. O embrião ideal terá, em fase de clivagem, menos de 10% de fragmentação, um número de células e tamanho apropriado ao estado do desenvolvimento e ausência total de multinucleação [171].

Poderão ainda ser reportadas, tal como no zigoto, outras anomalias tais como a presença de vacúolos de grandes dimensões ou regiões citoplasmáticas de granulosidade excessiva que deverão ser reportadas, ainda que o seu valor preditivo na qualidade embrionária e potencial embrionário seja incerto [275].

2.4.2.3. Avaliação da compactação e formação da mórula

Um embrião de 3º dia dará lugar a uma mórula assim que se iniciar a compactação das células que surge a partir da criação de junções intercelulares [275], usualmente associada à ativação do genoma embrionário, sendo, portanto, sinal de um bom desenvolvimento embrionário [282]. A avaliação do início da compactação é feita às 92 ± 2 h e permitirá registar se o embrião entrou numa quarta ronda de clivagem e se houve a exclusão de algum blastómero na formação da mórula (Figura 24). Para que o embrião tenha uma boa qualidade, o mesmo deverá ter entre 16 e 32 blastómeros [283] e exibir um nível de compactação que envolva todo o volume embrionário, isto é, se mais de metade do embrião for excluído do processo de compactação, o mesmo terá um fraco prognóstico associado [171].



Figura 24. Embrião em fase de morula, ao 4º dia de desenvolvimento. Retirado de [479].

2.4.2.4. Avaliação do blastocisto

O blastocisto (Figura 25) será formado pelo processo de cavitação, que consiste na acumulação de fluido entre as células em estado de mórula e a consequente formação de uma cavidade, o blastocélio. À medida que a cavitação continua, formam-se duas populações de células a partir da polarização dos blastómeros - as células da MCI que darão origem à linhagem embrionária, e as da TE, que irão envolver o blastocisto e posteriormente fazer parte dos tecidos extraembrionários [284, 285]. Às 116 ± 2 horas, o blastocisto já deverá ter atingido um alto nível de expansão de forma que as células da MCI sejam suficientemente proeminentes e discerníveis, e as células da TE deverão ser coesas entre si [171]. À medida que o blastocisto expande, a ZP vai ficando cada vez mais fina, até que se dá a sua rutura e o blastocisto começa o seu processo de eclosão.

O sistema de avaliação de um blastocisto consiste em três parâmetros: nível de expansão, qualidade da MCI e qualidade da TE. Segundo os consensos apresentados em 2011 [171], o estado de expansão poderá ser avaliado em quatro níveis, sendo o último referente a um embrião já em estado de eclosão. Uma MCI de boa qualidade terá de ter várias células fortemente aderentes entre si, e facilmente discerníveis, para além de um bom tamanho e de uma forma preferencialmente oval [286]. O mesmo se aplica para a qualidade da TE, que deverá, idealmente, ser composta por várias células aderentes entre si de maneira que se forme um epitélio coeso que tenha capacidade para se aderir e invadir o endométrio no momento da implantação [285]. Estas células da TE poderão ainda, em certos casos, dar origem a filopodias, que consistem na presença persistente de células da TE que iniciaram a migração a partir de regiões próximas da MCI assim que se deu o início da expansão do blastocisto [287]. A presença destas filopodias poderá comprometer a qualidade embrionária e, consequentemente, a evolução da gravidez [288].

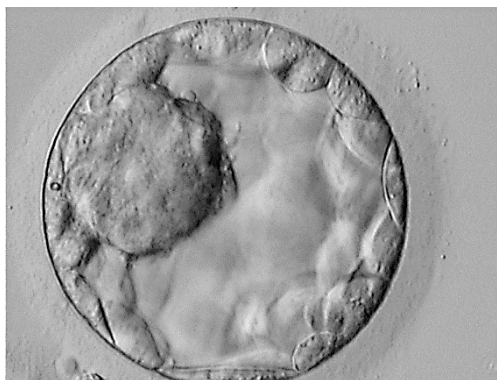


Figura 25. Embrião em fase de blastocisto. Retirado de [480].

2.4.3. Sistema time-lapse: inovação na avaliação embrionária

Uma avaliação embrionária tradicional recorre fundamentalmente à análise do aspeto morfológico dos embriões em momentos estáticos, não tendo, portanto, em conta, o desenvolvimento caracteristicamente dinâmico dos mesmos. Isto leva a uma falta de informação relativamente ao que acontece entre eventos como a fecundação, clivagem, compactação, cavitação e expansão [289]. Esta avaliação implica também que os embriões sejam fisicamente removidos da estufa, podendo comprometer o seu desenvolvimento por exposição a flutuações de temperatura, pH, e níveis de oxigénio [247]. A criação e implementação do sistema time-lapse permitiu que os embriões fossem monitorizados em cultura contínua [290], sendo possível, com este sistema, recolher imagens dos embriões em intervalos regulares durante o seu desenvolvimento até à fase de blastocisto, permitindo a monitorização contínua dos mesmos, e a visualização de eventos dinâmicos que ocorrem entre períodos de observação estáticos, o que permitiu que se introduzisse o conceito da morfocinética na avaliação embrionária, criando-se os parâmetros morfocinéticos absolutos e relativos, sendo que os absolutos (Tabela 3) se referem aos momentos precisos do evento, e os relativos (Tabela 4) à duração de cada evento ou entre eventos [289, 291].

Tabela 3 – Parâmetros morfocinéticos absolutos, que representam o *timing* (em horas) no qual se dá o evento correspondente. Adaptado de [291].

Parâmetros	<i>Timing</i> (em horas) em que se dá o evento
t0	Inseminação.
tPB2	Extrusão do segundo corpo polar (PB2).
tPN	Confirmação do estado da fecundação.
tPNa	Aparecimento dos pronúcleos
tPBf	Desaparecimento dos pronúcleos
tZ	Avaliação dos pronúcleos
tn	Eventos de clivagem desde os 2 até aos 9 blastómeros.
tSC	Primeira evidência de compactação.
tMf/p	Fim do processo de compactação.
tSB	Início da formação do blastocisto (cavitação).
tByz	Final do processo de cavitação.
tEyz	Início da expansão.
tHNyz	Início da herniação.
tHDyz	Eclosão do embrião.

Tabela 4 – Parâmetros morfocinéticos relativos, que representam a duração de um evento específico. Adaptado de [291].

Parâmetros	Duração	Descrição do evento
VP	tPNf - tPNa	Período no qual os pronúcleos são visíveis.
ECC1	t2 – tPB2	Duração do primeiro ciclo celular embrionário.
ECC2	t4 – t2	Duração do segundo ciclo celular embrionário.
ECC3	t8 – t4	Duração do terceiro ciclo celular embrionário.
s2	t4 – t3	Sincronização das divisões celulares no segundo ciclo celular
s3	t8 – t5	Sincronização do padrão de clivagem no terceiro ciclo celular.
dcom	tMf - tSC	Duração da compactação.
dB	tB - tSB	Duração do evento de formação do blastocisto.
dexp	tHN - tE	Duração da expansão do blastocisto.
dHN	tHN-tHD	Duração da herniação.

A implementação de um sistema time-lapse em laboratório apresenta, deste modo, uma oportunidade de otimização da seleção embrionária baseada em classificação morfológica e morfocinética, que conseqüentemente, irá aperfeiçoar a seleção de embriões viáveis e de boa qualidade.

Atualmente, existem vários sistemas time-lapse disponíveis para a prática de técnicas de PMA, e os mesmos diferenciam-se ao nível do método de cultura, projeção do equipamento e tipo de microscópio utilizado. O método de cultura pode ser em grupo ou individual, e relativamente ao equipamento, é habitualmente usada uma estufa à qual é acoplada um microscópio convencional, ou inserido no seu interior. Outra alternativa será ter os dois sistemas integrados no mesmo equipamento [247]. O microscópio poderá ser de campo claro ou escuro, e a aquisição de imagem poderá diferenciar-se em relação aos planos focais e à frequência da captura das imagens [291]. Dentro dos diferentes tipos de sistemas time-lapse comercializados, os mais usados são o Embryoscope® (Vitrolife), Geri® (Gene Biomedx), Primo Vision® (Vitrolife) e Eeva® (*Early Embryo Viability Assessment*) (Merck-Serono). Todos estes sistemas incorporam um sistema ótico digital invertido que captura imagens dos embriões em intervalos de 5 a 10 minutos, criando um vídeo que exhibe o seu desenvolvimento [292], diferenciando-se, principalmente, nas fontes de luz utilizadas. O sistema Eeva® tem a particularidade incluir um algoritmo de previsão de formação de blastocisto, com base na avaliação embrionária ao 3º dia, evitando riscos de cultura prolongada [293]. Este

sistema de previsão pode ser integrado noutras incubadoras time-lapse, na condição de as mesmas poderem fazer a alternância para iluminação de campo escuro.

O tipo de placas usado na cultura dos embriões poderá ser importante na diferenciação de uma cultura individualizada ou em grupo, isto é, poder-se-á usar placas com múltiplos micropoços, sobre os quais se coloca uma gota de meio de cultura, ou placas nas quais o meio de cultura é individualmente colocado sobre cada micropoço [247]. A evidência é que uma cultura em grupo será benéfica para o desenvolvimento embrionário [294].

Apesar de a cultura em sistema time-lapse não evidenciar uma superioridade em termos de resultados clínicos (taxa de nados vivos, taxa de aborto e/ou taxa de gravidez clínica), em comparação com a cultura convencional [295], não se invalida o facto de a cultura em time-lapse garantir a segurança e eficácia da cultura embrionária [296 – 299] e, simultaneamente, proporcionar um desenvolvimento embrionário em cultura ininterrupta, o que contribuirá para uma menor exposição dos embriões a condições que possam perturbar o seu desenvolvimento [247].

Futuramente, espera-se ser possível implementar softwares de seleção embrionária automática, desenvolvidos a partir do *deep machine learning*, baseados na correlação entre padrões de desenvolvimento embrionário e resultados clínicos, permitindo ultrapassar-se a subjetividade inerente da classificação embrionária manual [300].

2.4.3.1. Sistema de time-lapse Geri®

O sistema de time-lapse Geri® trata-se de uma incubadora que permite monitorizar continuamente o desenvolvimento embrionário, facilitando a deteção de padrões de desenvolvimento anormais que estão diretamente correlacionados com o potencial de implantação. A incubadora Geri® dispõe de seis câmaras de cultura individuais, cada uma com um microscópio digital incorporado, e uma câmara de alta resolução que permite a captura de imagens em intervalos de 5 minutos, a partir de 11 planos focais. Cada câmara permite o ajuste de parâmetros tais como a focagem, contraste da imagem e alinhamento da câmara em relação à posição do disco. De maneira a reduzir danos provocados pela luz, o sistema incorpora uma fonte de luz de longo comprimento de onda (550-650 nm), e uma iluminação de campo claro, que pode ser alternada para campo escuro, na eventualidade de se desejar incorporar o sistema de previsão Eeva®. Cada uma das câmaras possui um sistema de controlo independentemente, que permite registar variações de temperatura, gases e humidade,

e emitir alarmes na eventualidade das flutuações destas variáveis atingirem os limites razoáveis, isto é, acima de 6% de CO₂, 5% de O₂ ou 37°C de temperatura. Para o controlo da temperatura, cada câmara dispõe de um sistema de duplo aquecimento e de rápida recuperação da temperatura, nas situações de abertura da tampa. O fluxo de gases é constante e, como tal, qualquer alteração será detetada por um sensor, restabelecendo-se os níveis normais em 3 minutos. O fornecimento de gases é individual para cada uma das câmaras, evitando-se assim que todas as câmaras sejam afetadas no caso de alguma anomalia. A humidade é também controlada de forma a minimizar um aumento nos níveis de osmolaridade que perturbarão o desenvolvimento embrionário [301, 302].

Para o cultivo dos embriões, são utilizadas placas de cultura Geri® que dispõem de 16 micropoços para monitorização individual dos embriões, em simultâneo com a partilha do meio de cultura e, portanto, a manutenção de uma cultura em grupo [303].

2.5. Teste Genético Pré-Implantação (PGT)

O PGT trata-se de um procedimento que permite a deteção de anomalias genéticas em embriões provenientes de ciclos de ICSI, potenciando assim uma futura gravidez e evitando o risco de transmissão de doenças genéticas à descendência [304]. O principal objetivo será, deste modo, identificar embriões que não apresentem qualquer anomalia genética ou cromossómica e que, portanto, sejam geneticamente transferíveis [305].

O PGT surgiu em consequência da maioria dos abortamentos precoces se deverem a anomalias cromossómicas do embrião [306, 307], tais como trissomias, triploidias e monossomias [308].

Atualmente existem algumas variações do teste PGT, entre elas as mais comuns sendo o PGT-A, que permite a identificação de aneuploidias nos 46 cromossomas, o PGT-M, que é usado para deteção de doenças monogénicas, e o PGT-SR, aplicado à deteção de rearranjos estruturais cromossómicos [305].

O PGT-A é normalmente indicado em casos de idade materna avançada [309-311], aborto ou falha de implantação recorrente [308, 312, 313], historial de nascimento de um filho afetado por doença genética [304], ou infertilidade masculina severa [312]. O objetivo do PGT-A é, portanto, diferenciar embriões euploides daqueles que apresentam aneuploidias, *i.e.*, um número anormal de cromossomas nas células. As aneuploidias devem-se, geralmente, a erros meióticos nos ovócitos, cuja incidência tende a aumentar com a idade feminina [311, 314], observando-se mais frequentemente nos cromossomas 13, 15, 16, 18, 19, 21 e 22 [312]. A identificação de embriões euploides

e, portanto, passíveis de transferência, levará a um menor risco de falha de implantação ou de ocorrência de aborto espontâneo [315, 316]. As aneuploidias nos espermatozoides são também relevantes especialmente em casos de infertilidade masculina severa, e serão mais frequentes nos cromossomas 21, 22, X e Y [312, 317].

O PGT-M é frequentemente usado para despiste de doenças monogénicas, incluindo doenças autossómicas recessivas como fibrose cística e hemoglobinopatias, e doenças autossómicas dominantes tais como distrofia miotónica de *Steinert*, doença de *Huntington*, neurofibromatoses e síndromes de cancro familiar, e ainda doenças relacionadas com o cromossoma X tais como distrofia muscular de *Duchenne*, síndrome do X frágil e hemofilia [305, 312].

O PGT-SR é indicado para deteção de doenças cromossómicas que se caracterizam por rearranjos cromossómicos hereditário, tais como translocações robertsonianas ou recíprocas, inversões, duplicações e deleções.

O PGT é um processo faseado que envolve a biópsia embrionária em si, e a posterior análise genética das células obtidas a partir da biópsia. A biópsia embrionária é o processo pelo qual se remove fragmentos celulares do embrião sujeito a análise, para que os mesmos sejam posteriormente analisados para possível identificação de anomalias. A remoção dos fragmentos é antecedida por um passo de eclosão assistida, que consiste na rutura ou enfraquecimento da ZP, que atualmente é feita, rotineiramente, com recurso a radiação laser. Depois da eclosão, aguarda-se que o embrião inicie a sua herniação, fruto da expansão do mesmo [312].

A biópsia embrionária poderá ser realizada em três momentos diferentes, sendo eles a fase de ovócito/pré-zigoto, a fase de clivagem do embrião, ou fase de blastocisto [305]. A biópsia realizada em fase de ovócito ou pré-zigoto consiste na remoção do 1º ou 2º GP, ou ambos, conforme extrusão dos mesmos [318 – 320], considerando-se que a sua remoção não comprometerá o desenvolvimento embrionário, uma vez que não possuem qualquer função reprodutiva. Este tipo de biópsia, no entanto, permite apenas estudar a contribuição genética maternal, não considerando anomalias paternas ou relacionadas com divisões mitóticas embrionárias [304, 321]. A biópsia em fase de clivagem embrionária, idealmente ao 3º dia de desenvolvimento, permite a remoção de 1 a 2 blastómeros, não se recomendando a remoção de um número superior por motivos de comprometimento da viabilidade do embrião [322]. A biópsia em fase de blastocisto é feita geralmente ao 5º ou 6º dia após inseminação, sendo removidas entre 5 e 8 células da TE [323]. Atualmente, a remoção de células em fase de blastocisto constitui o método

preferencial de biópsia embrionária, nomeadamente devido ao facto de ser possível remover mais células sem comprometer a viabilidade embrionária, pelo facto de a TE não estar diretamente envolvida na formação do feto, mas sim nas suas estruturas extraembrionárias [304], mas também pela garantia de obtenção de melhores taxas de implantação [324] e de gravidez evolutiva [325 – 329]. A ativação do genoma embrionário característica desta fase de desenvolvimento permite ainda que a análise genética seja mais exata [322].

2.5.1. Procedimento

Todos os embriões indicados para realização de PGT deverão ser concebidos com recurso à técnica de ICSI, uma vez que esta reduz o risco de contaminação por parte dos espermatozoides que se ligam à ZP [304].

A biópsia inicia-se pelo método de eclosão assistida, que consiste na realização de uma abertura na ZP de cerca de 10-20 μm , com recurso à utilização do laser. Esta abertura na ZP deverá ser criada do lado oposto da MCI, diminuindo potenciais riscos que possam ser implicados no desenvolvimento [330]. O embrião é colocado novamente em cultura, até que o mesmo comece a herniar. Nesse momento, o embrião é transferido da placa de cultura para a placa de biópsia.

Esta placa é preparada cerca de uma hora antes da biópsia, sendo pipetadas gotas de meio tamponado, que deverá ser equilibrado de véspera em estufa a 37° C sem CO₂, e gotas de meio PVP que permitem a estabilização das micropipetas [331]. A placa é coberta com óleo e colocada em estufa a 37°C, sem CO₂.

A placa de biópsia é visualizada no microscópio invertido, cujas pipetas de micromanipulação foram previamente preparadas. Numa biópsia embrionária, é usada uma pipeta de sustentação, tal como no processo de ICSI, de diâmetro interno de 95 μm , e uma pipeta de biópsia de diâmetro interno de 20 μm . É crucial a inclusão de um sistema de aquecimento na platina do microscópio, de forma que todo o processo seja feito a uma temperatura adequada. O sistema de laser é também preparado de forma a regular o diâmetro desejado dos disparos. No momento da biópsia, o embrião é posicionado de forma que as células herniadas estejam opostas à pipeta de sustentação. Para que o embrião se mantenha numa posição estabilizada, aplica-se uma ligeira sucção na pipeta de sustentação e, com a pipeta de biópsia, aspiram-se suavemente as células da TE. As células são esticadas até que as mesmas se desprendam com ajuda dos disparos de laser feitos entre as junções intercelulares. As células biopsadas são posteriormente transferidas para uma placa de lavagem com

gotas de meio de cultura, equilibrado de véspera em estufa a 37°C, 6% CO₂ e 5% O₂, em conjunto com o embrião em questão. Numa câmara de fluxo laminar, procede-se à lavagem das células e ao processo de *tubing*, que consiste na colocação das células num tubo Eppendorf com meio PBS⁷, que posteriormente será colocado no congelador, a -21°C, até que se possa proceder à análise dos fragmentos. O embrião deverá ser colocado numa placa com gotas de meio tamponado, equilibrada de véspera em estufa a 37°C, 6% CO₂ e 5% O₂, até ao momento da vitrificação, que deverá ocorrer a seguir à biópsia, de forma a evitar reexpansões do blastocisto.

2.5.2. Análises genéticas

Os fragmentos biopsados serão posteriormente analisados para despiste de aneuploidia ou doença genética. Tradicionalmente, eram usadas as técnicas de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) para deteção de rearranjos cromossómicos, e reação em cadeia de polimerase (PCR) para doenças monogénicas. A técnica FISH envolve a produção de uma sonda fluorescente de DNA complementar a um cromossoma de interesse de modo a identificar a sua possível presença através do número de sinais fluorescentes produzidos. As limitações desta técnica incluem a falha de hibridização e a possível sobreposição de dois sinais fluorescentes, para além de analisarem um número reduzido de cromossomas [304, 322]. O PCR permite detetar mutações nucleotídicas usando *primers* marcados com fluorescência [305]. A eficácia do diagnóstico poderá ser comprometida por falhas de amplificação, contaminações ou *allele drop-out* (amplificação preferencial de um dos alelos) [304].

Face às limitações destas técnicas, desenvolveu-se outras técnicas de análise genética tais como hibridização genómica comparativa (*array*-CGH), que se diferencia da hibridização *in situ* por conseguir identificar diferenças cromossómicas em todos os cromossomas, incluindo os sexuais [312]. O desenvolvimento de outras técnicas tais como PCR quantitativo em tempo real, SNP *array* e sequenciação de nova geração (*Next Generation Sequencing* - NGS) permitiu o aprofundamento da capacidade de testagem. Atualmente, e face à documentação das taxas de implantação e gravidez evolutiva resultantes, o NGS tornou-se a técnica preferencial para PGT [322, 332], permitindo identificar embriões com aneuploidias ou triploidias e ainda embriões mosaicos [333], que se caracterizam pela presença de diferentes linhas celulares no

⁷ O meio PBS consiste numa solução salina tamponada com fosfato que permite armazenar células sem que se dê a sua rutura ou enrugamento devido ao equilíbrio osmótico que a mesma proporciona.

mesmo embrião, podendo haver uma mistura entre células euploides e aneuploides [322].

Mediante os resultados do PGT, os embriões que se considerarem geneticamente transferíveis são desvitrificados e preparados para transferência uterina. O número de embriões a transferir dependerá do número de embriões viáveis, mas também da idade e da condição da paciente [305]. O diagnóstico pré-natal poderá ser recomendado como uma confirmação de diagnóstico ao teste PGT, isto na eventualidade de se decidir transferir, por exemplo, um embrião mosaico [304].

O tema do PGT é um tema com algumas preocupações éticas e controvérsias associadas, nomeadamente devido ao facto de se discutir a exclusão de embriões que sejam afetados por doenças genéticas que não são consideradas fatais. Como tal, e até hoje, o PGT tem sido aplicado apenas para a deteção de doenças que possam ser altamente prejudiciais e possivelmente fatais para a descendência [305].

2.6. Transferência embrionária

A transferência embrionária trata-se do último passo de um ciclo de FIV ou ICSI, e como tal, deverá ser altamente otimizado de modo a potenciar uma correta implantação do embrião. O aperfeiçoamento da técnica de transferência utilizada, a escolha do cateter e a amplificação da capacidade de implantação do embrião através do método de eclosão assistida são algumas das abordagens que poderão influenciar as taxas de implantação.

A transferência embrionária requer a colocação do embrião junto ao revestimento uterino, numa posição que favoreça a implantação do mesmo. Geralmente, é realizada ao 5º dia de desenvolvimento embrionário, mas poderá também ser realizada ao 2º, 3º ou 4º dia, caso o número de embriões e a sua qualidade de desenvolvimento o justifiquem. As características dos ciclos anteriores da paciente e o seu estado fisiológico são também fatores que influenciam a escolha do dia da transferência.

O número de embriões a transferir deverá ser entre um e dois, sendo que se opta pela transferência de dois embriões apenas em casos de idade materna avançada ou em pacientes cujo prognóstico não seja favorável. As pacientes deverão ser aconselhadas e advertidas acerca da possibilidade de terem uma gravidez gemelar na eventualidade de serem transferidos dois embriões. Caso contrário, especialmente em situações de bom prognóstico associado e em pacientes com idades abaixo dos 40 anos, a transferência de um embrião é priorizada. É importante reconhecer que, apesar do número de gravidezes múltiplas ter diminuído nos últimos anos, a incidência de

gravidez gemelar continua a ser bastante alta em ciclos de PMA. Sabendo que este tipo de gravidez poderá ter complicações associadas para a gestante e para o feto, é incentivada a transferência de apenas um embrião [334].

Para a transferência embrionária, é preparada uma placa de 4 poços com meios que deverão ser equilibrados entre 4 e 18 horas antes da sua utilização, a 37°C, 6% CO₂ e 5% O₂. Os meios de transferência usados incluem um meio de cultura embrionário que serve como meio de lavagem, e o meio de adesão⁸, no qual o embrião é colocado cerca de 15 a 20 minutos antes da transferência. A placa é novamente colocada na estufa até ao início da transferência.

A transferência embrionária começa com a preparação da paciente, que se deverá colocar em posição ginecológica para que se proceda à realização de uma ecografia pélvica com sonda abdominal de modo a identificar o trajeto que o cateter terá de percorrer. Enquanto isso, procede-se à montagem do cateter de transferência e posterior lavagem do mesmo. Começa-se por encher uma seringa com meio de cultura, e a mesma é acoplada ao cateter de transferência, fazendo-se passar o meio pelo cateter, enchendo-se com ar para expulsar qualquer meio residual. Em seguida, procede-se ao carregamento do embrião no cateter de transferência, e o mesmo é transportado até à sala onde a transferência será realizada. O cateter de transferência é introduzido através do orifício cervical e o(s) embrião(ões) é(são) depositado(s) a 10-15 mm do fundo uterino [335]. Todo o procedimento deverá ser feito com recurso a ecografia abdominal, de maneira a observar-se o trajeto do cateter e a deposição do embrião. O cateter deverá ser lentamente removido após o processo. A transferência é confirmada em laboratório ao se passar meio novamente pelo cateter e ao observar se há presença de algum embrião. Se isto acontecer, o processo deverá ser repetido até que o embrião seja corretamente posicionado na cavidade uterina da paciente. No final do processo, a paciente repousa entre 15 e 30 minutos, até que possa retomar a sua atividade normal. Algumas complicações poderão surgir de uma transferência de difícil realização, tais como trauma endometrial, danificação do embrião ou incorreta deposição do mesmo [335].

A confirmação da implantação do embrião transferido e, portanto, de uma gravidez química, é feita doze dias após a transferência embrionária, através da realização de um exame de deteção da β -hCG. Se o resultado for positivo, procede-se à realização

⁸ O meio de adesão trata-se de um meio tamponado bicarbonado composto por albumina recombinante humana e ácido hialurónico, uma macromolécula cuja concentração aumenta exponencialmente nos fluidos uterinos no momento da implantação, supondo-se assim que a sua adição ao meio de adesão potencie a capacidade de implantação do embrião transferido.

de uma ecografia abdominal com o intuito de confirmação da gravidez clínica, evidenciada a partir da observação do saco gestacional intrauterino.

2.6.1. Eclosão Assistida

A eclosão assistida surgiu como um método que promete potenciar a capacidade de implantação de um embrião. O método envolve a disrupção artificial da ZP, e várias técnicas poderão ser aplicadas.

O método pelo qual o embrião sofre eclosão consiste na produção de proteases pelas células da TE, que atuam sobre a ZP e induzem a sua fragmentação. Em conjunto com a expansão física do blastocisto, que permite a redução da espessura da ZP, e com os ciclos de contração e expansão, o embrião acaba por eclodir. A elasticidade e o adelgaçamento da ZP são, portanto, fatores cruciais para que se dê a eclosão [336]. Um dos fatores que poderá comprometer a implantação do embrião será a sua incapacidade de terminar o seu processo de eclosão eficazmente [225, 337]. A falha na eclosão deve-se, geralmente, a um endurecimento da ZP, que poderá ser agravado pelo envelhecimento dos ovócitos, relacionado com progressivas alterações endócrinas [338], e pela vitrificação dos embriões, que poderá induzir alterações na matriz glicoproteica da ZP [339]. Embriões com uma ZP de alta espessura prevê-se que tenham dificuldades na implantação [225]. Face a esta problemática, implementou-se o método de romper a ZP através de métodos mecânicos, químicos, ou com recurso a um laser.

O método mecânico de eclosão assistida consiste na disseção parcial da ZP (PZD), que cria uma abertura artificial na ZP, através do uso de uma agulha microscópica que é inserida tangencialmente entre a ZP e os blastómeros. A abertura da ZP é facilitada com o uso de uma pipeta de sustentação. O método químico recorre ao uso do ácido *Tyrode*, que é expelido junto à ZP, até que a mesma sofra dissolução. Ambos os métodos, no entanto, foram substituídos pelo laser, pelo facto de não envolver procedimentos tão minuciosos, e também por minimizar o tempo de exposição do embrião [336]. O uso do laser tem-se mostrado altamente benéfico, em comparação com o método mecânico ou químico, especialmente em embriões que foram vitrificados [340] ou que provêm de pacientes de idade avançada. O laser funciona ao criar uma abertura na ZP, através da irradiação precisa e controlada de um feixe de laser [336].

O processo de eclosão assistida é feito antes da transferência dos embriões. A placa onde os mesmos se encontram é colocada sobre a platina do microscópio, cuja temperatura deverá ser adequada à micromanipulação (37°C). O equipamento do laser

é preparado, e antes de se proceder aos disparos, ajusta-se o diâmetro dos mesmos (μm). O laser deverá ser direcionado ao local de onde os blastómeros se encontram mais afastados. Deverão ser feitos alguns disparos [225], até que a ZP se encontre visivelmente enfraquecida [341]. O diâmetro do buraco produzido pelo laser deverá ser em função da espessura da ZP, sendo que uma ZP mais espessa, requer que se faça um buraco maior. Depois do processo, o embrião deverá ser colocado de novo na estufa até estar pronto para a transferência. Apesar do seu benefício teórico, a eclosão assistida poderá provocar dano letal ao embrião ou aos seus blastómeros, comprometendo a viabilidade do mesmo. Posto isto, o método deverá ser feito com cautela [336, 342].

2.7. Criopreservação

A criopreservação, tal como o nome indica, é uma técnica que envolve a congelação de células e tecidos biológicos de modo a preservar a sua viabilidade e competências fisiológicas, idealmente durante um extenso período de tempo. O principal objetivo de um processo de criopreservação é manter as células em estado de suspensão, onde toda e qualquer atividade biológica e química é interrompida. Para tal, recorre-se ao uso do azoto líquido, cuja temperatura de ebulição (-196°C), permite o armazenamento a temperaturas suficientemente baixas para impedir qualquer dano ou degradação do material criopreservado [343 – 345].

Os métodos iniciais pelos quais se procedia ao arrefecimento das células revelaram-se ineficazes, em virtude da redução abrupta da temperatura levar à deterioração de estruturas intracelulares e à formação de cristais de gelo, que provocam a morte celular [345]. A introdução dos agentes crioprotetores facilitou a implementação dos processos de criopreservação ao diminuir a formação de cristais de gelo e, portanto, o dano intracelular provocado pelos mesmos [343, 344]. Estes crioprotetores atuam pela criação de um gradiente osmótico que promove o efluxo da água intracelular, convertendo o citoplasma a um estado amorfo, diminuindo assim a temperatura à qual o gelo se forma, minimizando o dano osmótico e estabilizando as membranas e estruturas intracelulares [346 – 348]. Os crioprotetores são classificados como permeáveis ou impermeáveis conforme a sua capacidade de atravessar a membrana citoplasmática [345], podendo ser usadas várias combinações de crioprotetores permeáveis (por exemplo, glicerol dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol) ou de crioprotetores impermeáveis (por exemplo, sacarose, glucose, frutose, trehalose, galactose) [344]. Pelo facto da adição dos crioprotetores induzir flutuações extremas no volume das células, fruto das alterações osmóticas durante a equilibração, os mesmos

deverão ser adicionados lentamente de forma a não provocar rutura celular ou danos subletais [349]. A adição de agentes crioprotetores deverá ser, no entanto, complementada com taxas de arrefecimento e aquecimento adequadas, que se definem pela velocidade à qual a temperatura da amostra é reduzida ou aumentada durante os processos de congelação ou descongelação, respetivamente [345].

Inicialmente, foram desenvolvidas técnicas de congelação lenta que consistiam numa desidratação gradual das células, combinando a adição de baixas concentrações de crioprotetores com uma baixa taxa de arrefecimento, permitindo assim minimizar a formação de cristais de gelo intracelulares [343, 345]. No entanto, e face às baixas taxas de sucesso associadas à técnica [350 – 352], independentemente das adaptações que tenham sido feitas em prol da eficácia da mesma [353, 354], a congelação lenta tornou-se num método desfavorecido, dando lugar à vitrificação como o método preferencial de congelação atual [344]. A vitrificação, contrariamente ao método da congelação lenta, recorre ao uso de altas concentrações de crioprotetores com altas taxas de arrefecimento [343], de maneira a converter as células a um estado vítreo, evitando a formação de cristais de gelo [344]. Atualmente, a vitrificação é aplicada na criopreservação de embriões, ovócitos e tecido ovárico [343].

Os protocolos de vitrificação podem ser aplicados em sistema aberto ou fechado, sendo que o primeiro envolve o contacto direto entre as células criopreservadas e o azoto líquido através do uso de sistemas de baixa capacidade de volume, e o segundo, por recorrer a sistemas de tubulação [355], envolve um contacto indireto entre ambos [344]. O uso do sistema aberto na vitrificação tem sido altamente favorecido devido às altas taxas de arrefecimento que o sistema permite, em virtude do uso de, por exemplo, palhetas modificadas, que permitem o contacto direto e extremamente rápido com o azoto líquido [345]. A eventualidade de este sistema permitir, no entanto, que as células sejam contaminadas por um elevado número de patógenos porventura presentes no azoto líquido [356], levou a que se desenvolvesse o sistema fechado de criopreservação, no sentido de evitar essa mesma contaminação ao criar uma barreira física que proporcione uma maior proteção [345]. A adoção destes sistemas tem sido, no entanto, altamente debatida pelo facto de os mesmos estarem associadas a menores taxas de arrefecimento e aquecimento [357], quando comparadas com as do sistema aberto, para além do facto de até hoje não terem sido documentados quaisquer casos de contaminação cruzada que levasse à transmissão de doenças [345].

A criopreservação de embriões e gâmetas, tanto femininos como masculinos, são procedimentos cuja disponibilidade é assegurada num largo número de países

[345]. A criopreservação de embriões, no entanto, não é uma opção viável para muitos casais por motivo de objeções morais ou crenças religiosas, ou devido a legislação restritiva do próprio país que impeça ou limite a implementação da técnica. A implementação da criopreservação de ovócitos veio a ser impulsionada por estes mesmos motivos, permitindo contornar algumas das limitações da criopreservação de embriões [344], tornando-se assim numa opção adicional da preservação da fertilidade feminina [343].

2.7.1. Criopreservação de espermatozoides

As primeiras tentativas da congelação de espermatozoides remontam há mais de 80 anos e, desde então, a técnica tem evoluído exponencialmente, concomitante com as suas taxas de sucesso, e em virtude das descobertas feitas, nomeadamente, a criação dos crioprotetores e a possibilidade de congelar em azoto líquido [358].

A criopreservação de espermatozoides pode ser indicada em homens, previamente a um ciclo de tratamento de PMA, que sejam diagnosticados com oligozoospermia grave, que tenham disfunções ejaculatórias, ou que não consigam obter uma amostra a fresco no dia do procedimento. É também usada para criopreservar espermatozoides de doadores saudáveis que serão usados em casos onde o parceiro é azoospermico, para evitar transmissão de uma doença hereditária, ou para casais de mulheres ou mulheres solteiras [358, 359]. Pode ainda ser oferecida em situações mais específicas, nomeadamente previamente à exposição a tratamentos com agentes citotóxicos ou radioterapia, ou à realização de uma vasectomia. Atualmente, já se discute a implementação da técnica previamente a cirurgia de redesignação sexual, ou em adolescentes que iniciem terapias hormonais [119, 360].

O processo pelo qual os espermatozoides são criopreservados leva a que os mesmos atravessam mudanças dramáticas na sua estrutura e função que poderão comprometer severamente o seu potencial fecundante [361], independentemente da sua menor suscetibilidade a sofrerem danos pelo efeito da criopreservação, em comparação com outras células, devido ao seu pequeno tamanho e grande área superficial [362]. As alterações mais frequentemente reportadas são o comprometimento da integridade do DNA, nomeadamente fragmentação do mesmo, descondensação da cromatina e variações no estado do acrossoma, redução na motilidade e viabilidade [363], e mudanças na fluidez e integridade da membrana plasmática [364]. A maior ou menor suscetibilidade dos espermatozoides aos efeitos mais frequentes da criopreservação irá depender da qualidade espermática inicial, isto

é, previamente à congelação [365], e também das patologias que poderão estar associadas à amostra indicada a criopreservação [366 – 368].

A fragmentação do DNA provocada pelos efeitos da criopreservação considera-se uma das mais frequentes entre as anomalias dos espermatozoides, tendo já sido estabelecida uma correlação com possíveis falhas de fecundação existentes, e consequentemente, um maior risco de aborto espontâneo ou de falha no desenvolvimento fetal [369 – 371]. O principal mecanismo que leva a alterações no DNA dos espermatozoides consiste na alteração da fluidez e integridade da membrana plasmática, diretamente relacionada com o aumento da produção de EROS, em resposta às mudanças drásticas de temperatura inerentes ao processo de congelação e descongelação [372 – 374]. Pelo facto de o stress oxidativo ser um dos principais fatores prejudiciais na qualidade dos espermatozoides, o principal objetivo será diminuir a libertação dos mesmos e aumentar a sua neutralização [375], através da adição de antioxidantes [358]. Todas as alterações descritas anteriormente irão influenciar diretamente a motilidade e viabilidade dos espermatozoides, afetando a capacidade fecundante dos mesmos [376, 377]. A adição de crioprotetores, ainda que essencial para a diminuição da formação de cristais de gelo, pode levar a stress osmótico proveniente das alterações de volume inerentes à adição e remoção dos crioprotetores, que alteram o equilíbrio osmótico do ambiente [361].

Nestas situações, devem ser adotados protocolos que permitam prevenir ou reduzir os danos induzidos pela criopreservação. O controlo das taxas de congelação e de descongelação é crucial, para além do processamento num ambiente estéril, de forma a evitar contaminações [358]. Uma pré-seleção dos melhores espermatozoides, através de uma separação gradientes de densidade e posterior *swim-up*, é uma das estratégias utilizadas para descartar o maior número possível de espermatozoides inviáveis, imóveis e morfologicamente anormais, para além de possíveis leucócitos presentes, que possam induzir a produção de EROs [358].

Todo o conhecimento acerca das alterações nos espermatozoides induzidas pelos efeitos da criopreservação deve ser tido em conta para a otimização dos protocolos atuais de congelação e descongelação. Em favor da diminuição dos danos criogénicos, é necessário estudar-se qual o melhor método de congelação, os melhores crioprotetores, as condições da sua aplicação e a necessidade da adição de antioxidantes, em virtude da diminuição do stress oxidativo [358]. A introdução da vitrificação como método de congelação de espermatozoides tem sido debatida, no entanto, apesar dos seus resultados controversos, não há uma conclusão certa acerca

da priorização deste método, mantendo-se apenas como um método promissor a ser explorado [361].

2.7.2. Criopreservação de embriões

A criopreservação de embriões tornou-se, na última década, uma prática altamente implementada globalmente [378], fruto da mesma permitir que se armazenem embriões que poderão ser usados em ciclos de transferência subsequentes, maximizando assim o efeito cumulativo de um ciclo de tratamento [379, 380].

A necessidade da criação de uma técnica de criopreservação de embriões surgiu a partir do rápido desenvolvimento das técnicas de PMA, e consequentemente, com a intenção de evitar os fenómenos de gravidez múltipla que surgiam a partir dos ciclos de transferência de múltiplos embriões [381], registando-se, portanto, a primeira gravidez resultante da transferência de um embrião criopreservado em 1983, na Austrália [382], e o primeiro nascimento em 1984, nos Países Baixos [383].

Inicialmente, no entanto, e devido à precocidade da técnica, as taxas de sucesso associadas eram baixas, o que exigia que os melhores embriões fossem transferidos a fresco [384], e os restantes fossem considerados embriões supranumerários [379]. A relutância acerca da eficácia da criopreservação dos embriões, e das suas taxas de sobrevivência, levou a que durante muito tempo a maior parte dos embriões fossem transferidos a fresco, muitas vezes em transferências múltiplas. A introdução da vitrificação como método de congelação veio, no entanto, trazer uma maior confiança na criopreservação de embriões, fruto das suas promissoras taxas de sucesso, comparativamente às do método de congelação lenta, que teria sido favorecido até ao final da última década [379]. A implementação da vitrificação como o método standardizado de criopreservação de embriões veio trazer benefícios tais como o aumento das taxas de sobrevivência, aumento das taxas cumulativas de gravidez e uma maior segurança associada aos tratamentos de PMA [379].

A criopreservação de embriões, para além de ser amplamente utilizada para a vitrificação de embriões supranumerários, é indicada também em pacientes cujo risco de desenvolvimento de SHO seja elevado [380], para criopreservação de embriões para doação [381], ou em casos onde os pacientes recorram a PGT, onde será necessário armazenar os embriões durante o tempo de testagem dos mesmos [379].

Em alternativa às transferências a fresco, a criopreservação total dos embriões, ou mais comumente referida como *freeze-all*, era inicialmente indicada apenas como uma estratégia de resgate em casos de risco de desenvolvimento de SHO [385, 386] ou

presença de anomalias no endométrio [387]. No entanto, e face ao pressuposto de que os ciclos de estimulação ovárica podem alterar gravemente a recetividade do endométrio, em virtude da administração de concentrações suprafisiológicas de hormonas [388, 389], tem sido debatida a implementação desta estratégia a fim de otimizar a preparação do endométrio [390, 391], que idealmente deverá estar temporalmente sincronizado com a transferência do embrião [391], de maneira a aumentar as probabilidades de implantação [392, 393]. Considera-se, no entanto, que a aplicação da estratégia da criopreservação total de embriões para qualquer ciclo de PMA seja ainda muito prematura, em consequência da publicação de resultados controversos acerca dos potenciais benefícios da mesma, havendo estudos a não reportar qualquer vantagem acrescida na aplicação da mesma [394 – 398], contrariamente a outros que reportam de facto melhores resultados [399, 400]. Posto isto, atualmente defende-se que o método do *freeze-all* deverá ser apenas aplicado em pacientes que demonstraram uma alta resposta ao ciclo de estimulação, e portanto em risco de SHO, pacientes que sofram de SOP, em casos onde os embriões serão submetidos a PGT, na eventualidade de as pacientes apresentarem anomalias uterinas ou tubares tratáveis, ou repetição dos insucessos em ciclos de FIV ou ICSI [387]. A estratégia da criopreservação total dos embriões é, portanto, um assunto ainda a ser explorado e debatido, de modo a obter-se uma visão geral dos seus benefícios e possíveis efeitos prejudiciais que poderão impedir a sua aplicação [387].

2.7.3. Criopreservação de ovócitos

A criopreservação de ovócitos consiste na congelação dos gametas femininos, como modo de preservação do potencial reprodutivo para uso futuro [401].

O surgimento da técnica deu-se no final da década de 80, depois de se ter reportado o primeiro nascimento, em 1986, a partir de um ovócito vitrificado [402], evento que desencadeou um profundo desenvolvimento da técnica, ainda que retardado [344], em virtude da persistência dos casos de insucesso que acompanhavam a técnica [403]. Em comparação com a criopreservação de espermatozoides e embriões, o progresso da criopreservação de ovócitos era altamente contido e negligenciado [345]. No entanto, e face à instituição de restrições legislativas e preocupações éticas e religiosas associadas à criopreservação de embriões, nomeadamente em países como a Itália [404], retomou-se o desenvolvimento da criopreservação de ovócitos, observando-se grandes avanços respetivos ao método e à tecnologia associada [405].

No início da década de 2000, concomitante com os avanços reportados na técnica da criopreservação de ovócitos, começaram por ser reportados alguns casos de sucesso de nascimentos a partir de ovócitos vitrificados, que demonstravam a eficácia da técnica e que a punham lado a lado com as taxas de gravidez associadas a ciclos com ovócitos a fresco [406 – 413]. Os avanços registados por estudos publicados no início do milénio [408, 412, 414, 415] motivaram a aprovação do uso da técnica fora do contexto experimental, sendo inicialmente usada apenas para casos de preservação do potencial reprodutivo em caso de doença que comprometa o potencial reprodutivo feminino [343]. A criopreservação de ovócitos por outros motivos, nomeadamente sociais, foi só considerada como eticamente permissível em 2018, depois da publicação de um documento a favorecer a técnica com base nas vantagens que a mesma oferecia, entre elas o aumento da autonomia reprodutiva feminina, a prevenção da infertilidade futura, e a promoção de justiça social ao diminuir as desigualdades entre a janela reprodutiva de homens e mulheres [416], tendo-se observado um crescimento exponencial de casos de criopreservação de ovócitos planeada a partir daí [417 – 419].

2.7.3.1. Indicações para a técnica da criopreservação de ovócitos

A criopreservação de ovócitos em contexto médico surgiu em necessidade da preservação do potencial reprodutivo que poderá ser prejudicado pelos efeitos da própria doença ou do tratamento associado, nomeadamente o tratamento quimioterápico ou o tratamento radioterápico, que poderão resultar na depleção folicular e no dano ovárico, respetivamente [420]. A necessidade da preservação do potencial reprodutivo feminino nestas situações aumentou exponencialmente nos últimos anos, em virtude do aumento simultâneo da incidência de doenças cancerígenas [421], e das respetivas taxas de sobrevivência [420].

Para além do cancro, outras doenças que comprometam diretamente o funcionamento reprodutivo podem ser motivo para iniciar um tratamento de preservação de gâmetas, tais como a endometriose severa [422], doenças autoimunes, reserva ovárica diminuída, cirurgia de redesignação sexual [420] ou doenças genéticas com predisposição a insuficiência ovárica primária [401].

Existem situações pontuais onde a criopreservação de ovócitos poderá ser essencial para que um tratamento de PMA seja viável, nomeadamente em situação de incapacidade de obtenção de uma amostra de espermatozoides no dia da punção ovocitária [420], ou em casos específicos onde o paciente de sexo masculino esteja indicado a TESE por ANO, e a paciente exiba uma má resposta à estimulação ovárica,

podendo-se recorrer a múltiplos ciclos de recolha ovocitária e posterior criopreservação, até que se atinja um número de ovócitos satisfatório para inseminação [423].

A preservação do potencial reprodutivo poderá ser também indicada não em contexto médico, mas também social, *i.e.*, na eventualidade de uma paciente desejar congelar os seus ovócitos para futuro uso [345]. Com cada vez mais mulheres a desejarem adiar o seu projeto de parentalidade, cresceu também a necessidade de preservarem o seu potencial reprodutivo, que exhibe um declínio exponencial a partir dos 35 anos, atribuído a uma diminuição da qualidade e quantidade ovocitária [420, 424, 425]. Entre as várias razões apresentadas para o desejo de preservar o seu potencial reprodutivo, as mais comuns são a inexistência de um parceiro [426, 427], priorização da carreira ou de objetivos académicos, estabilidade financeira, ou simplesmente incapacidade psicológica de iniciar um projeto parental [428].

A técnica da congelação de gâmetas femininos possibilita ainda o armazenamento de ovócitos de dadoras. A criação de um banco de gâmetas femininos traz várias vantagens, entre elas a minimização da sincronização entre os ciclos da recetora e dadora, a capacidade de alocação dos ovócitos de uma dadora a várias recetoras, diminuindo os custos associados ao procedimento, e a possibilitação do transporte dos ovócitos entre centros [344, 420]. O uso de ovócitos de dadora é normalmente indicado em situações de baixa reserva ovárica, múltiplas falhas em ciclos de PMA ou em mulheres cuja idade não lhes permita atingir uma gravidez recorrendo aos seus próprios ovócitos [420]. A eficácia da criopreservação de ovócitos de dadora é comprovada por alguns estudos que demonstram resultados clínicos semelhantes entre ciclos com ovócitos a fresco ou vitrificados [408, 413, 429, 430], com alguns estudos a reportar taxas de gravidez cumulativas superiores para o grupo de ovócitos vitrificados [431]. O favorecimento do uso de ovócitos de dadora é também comprovado em estudos que comparam ciclos com uso de ovócitos homólogos e de dadora, observando-se um aumento das taxas de gravidez e de nascimento recorrendo ao uso de ovócitos de dadora [432].

2.7.3.2. Técnicas de criopreservação – congelação lenta e vitrificação

O atraso significativo que se evidenciou nos primeiros anos do desenvolvimento da técnica da criopreservação de ovócitos deveu-se à complexidade inerente da criopreservação dessas células. A principal limitação da criopreservação dos ovócitos reside na própria estrutura dos mesmos – os ovócitos são considerados as maiores células do organismo, com um grande volume e alto teor em água e, em comparação,

uma pequena área superficial, o que faz com que os mesmos sejam detentores de uma baixa relação entre área e volume [345, 433]. A formação de cristais de gelo e o stress osmótico induzido pela criopreservação podem induzir inúmeras alterações no ovócito, entre elas o endurecimento prematuro da ZP, com subseqüentes taxas de fecundação baixas [434, 435], a despolimerização dos microtúbulos e dano no fuso meiótico, fragmentação do DNA e dano nos organelos intracelulares [345]. O endurecimento precoce da ZP foi reportado em vários estudos como um efeito direto da criopreservação, evidenciando-se uma redução no número dos grânulos corticais após descongelação dos ovócitos, o que indica que maior parte desses grânulos são libertados aquando da congelação dos ovócitos [436 – 438], o que leva a que os mesmos libertem os seus conteúdos precocemente, induzindo alterações bioquímicas na matriz extracelular dos ovócitos e, conseqüentemente, o seu endurecimento, que normalmente se dá no evento da fecundação, para evitar a polispermia.

A alta suscetibilidade dos ovócitos aos efeitos da criopreservação levou a um controlo redobrado sobre os seus métodos de congelação, nomeadamente em relação à exposição aos crioprotetores, e às taxas de congelação da técnica [439, 440]. Durante muitos anos, a técnica da congelação lenta foi favorecida em consequência de um aumento das taxas de sobrevivência dos ovócitos, concomitante com a otimização dos protocolos de congelação [354, 409, 441]. No entanto, a técnica em si não permitiu que se atingisse taxas de sobrevivência acima dos 70-80% [442], o que levou a que o uso da mesma fosse debatido, provando-se que as taxas de nados-vivos eram mais baixas quando comparadas com ovócitos a fresco [443]. A implementação da vitrificação mostrou-se particularmente crucial para criopreservação de ovócitos, pelo motivo de estes serem especialmente suscetíveis a danos criogénicos e, portanto, serem aqueles que beneficiam mais das vantagens da vitrificação. Desde o primeiro caso de sucesso reportado com o uso de ovócitos congelados através da vitrificação [444], a técnica tem mostrado a sua superioridade em relação ao método de congelação lenta, e a não inferioridade comparado com ciclos com ovócitos a fresco. A aplicação da vitrificação levou a maiores taxas de sobrevivência e a um menor dano das estruturas internas [445 – 448], para além de ser um processo mais rápido, o que implica que haja um menor dispêndio de tempo e energia [443].

O protocolo de vitrificação apresentado por Kuwayama e colegas [406, 449], que é o mais utilizado atualmente, consiste na adição dos crioprotetores de forma faseada, iniciando-se por uma fase de equilíbrio em soluções com crioprotetores permeáveis, que dura entre 5 e 15 minutos, transferindo-se posteriormente os ovócitos para uma solução

de vitrificação com adição de sacarose, na qual os ovócitos residem durante 1 minuto, sendo imediatamente submersos em azoto líquido, depois de terem sido transferidos para um suporte designado. O processo de descongelação é feito rapidamente para evitar a formação de cristais de gelo na fase de transição, sendo o suporte submergido numa solução com altas concentrações de sacarose, procedendo-se à remoção gradual dos crioprotetores em soluções com concentrações decrescentes de sacarose, permitindo a reidratação dos ovócitos, até que os mesmos sejam incubados num meio de cultura apropriado para uso [345, 450]. Os ovócitos descongelados, quer por congelação lenta ou por desvitrificação, são posteriormente inseminados através de ICSI, de forma a contornar problemas relacionados com o endurecimento da ZP já reportado após criopreservação dos ovócitos, o que poderá dificultar a penetração dos espermatozoides após inseminação [441, 450, 451, 452]. A criopreservação de ovócitos é realizada exclusivamente no estado de meiose II, de modo a garantir a maturação dos ovócitos a nível nuclear e citoplasmático. Neste estado, o primeiro GP já sofreu extrusão e os cromossomas já se encontram condensados e alinhados no fuso meiótico [345]. A superioridade da vitrificação em relação à congelação lenta como método de criopreservação de ovócitos foi comprovada por vários estudos, reportando-se um aumento das taxas de sobrevivência, fecundação e gravidez [446, 447, 448, 453] e ainda uma semelhança das mesmas em relação às dos ciclos com ovócitos usados a fresco [431, 442, 443, 454 – 458].

Apesar da vitrificação ser, aparentemente, o método mais seguro e eficaz para a criopreservação de ovócitos, surgiram dúvidas acerca do efeito que a mesma pudesse ter sobre a integridade do fuso meiótico, que leva, conseqüentemente, a anomalias cromossomáticas. A resolução destas dúvidas foi concretizada pela publicação de estudos que comprovaram não existir diferenças nas taxas de aneuploidia entre ovócitos vitrificados e a fresco [459, 460], ou nos padrões de alteração da expressão génica [461 – 463]. Estudos mostram ainda que a criopreservação de ovócitos mostrou não estar associada ao aumento de complicações obstétricas ou neonatais [407, 410, 464 - 468]. No entanto, mais estudos serão necessários para avaliar os efeitos da criopreservação a longo prazo [345].

2.7.3.3. Eficácia e segurança da técnica

Apesar da eficácia comprovada da criopreservação de ovócitos, a mesma não é capaz de assegurar o sucesso de um ciclo, e uma conseqüente gravidez, independentemente do número de ovócitos usados ou da qualidade dos mesmos. Um ciclo de criopreservação de ovócitos poderá ser acompanhado por várias falhas, entre

as quais a impossibilidade da criopreservação de ovócitos pelo facto de os mesmos não terem atingido a maturidade, degeneração dos ovócitos na descongelação, falha de fecundação, falha de desenvolvimento até à fase de blastocisto ou falha de implantação, muitas vezes induzida por anomalias no genoma do embrião [405]. É importante que ao iniciar um ciclo de criopreservação de ovócitos, se tenha em consideração que o mesmo não é garantia de sucesso, permitindo apenas aumentar as probabilidades de se atingir uma gravidez futura. O seu uso não deixa, no entanto, de ser motivado pelas graves consequências que uma gravidez proveniente de ovócitos de paciente de idade avançada traz, tais como risco de anomalias cromossómicas do embrião ou risco de aborto espontâneo [428]. É crucial, deste modo, que seja oferecido esclarecimento relativamente à possível falibilidade da técnica, nomeadamente os seus riscos e benefícios, taxas de sucesso e complicações que possam surgir a partir da mesma [469].

2.7.4. Procedimentos de criopreservação

2.7.4.1. Vitrificação de ovócitos e embriões

2.7.4.1.1. Ovócitos

Os ovócitos deverão ser desnudados, tal como descrito na secção 1.2.3.1, e imediatamente vitrificados 2 horas após punção folicular, de modo que a manter o período necessário de 4 horas entre recolha dos ovócitos e microinjeção, uma vez que a desvitrificação também será realizada 2 horas antes da microinjeção. Só os ovócitos que se apresentem maduros, ou seja, se apresentem em estado de metáfase II pela evidente aparência da extrusão do 1º GP, é que serão vitrificados.

Todos os meios são equilibrados à temperatura ambiente cerca de meia hora antes do processo de congelação. Antes do processo em si, deverão ser seleccionados os ovócitos que serão vitrificados, preparando-se o número de palhetas necessárias consoante o número de ovócitos a vitrificar. Todas as palhetas são devidamente identificadas. Previamente à vitrificação dos ovócitos, deverá ser preparado também um contentor com azoto líquido passível de ser usado em laboratório, para que a submersão dos ovócitos, e consequente arrefecimento dos mesmos, seja rápida e imediata.

O processo inicia-se pela deposição dos ovócitos numa gota de solução base que permite manter a viabilidade e integridade das células antes das mesmas serem expostas a altas concentrações de crioprotetores. Posteriormente, os ovócitos são colocados num meio de equilibração de forma faseada, de modo que os mesmos sejam gradualmente expostos a concentrações mais altas do meio, e portanto, a um meio mais

hipertónico. Todo o processo deverá durar entre 13 e 16 minutos. O último passo consiste na exposição dos ovócitos ao meio de vitrificação, através de uma passagem contínua entre sucessivas gotas de meio, processo que deverá ocorrer, idealmente, dentro de 1 minuto. Os ovócitos são imediatamente posicionados na extremidade da palheta, aspirando-se o excesso de meio que os rodeia, antes de se submergir a palheta no contentor de azoto líquido. A palheta deve ser agitada com algum vigor, de forma a prevenir a formação de bolhas de ar, mas também para acelerar o arrefecimento do meio. A palheta é posteriormente colocada dentro da sua parte externa, sem que a mesma seja emersa. As palhetas deverão ser armazenadas num contentor apropriado, na localização previamente definida.

2.7.4.1.2. Embriões

Os embriões poderão ser vitrificados em estado de zigoto (2PN), clivagem em 2º ou 3º dia, em mórula ou em blastocisto, sendo, no entanto, geralmente vitrificados em fase de mórula ou blastocisto.

Todos os meios são equilibrados à temperatura ambiente cerca de meia hora antes do processo de congelação. Tal como na criopreservação dos ovócitos, deverão ser selecionados os embriões que serão vitrificados, preparando-se o número de palhetas necessárias consoante o número de embriões a vitrificar. Todas as palhetas são devidamente identificadas. Previamente à vitrificação dos embriões, deverá ser preparado também um contentor com azoto líquido passível de ser usado em laboratório.

O processo da vitrificação dos embriões difere do dos ovócitos por excluir a primeira deposição num meio base, passando-se imediatamente à deposição dos embriões no meio de equilibração, onde os mesmos permanecem entre 10 a 15 minutos, dependendo da sua fase de desenvolvimento. Durante este tempo, é natural ocorrerem movimentos de expansão e encolhimento, fruto da entrada do crioprotetor. O último passo, semelhante ao processo de congelação dos ovócitos, consiste na exposição dos embriões ao meio de vitrificação, através de uma passagem contínua entre sucessivas gotas de meio, processo que deverá ocorrer, idealmente, dentro de 1 minuto. Os embriões são imediatamente posicionados na extremidade da palheta, sendo submersa no azoto líquido, tal como mencionado no procedimento anterior. O último passo consiste no armazenamento das palhetas no contentor apropriado.

2.7.4.2. Desvitrificação de ovócitos e embriões

O processo de desvitrificação de ovócitos e embriões é semelhante entre si, sendo que, para os ovócitos, estes deverão ser descongelados idealmente 2 horas antes da microinjeção, de maneira a possibilitar um período adequado de estabilização em cultura, e para os embriões, a descongelação será feita também 2 horas antes da transferência dos mesmos, permitindo avaliar corretamente a estabilização dos embriões e eventuais fenómenos de expansão, no caso de se tratar de blastocistos.

Todos os meios são preparados idealmente 1 hora antes do processo de descongelação, de forma que os mesmos estabilizem à temperatura ambiente, à exceção do primeiro meio de descongelação, que deverá ser aquecido a 37°C.

O processo de descongelação inicia-se com a seleção prévia da palheta a ser descongelada, identificação a localização da mesma. Após a recolha da palheta, a mesma deve ser submersa imediatamente num contentor pequeno, passível de ser utilizado em laboratório, cheio com azoto líquido. O contentor é transportado até ao laboratório de embriologia, onde se procederá à desvitrificação dos ovócitos ou embriões. Numa placa de poço central coloca-se o meio de descongelação previamente aquecido na estufa a 37°C e transfere-se para esse mesmo meio o ovócito ou embrião, através da submersão da ponta da palheta onde se encontram os mesmos. Os ovócitos ou embriões são posteriormente transferidos para o meio de diluição, e passados 3 minutos, para o meio de lavagem, onde residem durante 5 minutos. De seguida, são lavados novamente no meio da lavagem, antes de serem transferidos para uma placa com meio de cultura previamente preparada, sendo a placa colocada numa estufa a 37°C até ser utilizada.

2.7.4.3. Criopreservação de espermatozoides

A criopreservação de uma amostra seminal é precedida pelo mesmo método descrito na secção 1.1.2.2., que permite processar a amostra para a seleção dos melhores espermatozoides, e remoção de qualquer componente que possa comprometer a integridade da amostra a longo prazo.

Este processamento baseia-se, portanto, na centrifugação por gradientes de densidade, e posterior lavagem da amostra com meio de cultura. O último passo consiste na adição do meio crioprotetor, previamente equilibrado à temperatura ambiente, que deverá ser feita gota a gota, e com agitação, para evitar o choque osmótico. A amostra diluída é posteriormente carregada na palheta de congelação, que

deverá ser corretamente selada antes de ser colocada em vapor de azoto. Após cerca de 30 minutos, a palheta é armazenada no contentor de azoto líquido apropriado.

O processo de descongelação resume-se a um processo de lavagem da amostra criopreservada, para remoção do crioprotetor adicionado no momento da criopreservação. No dia anterior à descongelação, preparam-se os meios necessários, nomeadamente o meio de lavagem. O processo inicia-se com a recolha da palheta do contentor de azoto líquido, e a posterior imersão da mesma num tubo com água aquecida a 37°C, onde deverá permanecer durante 10 minutos, e idealmente dentro de uma estufa a 37°C. Após esse tempo, a palheta é seca com recurso a uma compressa esterilizada, e só depois se cortam as extremidades para que a amostra seja libertada para um tubo. Antes de se proceder à adição do meio de lavagem, avalia-se a taxa de recuperação da amostra, fazendo uma avaliação da sua motilidade ao microscópio. O meio de lavagem é posteriormente adicionado gota a gota, de modo a diluir o crioprotetor sem provocar um choque osmótico. O tubo com a amostra diluída em meio de lavagem é centrifugado durante 15 min, a 1000 rpm, e, logo de seguida, remove-se todo o conteúdo do tubo, deixando apenas o sedimento que corresponde aos espermatozoides. Ao sedimento adiciona-se uma quantidade mínima de meio de lavagem, que dependerá da concentração da amostra e da técnica de PMA a utilizar, e coloca-se o tubo em posição inclinada de modo que se inicie o *swim-up*.

2.8. Doação de gâmetas e embriões

O uso de serviços de doação de espermatozoides, ovócitos ou embrião tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas, proporcionando a casais de sexo diferente, casais de mulheres ou mulheres solteiras a possibilidade de alcançar a conceção, quando não é concebível fazê-lo de outra forma.

Em Portugal, e segundo o artigo 10.º da lei 32/2006 do Diário da República no âmbito da Procriação Medicamente Assistida, a doação de espermatozoides, ovócitos e embriões por terceiros é autorizada "(...) quando, face aos conhecimentos médico-científicos objetivamente disponíveis, não possa obter-se gravidez ou gravidez sem doença genética grave através do recurso a qualquer técnica que utilize os gâmetas dos beneficiários e desde que sejam asseguradas condições eficazes de garantir a qualidade de gâmetas."

A doação de gâmetas pode ser realizada por qualquer cidadão considerado saudável, ou seja, sem histórico de doenças genéticas, doenças transmissíveis sexualmente ou outras condições graves. Para que seja possível a doação, deverão ser

cumpridos certos requisitos, que diferenciam entre a doação de gâmetas femininos e masculinos. No caso da doação de ovócitos, a mulher deverá estar entre os 18 e os 34 anos, deverá ter menos de quatro doações e a última terá de ter ocorrido há mais de 3 meses. Para se proceder à doação de espermatozoides, o homem terá de ter entre 18 e 45 anos e deverá ter gerado crianças em menos do que oito famílias diferentes.

A doação de gâmetas e embriões é voluntária, de caráter altruísta e não remunerado. No entanto, e com exceção da doação de embriões, é descrito que os dadores de gâmetas tenham direito a uma compensação para reembolso das despesas efetuadas, ou para ressarcimento dos prejuízos resultantes da dádiva. A doação de gâmetas ou embriões é confidencial, não sendo permitido o acesso a qualquer informação que permita identificar os dadores ou dadoras. No entanto, e segundo a lei nº 48/2019 do Diário da República, publicada a 8 de julho “As pessoas nascidas em consequência de processos de PMA com recurso a dádiva de gâmetas ou embriões podem, junto dos competentes serviços de saúde, obter as informações de natureza genética que lhes digam respeito, bem como, desde que possuam idade igual ou superior a 18 anos, obter junto do Conselho Nacional de Procriação Medicamente Assistida informação sobre a identificação civil do dador.” Apesar da informação descrita, os dadores de gâmetas não têm quaisquer direitos ou obrigações parentais sobre as pessoas nascidas a partir da sua doação.

2.8.1. Doação de ovócitos

O processo de doação de ovócitos inicia-se com o agendamento de uma consulta com o médico ginecologista, para que se possa avaliar o historial médico e familiar da dadora e realizar uma avaliação ginecológica. Nessa mesma consulta são também apresentadas as condições de elegibilidade, e explicado todo o processo, incluindo possíveis complicações, riscos e benefícios. Caso a dadora pretenda avançar com o processo, é marcada uma consulta de psicologia, e a realização de análises clínicas, que incluem rastreios virais e genéticos. O processo de doação só avança caso os resultados das análises sejam considerados normais. Se assim o for, inicia-se a orientação terapêutica e a programação do ciclo da estimulação ovárica, que dura entre 10 e 15 dias, sendo que durante esse tempo, a dadora deverá ser continuamente monitorizada através da realização de ecografias para avaliar a resposta ovárica e prever o dia da punção folicular.

O recurso a doação de ovócitos poderá ser indicado em mulheres de idade reprodutiva avançada, ou com hipogonadismo hipergonadotrófico, reserva ovárica

diminuída, insuficiência ovárica prematura, em casos de várias tentativas falhas de conceção através de tratamentos de PMA, ou em caso de existir um historial de presença de condições genéticas [478].

2.8.2. Doação de espermatozoides

O processo de doação de espermatozoides inicia-se com o agendamento de um espermograma inicial de análise, para avaliar se o possível dador cumpre os requisitos mínimos, que são, entre eles, um valor de concentrações de espermatozoides acima dos 50 milhões, uma percentagem de motilidade progressiva acima dos 50% e mais do que 15% de espermatozoides com morfologia normal. Se o dador cumprir os requisitos, é marcada uma consulta com o médico especialista, para que se possa avaliar o historial médico e familiar, nomeadamente relativo a doenças hereditárias e doenças infecciosas transmissíveis. Nessa mesma consulta são também apresentadas as condições de elegibilidade, e explicado todo o processo, incluindo possíveis complicações, riscos e benefícios. Caso o dador queira avançar, são marcadas análises clínicas, que incluem os rastreios virais e genéticos. Se os resultados dos rastreios forem considerados normais, inicia-se a programação das dádivas, que consistem geralmente entre 6 e 9 colheitas de esperma, e cujo espaçamento deverá cumprir o período de abstinência obrigatório de 3 dias.

Todas as colheitas deverão ser realizadas com recurso a masturbação, e a amostra é processada em laboratório e posteriormente criopreservada, tal como descrito nas secções 1.1.2.2 e 2.7.4.3, respetivamente. Antes da 2ª colheita, é feito um teste de descongelação da 1ª colheita, como parte do controlo de qualidade da amostra. Todas as amostras congeladas ficam em quarentena durante 6 meses, e, após este período, são repetidos os rastreios virais, considerando-se como elegíveis para doação as amostras cujos resultados permaneçam negativos. Caso contrário, o dador é excluído do processo de doação.

O recurso à doação de espermatozoides é indicado, geralmente, em situações de azoospermia ou em casos de oligozoospermia severa, na eventualidade do paciente experienciar disfunção ejaculatória, em casos de remoção cirúrgica de testículos, em situação de risco de transmissão de doença genética hereditária, em casais de mulheres ou mulheres sem parceiro, ou em casos de várias tentativas falhas de conceção através de tratamentos de PMA [478].

2.8.3. Doação de embriões

A doação de embriões é geralmente indicada quando se verificam simultaneamente problemas associados ao aparelho reprodutor feminino e masculino, quando há falha de desenvolvimento embrionário em ciclos anteriores, quando há a probabilidade de transmissão de doença genética hereditária, ou em caso de falha recorrente de implantação [478].

Os embriões doados resultam de tratamentos de PMA em que se verificou a criopreservação de embriões supranumerários, e cuja doação foi previamente consentida pelo casal. A doação só é realizada mediante inutilização dos embriões após 3 anos de criopreservação. É importante que o casal dador tenha sido submetido a todas as análises médicas que um processo de doação requer, de modo a garantir a segurança do processo de doação.

O procedimento para doação de embriões inicia-se com a seleção do embrião ou embriões a doar, e o mesmo é desvitrificado, tal como descrito na secção 2.7.4.2, no dia da transferência embrionária. O endométrio da beneficiária deverá ser preparado previamente à transferência, para aumentar as probabilidades de implantação do embrião.

Capítulo 3 – Criopreservação de ovócitos : os efeitos da vitrificação na qualidade embrionária e respetivas taxas de sucesso

Paralelamente à realização do estágio, foi proposta a execução de uma análise científica retrospectiva que visasse avaliar os efeitos da vitrificação de ovócitos na qualidade embrionária e nas taxas de sucesso de ciclos de PMA, através da comparação entre ciclos com ovócitos utilizados a fresco e ovócitos vitrificados.

1.Introdução

A criopreservação de ovócitos tem como principal objetivo a preservação do potencial reprodutivo feminino através da congelação dos seus gâmetas, tendo alcançado uma evolução significativa desde o seu surgimento no final da década de 80 [344], depois de ser reportado o primeiro nascimento a partir de um ovócito vitrificado [402]. Apesar de, inicialmente, a criopreservação de ovócitos ter sido confrontada com desafios que suspenderam o seu progresso, nomeadamente limitações nas taxas de sucesso [345, 403], a técnica acabou por progredir consideravelmente, especialmente com o avanço da vitrificação. Esta última trata-se de uma técnica de congelação ultrarrápida, que utiliza altas concentrações de crioprotetores, tendo-se mostrado superior à técnica da congelação lenta [407, 444, 449], evidenciando melhores resultados relativamente às taxas de sobrevivência, de fecundação, à qualidade embrionária e ao sucesso na implantação e gravidez, tornando-se o método preferencial na criopreservação de ovócitos. A implementação da técnica permitiu ainda que se introduzisse o método da criopreservação em programas de doação de ovócitos, aumentando a exequibilidade e flexibilidade das técnicas de PMA. A criopreservação de ovócitos de dadora oferece inúmeras vantagens, entre as quais a eliminação da necessidade de sincronização entre ciclos de dadora e recetora e a redução de custos associados, enquanto mantém as altas taxas de sucesso que se observa em relação ao uso de ovócitos a fresco [413, 429, 430].

Em virtude do aumento exponencial da adoção de ciclos de criopreservação de ovócitos, o impacto da vitrificação na qualidade ovocitária e, consequentemente, na eficácia dos ciclos reprodutivos, tornou-se um foco central de pesquisa. Com o aumento do número de casos reportados, seja em contexto de preservação por motivos médicos ou por adiamento do projeto maternal, e com o aumento das evidências que suportam

a eficácia da técnica, a vitrificação rapidamente se estabeleceu como uma ferramenta crucial nas técnicas de PMA [417 – 419]. No entanto, e apesar das suas taxas de sucesso serem promissoras, a vitrificação continua a ter as suas limitações. O processo é tecnicamente exigente, e a viabilidade dos ovócitos descongelados não garante o sucesso de um ciclo, visto que os resultados podem ser influenciados por fatores tais como a idade feminina no momento da congelação, e a qualidade dos ovócitos [417 – 419]. Como tal, embora a vitrificação tenha provado ser uma ferramenta valiosa na medicina reprodutiva, é importante considerar estas variáveis na avaliação do seus potenciais benefícios e limitações.

Posto isto, o principal objetivo deste estudo será avaliar a eficácia da criopreservação de ovócitos através da comparação entre ciclos com ovócitos a fresco e ciclos de ovócitos vitrificados, ambos originários das mesmas dadoras. Para avaliação da eficácia da técnica, serão estimadas as taxas de sobrevivência e de fecundação dos ovócitos vitrificados, em paralelo com outros resultados laboratoriais relativos à qualidade embrionária. Resultados clínicos incluindo as taxas de implantação e de nados-vivos serão também considerados.

2. Métodos

2.1. Recolha de dados

O processo de recolha de dados iniciou-se pela seleção de todos os ciclos de doação de ovócitos realizados entre 2017 e 2024 nos quais o método de congelação utilizado fosse a vitrificação, tendo em atenção que, de entre todos os ciclos de doação selecionados, seriam excluídos aqueles que não apresentassem o uso dos ovócitos também em ciclos a fresco. Esta exclusão permitiu que se estabelecesse uma relação de comparação entre o uso de ovócitos a fresco ou criopreservados, provenientes da mesma dadora.

Num total foram selecionados 114 ciclos, entre os quais 61 correspondem a ciclos com ovócitos criopreservados, e os restantes 53 a ciclos com ovócitos usados a fresco. Os ciclos com ovócitos criopreservados recorrem na sua totalidade à ICSI como método de inseminação, em oposição aos ciclos com ovócitos a fresco, que se dividem entre o uso da FIV e ICSI.

Para todos os ciclos foram recolhidas informações tais como idade, peso e altura das dadoras, assim como das recetoras. Ainda referente às dadoras foram também

recolhidos dados referentes ao ciclo de doação em si, tais como número de ovócitos recolhidos, número de ovócitos usados a fresco e número de ovócitos criopreservados. Para cada um dos ciclos das recetoras, foram registados o número de ovócitos inseminados e fecundados, o número de embriões em clivagem, número de blastocistos e a sua respetiva classificação, número de embriões transferidos a fresco e/ou criopreservados, e respetivo sucesso das transferências a fresco e/ou transferências com embriões criopreservados, nomeadamente, registo de gravidez clínica e nascimento.

Foi necessário também proceder-se à seleção dos ciclos cujos parâmetros espermáticos, nomeadamente morfologia, número e motilidade progressiva dos espermatozoides, se situassem dentro dos valores de referência publicados pelo manual da OMS [119], de forma a assegurar que o fator masculino não constituísse uma variável no presente estudo. Desta maneira, amostras com valores de percentagem de morfologia normal e motilidade progressiva abaixo de 4% e 30%, respetivamente, e um número de espermatozoides abaixo de 39×10^6 , foram selecionadas, e os seus respetivos ciclos excluídos. Em consequência da presente condição no estudo, dos 115 ciclos inicialmente selecionados, apenas 81 foram incluídos no estudo, sendo divididos em dois grupos, um referente aos ciclos com ovócitos a fresco, e o outro a ciclos com ovócitos criopreservados, perfazendo, respetivamente, um total de 44 e 37 ciclos.

É importante referir ainda que alguns ciclos não foram excluídos apenas com base nos seus valores de parâmetros espermáticos, mas pelo simples facto de serem o respetivo equivalente a um dos ciclos excluído por essa mesma condição, o que implica que haja uma relação de comparação entre ambos, que apenas é mantida se ambos forem incluídos; como tal, a exclusão de um ciclo, por exemplo, do grupo dos ovócitos criopreservados, exige a exclusão do seu respetivo pertencente ao grupo dos ovócitos a fresco.

2.2. Preparação dos dados e análises estatísticas

2.2.1. Dadoras e recetoras – Idade e IMC

Para avaliação das características populacionais, foram registados os valores do peso, altura e idade de cada uma das dadoras e das suas correspondentes recetoras. Com os valores do peso e altura, foi calculado o índice de massa corporal, através da seguinte equação:

$$IMC = \frac{Peso \ (kg)}{Altura \ (cm)^2}$$

2.2.2. Distribuição dos ovócitos – avaliação quantitativa

Para cada um dos ciclos de doação registou-se o número de ovócitos recolhidos, e, para cada um dos ciclos correspondentes, o número de ovócitos usados a fresco e o número de ovócitos desnudados para efeito de criopreservação. Para o cálculo da taxa de sobrevivência, foi registado também o número de ovócitos sobreviventes à criopreservação, *i.e.*, o número dos ovócitos que foram efetivamente usados em ciclos com recurso a ovócitos vitrificados. As taxas de sobrevivência foram calculadas através da seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de sobrevivência} = \frac{N^{\circ} \text{ de ovócitos após desvitrificação}}{N^{\circ} \text{ total de ovócitos vitrificados}} \times 100$$

De modo a analisar a alocação dos ovócitos recolhidos entre os ciclos a fresco e ciclos com ovócitos criopreservados, procedeu-se ao cálculo das proporções entre o número de ovócitos usados a fresco em relação aos recolhidos, e entre o número de ovócitos desnudados em relação aos recolhidos. Posteriormente, calculou-se ainda a proporção entre o número de ovócitos que sobreviveram à desvitrificação, em relação ao número de ovócitos recolhidos.

2.2.3. Análise da inseminação e fecundação dos ovócitos

Em perspetiva de uma análise comparativa robusta dos resultados dos ciclos com ovócitos usados a fresco e ciclos com ovócitos criopreservados, avaliou-se o número médio de ovócitos inseminados e fecundados para cada um dos grupos e as respetivas taxas de fecundação para cada um dos ciclos, calculadas através da seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de fecundação} = \frac{N^{\circ} \text{ de ovócitos fecundados}}{N^{\circ} \text{ total de ovócitos inseminados}} \times 100$$

É importante referir que quaisquer ciclos cuja totalidade dos ovócitos degenerou no processo de desvitrificação foram removidos do cálculo das taxas de fecundação, uma vez que poderia reduzir artificialmente a taxa de fecundação, não refletindo o verdadeiro potencial fecundativo dos ovócitos em questão.

2.2.4. Desenvolvimento embrionário

Todos os ovócitos inseminados foram avaliados quanto ao seu desenvolvimento pós-fecundação, nomeadamente, registo dos padrões de clivagem, eventos de compactação e conseqüente formação de mórula, desenvolvimento do blastocisto e o seu nível de expansão e qualidade. A todos os blastocistos foi atribuído uma pontuação

de 1 a 3, dependendo da classificação que lhes foi atribuída, classificação baseada nos critérios de Istambul [171] (Tabela 5).

Tabela 5 – Pontuações atribuídas aos blastocistos, de acordo com a sua respetiva classificação.

Pontuação		Classificação		
1		BL2-1-1	BL3-1-1	BL4-1-1
		BL2-1-2	BL3-1-2	BL4-2-1
		BL2-2-1	BL3-2-1	BL2-1-2
2	BL1	BL2-2-2	BL3-2-2	BL4-2-2
		BL2-2-3	BL3-2-3	BL4-2-3
		BL2-3-2	BL3-3-2	BL4-3-2
3		BL2-3-3	BL3-3-3	BL4-3-3

Com base nos dados recolhidos, procedeu-se ao cálculo das taxas de clivagem, através do número de embriões em clivagem ao 2º dia obtido em cada um dos ciclos. O cálculo da taxa de clivagem foi feito a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de clivagem} = \frac{\text{Nº de ovócitos em clivagem (2º dia)}}{\text{Nº total de ovócitos fecundados}} \times 100$$

Recorrendo aos registos do número de embriões que se desenvolveram até ao estado de blastocisto, foi possível calcular a taxa de formação de blastocistos a partir do número total de ovócitos fecundados para cada um dos ciclos, através da seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de formação de blastocistos} = \frac{\text{Nº de blastocistos ao 5º dia}}{\text{Nº total de ovócitos fecundados}} \times 100$$

De entre todos os blastocistos registados em cada ciclo, foram considerados como de boa qualidade aqueles cuja classificação lhes proporcionasse a atribuição da pontuação mais alta. Recorrendo ao número de blastocistos de boa qualidade para cada ciclo, foi possível calcular a taxa de formação de blastocistos ao 5º dia através da seguinte fórmula:

$$\text{Blastocistos de boa qualidade} = \frac{\text{Nº de blastocistos de boa qualidade ao 5º dia}}{\text{Nº total de ovócitos fecundados}} \times 100$$

2.2.5. Taxa de implantação e taxa de nados-vivos

Para todos os ciclos, com ovócitos a fresco e ovócitos criopreservados, foram registadas a ocorrência de transferências a fresco e o seu posterior resultado, que se traduz na confirmação, ou não, de gravidez clínica, que é evidenciada pela presença de um saco gestacional no útero, observado através de ultrassonografia. Foi também registada a ocorrência de nascimento a partir das implantações registadas.

Para cada um dos ciclos foram ainda registadas as transferências realizadas a partir de embriões criopreservados, e os seus resultados posteriores, ou seja, possível confirmação de gravidez clínica e nascimento.

Foi calculada a taxa de implantação para o grupo dos ovócitos a fresco e para o grupo dos ovócitos vitrificados, considerando o número total de transferências, incluindo transferências com embriões a fresco (TEF) e transferências com embriões criopreservados (TEC), e o número de gravidezes clínicas registadas a partir de todas essas transferências. O cálculo foi realizado através da seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de implantação} = \frac{\text{Nº de gravidezes clínicas}}{\text{Nº total de transferências}} \times 100$$

O cálculo da taxa de nados-vivos foi realizado considerando o número de nascimentos entre o número total de transferências realizadas e entre o número total de gravidezes clínicas registadas, isto é, taxa de nados-vivos/transferência e taxa de nados-vivos/GC, respetivamente. O cálculo foi realizado tanto para o grupo dos ovócitos a fresco como para o grupo dos ovócitos vitrificados, através das seguintes fórmulas:

$$\text{Taxa de nados – vivos/transferência} = \frac{\text{Nº de nascimentos}}{\text{Nº total de transferências}} \times 100$$

$$\text{Taxa de nados – vivos/GC} = \frac{\text{Nº de nascimentos}}{\text{Nº total de gravidezes clínicas}} \times 100$$

2.2.6. Análises estatísticas

Toda a organização e processamento dos dados recolhidos foi feita com recurso ao programa Microsoft Excel, de onde também foram obtidos os gráficos de visualização dos dados, nomeadamente gráficos de barras e *box-plots*.

As análises estatísticas, descritivas e inferenciais, foram realizadas recorrendo ao software IBM SPSS Statistics v.29. Todas as variáveis contínuas foram testadas quanto à normalidade da distribuição utilizando o teste de *Shapiro-Wilk*, sendo que todas

elas, à exceção das proporções de ovócitos usados a fresco e ovócitos criopreservados usados, revelaram uma distribuição não normal dos dados ($p \leq 0,05$). Para estas últimas, foi utilizado o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*, enquanto que para as proporções de ovócitos usados a fresco e proporções de ovócitos criopreservados, aplicou-se o teste t de *Student* para variáveis independentes. Para a análise das variáveis categóricas independentes, nomeadamente taxas de implantação e taxas de nados-vivos, aplicou-se o teste de qui-quadrado de Pearson χ^2 . A significância estatística considerada foi de 5%.

As fórmulas utilizadas para o cálculo das taxas de sobrevivência, fecundação, clivagem, formação de blastocistos, blastocistos de boa qualidade e de implantação basearam-se nas fórmulas já descritas nos consensos de Viena [481].

3. Resultados

3.1. Análise descritiva e estatística dos resultados

3.1.1. Idade e IMC

A análise descritiva da população em estudo iniciou-se pela avaliação da distribuição dos valores da idade e IMC no grupo das dadoras (Tabela 6) e no das recetoras (Tabela 7), exercendo-se uma comparação entre as recetoras cujos ovócitos foram usados a fresco (F), ou foram desvitrificados (V). Para tal efeito, foram calculados os valores referentes à média, ao desvio padrão (DP), ao erro padrão (EP), à mediana e à amplitude interquartil (AI). Através destes últimos é possível verificar, naturalmente, que o valor médio de idades das dadoras se situa bem abaixo do das recetoras, ao contrário do valor médio do IMC, que aparenta ser semelhante entre ambos os grupos.

Foi possível verificar, através do teste não paramétrico de *Mann-Whitney* (Tabela 8), que não existem diferenças estatisticamente significativas, considerando um nível de significância de 5%, entre as idades ($p= 0.408$) e valores de IMC ($p=0.554$) registados nos grupos das recetoras dos ciclos com ovócitos a fresco e criopreservados, tornando-se assim aceitável reter a hipótese nula, que afirma que a distribuição da idade e IMC é igual para ambos os grupos.

Tabela 6 – Caracterização dos valores de idade e IMC das dadoras, com respetivos valores da média, desvio padrão (DP), erro padrão (EP), mediana, amplitude interquartil (AI) e amplitude com valor mínimo e máximo.

		Média ± DP	EP	Mediana	AI	Amplitude
D	Idade	25,189 ± 3,430	0,564	25	5	18 - 31
	IMC	23,437 ± 3,805	0,672	22,4	3,85	18,4 - 40,6

Tabela 7 - Caracterização dos valores de idade e IMC das recetoras no grupo dos ovócitos usados a fresco (F) e grupo dos ovócitos vitrificados (V) com respetivos valores da média, desvio padrão (DP), erro padrão (EP), mediana, amplitude interquartil (AI) e amplitude com valor mínimo e máximo.

			Média ± DP	EP	Mediana	AI	Amplitude
R	Idade	F	42,432 ± 4,459	0,672	43	4,75	30 - 49
		V	43,514 ± 3,175	0,537	44	5	36 - 49
	IMC	F	24,748 ± 5,452	0,822	23,25	7,3	18,2 – 40,6
		V	23,931 ± 4,527	0,765	23	6,1	18,2 – 36,1

Tabela 8 - Teste não paramétrico de *Mann-Whitney* para avaliação da existência de diferenças significativas entre as idades e os valores do IMC entre os grupos de recetoras.

	N	U de Mann-Whitney	Estatística de teste padronizada (ETP)	p
Idade	79	853,500	0,828	0,408
IMC	79	710,000	-0,592	0,554

3.2.2. Avaliação quantitativa da recolha e distribuição dos ovócitos

Para cada um dos ciclos de doação foram registados o número de ovócitos recolhidos e a sua respetiva distribuição entre ciclos a fresco e ciclos com recurso a vitrificação. Para uma correta avaliação desta distribuição, foram registados o número de ovócitos usados a fresco, o número de ovócitos desnudados para efeitos de vitrificação, o número dos ovócitos que se encontravam maduros, o número de ovócitos vitrificados, e os que sobreviveram à desvitrificação e que, portanto, foram usados.

Tabela 9 – Quantificação dos ovócitos usados para os ciclos de tratamento: número total dos ovócitos recolhidos, usados a fresco, desnudados, maduros, vitrificados e usados, e respetivos valores da média, desvio padrão (DP), erro padrão, mediana e respetiva amplitude interquartil (IQR) e amplitude com valores mínimos e máximos.

	Total	Média ± DP	Erro padrão	Mediana (IQR)	Amplitude
Recolhidos	969	26,189 ± 9,049	1,488	23 (13)	15-50
Usados a fresco	498	13,459 ± 5,242	0,862	12 (2)	8-30
Desnudados	470	12,702 ± 6,073	0,998	10 (7)	6-29
Maduros	367	9,918 ± 4,251	0,699	9 (5)	4-19
Vitrificados	367	9,919 ± 4,252	0,699	9 (5)	4-19
Usados	245	6,622 ± 3,191	0,525	7 (3)	0-16

Através de uma análise geral dos valores médios (Tabela 9), é possível inferir que a partir do total dos ovócitos recolhidos para cada um dos ciclos, foi feita uma distribuição equivalente entre o grupo dos ovócitos usados a fresco e o grupo dos ovócitos que sofrerão um processo de desnudação para posteriormente serem vitrificados⁹, observando-se uma média aproximada de 13 e 12 ovócitos usados em cada um dos grupos, respetivamente.

No entanto, e apesar desta presente igualdade de distribuição, o número de ovócitos disponível para uso vai diminuindo, tal como é evidenciado pela diminuição de um número médio de 12 ovócitos desnudados, para apenas 6 ovócitos usados, e também pela diminuição da amplitude para cada uma das categorias. O gráfico de barras 1 apresenta a distribuição da frequência de ciclos de acordo com o número de ovócitos recolhidos, usados a fresco, desnudados, maduros, criopreservados e criopreservados usados, agrupados em intervalos específicos. Este gráfico permite representar visualmente o fenómeno descrito anteriormente, observando-se um aumento gradual da frequência de um menor número de ovócitos disponível por ciclo.

⁹ Na tabela 9, o número de ovócitos desnudados refere-se apenas e exclusivamente àqueles que foram desnudados para efeitos de vitrificação, sendo que os ovócitos que foram desnudados para serem usados em ciclos de ICSI a fresco estão incluídos no grupo de ovócitos usados a fresco. Esta exclusão foi feita apenas por motivos de comparação entre ciclos com ovócitos a fresco e ciclos com ovócitos vitrificados.

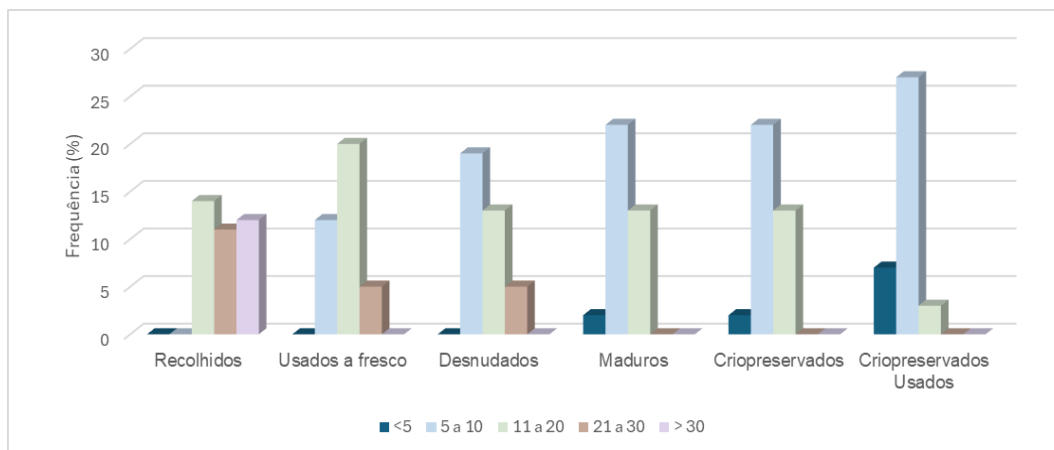


Gráfico 1 – Distribuição do número de ciclos conforme quantidade de ovócitos utilizados. No eixo do X, os ovócitos estão divididos em intervalos de 0 a 5, 5 a 10, 11 a 20, 21 a 30 e mais de 30, sendo que cada intervalo é representado pelas barras. O eixo do Y representa a frequência de ciclos que possuem um número de ovócitos dentro desses intervalos.

De maneira a reforçar esta observação, foram calculadas as proporções de ovócitos entre cada uma das categorias (Tabela 10), observando-se uma diminuição significativa entre a proporção média dos ovócitos desnudos sobre os ovócitos recolhidos ($0,477 \pm 0,107$) e a proporção dos ovócitos criopreservados usados sobre os recolhidos ($0,265 \pm 0,126$).

Tabela 10 - Proporções de ovócitos calculadas para o número de ovócitos usados a fresco, desnudos e criopreservados usados, em relação ao número de ovócitos recolhidos. Apresentação dos valores da média, desvio padrão (DP), erro padrão, mediana e respetiva amplitude interquartil (IQR), e amplitude com números mínimo e máximo.

Proporções de ovócitos	Média $\pm$ DP	Erro padrão	Mediana (IQR)	Amplitude
Usados a fresco / recolhidos	$0,522 \pm 0,105$	0,017	0,526 (0,086)	0,343 – 0,742
Desnudos / recolhidos	$0,477 \pm 0,107$	0,017	0,473 (0,086)	0,225 – 0,657
Criopreservados usados / recolhidos	$0,265 \pm 0,126$	0,021	0,278 (0,181)	0 – 0,473

Em consequência da diminuição da disponibilização gradual dos ovócitos, é previsível que o número de ovócitos disponível para uso em ciclos de vitrificação seja reduzido em relação ao número de ovócitos disponível em ciclos a fresco, apesar de a distribuição ter sido efetivamente igualitária. Após ter sido confirmada a normalidade da distribuição das variáveis ($p > 0,05$), realizou-se um teste t de *Student* para amostras independentes (Tabela 11), para um nível de significância de 5%, onde se revelou existir uma diferença estatisticamente significativa entre as proporções de ovócitos usados a fresco e ovócitos vitrificados passíveis de serem usados ($p < 0,001$), rejeitando-se assim a hipótese nula que afirma que não existem diferenças entre os grupos.

Tabela 11 – Teste t de *Student* para amostras independentes para avaliação da existência de diferenças estatisticamente significativas entre as proporções de ovócitos usados a fresco e ovócitos criopreservados usados, em relação aos ovócitos recolhidos.

Proporção	N	t	gl	p
Ovócitos usados a fresco – Ovócitos criopreservados usados	37	9,537	72	< 0,001

A taxa de sobrevivência (Tabela 12), calculada para efeitos de avaliação da desvitrificação de ovócitos, revelou um valor médio acima dos 80% (89,125%), ou seja, em média, para cada 10 ovócitos vitrificados, 8 sobrevivem ao processo de desvitrificação.

Tabela 12 – Taxa de sobrevivência. Apresentação dos valores da média, desvio padrão (DP), erro padrão, mediana e amplitude interquartil (IQR).

	Média $\pm$ DP	Erro padrão	Mediana (IQR)
Taxa de sobrevivência	89,135 $\pm$ 34,668	5,70	88,88 (25)

3.2.3. Análise da inseminação e fecundação dos ovócitos: quantidade e taxas

A análise do número médio de ovócitos inseminados por grupo (Tabela 13) vem reiterar a observação feita no último ponto, que afirma que o número de ovócitos usados, e portanto inseminados, são efetivamente diferentes entre os ciclos a fresco e os ciclos de ovócitos vitrificados, observando-se um número médio de 11 e 7 ovócitos inseminados, respetivamente.

Tabela 13 – Número de ovócitos inseminados, fecundados e respetivas taxas de fecundação para os grupos de ciclos com ovócitos a fresco (F) e ciclos com ovócitos vitrificados (V). Apresentação do número total e valores da média, desvio padrão (DP), erro padrão, mediana e respetiva amplitude interquartil (IQR), e amplitude com valores mínimo e máximo.

		Total	Média ± DP	Erro padrão	Mediana (IQR)	Amplitude
Inseminados	F	498	11,318 ± 1,709	0,258	11,5 (2)	8 - 16
	V	245	7,206 ± 1,903	0,326	7 (2)	4 - 13
Fecundados	F	479	10,886 ± 2,243	0,338	11 (2)	5 - 16
	V	171	5,029 ± 1,992	0,342	5 (2)	1 - 13
Taxa de fecundação	F		95,984 ± 11,937	1,799	100 (0)	50 - 100
	V		70,496 ± 20,398	3,498	73,2 (29)	20 - 100

Em termos absolutos, verifica-se uma diminuição significativa no número de ovócitos fecundados em relação ao número de ovócitos inseminados no grupo dos ovócitos vitrificados (171 ovócitos fecundados de 245 ovócitos inseminados), comparativamente ao dos ovócitos em ciclos a fresco (479 ovócitos fecundados de 498 ovócitos inseminados). Esta diminuição é evidenciada no diagrama de caixa, ou *boxplot*, apresentado no gráfico 2, através de um claro desvio do intervalo interquartil da caixa que representa a fecundação no grupo dos ovócitos vitrificados, em relação à caixa que representa a inseminação no mesmo grupo, sendo que o mesmo não se observa para o grupo dos ovócitos usados a fresco. Em termos médios, esta observação traduz-se numa diferença significativa entre o número médio de ovócitos inseminados entre ambos os grupos, e, consequentemente, entre as taxas de fecundação para cada grupo, que são, respetivamente, aproximadamente 95% e 70% (Tabela 13).

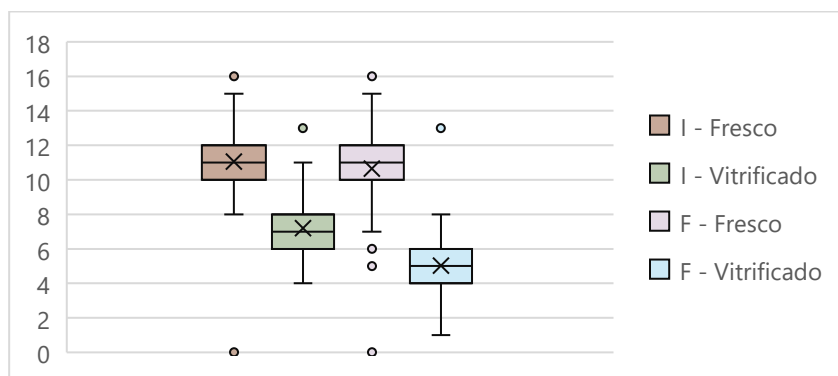


Gráfico 2 – Diagrama de caixa que representa as diferenças na distribuição dos ovócitos inseminados (I) e fecundados (F) entre o grupo de ovócitos a fresco e grupo de ovócitos vitrificados. Cada uma das linhas centrais das caixas representam o valor da mediana, enquanto os limites das caixas, referentes ao 1º e ao 3º quartil, e os extremos das linhas, referentes aos valores máximo e mínimo, representam a dispersão dos dados.

Através de um teste de *Mann-Whitney* (Tabela 14), e considerando um nível de significância de 5%, foi possível confirmar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos dos ciclos com ovócitos a fresco e dos ciclos com ovócitos vitrificados no número de ovócitos inseminados ($p=0,000$) e fecundados ($p=0,000$), e também para as taxas de fecundação ($p=0,000$).

Tabela 14 – Teste não paramétrico de *Mann-Whitney* para avaliação das diferenças estatisticamente significativas para o número de ovócitos inseminados, fecundados e respetivas taxas de fecundação, entre os grupos de ovócitos usados a fresco e grupos de ovócitos vitrificados.

	N	U de Mann-Whitney	ETP	p
Nº de ovócitos inseminados	78	82,000	-6,774	0,000
Nº de ovócitos fecundados	78	64,000	-6,944	0,000
Taxa de fecundação	78	197,500	-6,082	0,000

3.2.4. Análise do desenvolvimento embrionário

A avaliação do desenvolvimento embrionário para cada um dos grupos consistiu no registo do número de embriões que efetivamente entraram em processo de divisão e, portanto, em clivagem, e se desenvolveram até à fase de blastocisto.

Assim como o número de ovócitos inseminados, também o número médio de embriões em clivagem revelou ser significativamente inferior no grupo dos ciclos com ovócitos vitrificados ($4,706 \pm 2,153$), em comparação com o dos ovócitos a fresco ($8,795$

$\pm 2,278$) (Tabela 15). O valor médio das taxas de clivagem dos ciclos com ovócitos vitrificados revelou-se, no entanto, superior ao valor dos ciclos com ovócitos a fresco, tendo-se confirmado, através de um teste de *Mann-Whitney*, a existência de diferenças estatisticamente significativas, considerando um nível de significância de 5%, tanto para as taxas de clivagem ($p=0,000$), como para o número de embriões em clivagem ($p=0,000$) entre ambos os grupos (Tabela 17), levando à rejeição da hipótese nula que afirma que ambos os grupos teriam uma distribuição de embriões em clivagem, e consequentemente, uma taxa de clivagem, equivalente.

Tabela 15 – Número total de embriões em clivagem e respetivas taxas de clivagem para o grupo dos ovócitos a fresco (F) e grupo dos ovócitos vitrificados (V). Apresentação dos valores da média, desvio padrão (DP), erro padrão, mediana e respetiva amplitude interquartil (IQR) e amplitude com valores mínimo e máximo.

		Total	Média $\pm$ DP	Erro padrão	Mediana (IQR)	Amplitude
Embriões em Clivagem	F	387	8,795 $\pm$ 2,278	0,343	9 (3)	5 - 14
	V	160	4,706 $\pm$ 2,153	0,369	4 (3)	1 - 13
Taxa de clivagem	F		81,399 $\pm$ 14,987	2,259	83,333 (20,98)	50 - 100
	V		93,039 $\pm$ 14,281	2,449	100 (4,17)	40 - 100

A tendência da diminuição do número de embriões mantém-se para o grupo dos ovócitos vitrificados em fase de blastocisto (Tabela 16), ainda que esta diminuição, para além de poder continuar a ser justificada pelos efeitos cumulativos da desigualdade do número de ovócitos inseminados, possa dever-se também à exclusão de um número considerável de ciclos, pelo facto de o desenvolvimento dos seus embriões não ter sido estendido até ao 5º dia e, por isso, não haver a oportunidade de evolução do embrião até à fase de blastocisto. Incluir esses ciclos e simplesmente aceitar a ausência de blastocistos como uma completa incapacidade de os embriões em causa os desenvolverem, e de forma eficaz, seria prejudicial para a integridade da análise dos dados.

Ao analisar os dados relativos ao número existente de blastocistos por ciclo através do teste de *Mann-Whitney* (Tabela 17) foi possível confirmar a existência de

diferenças estatisticamente significativas entre o grupo dos ciclos com ovócitos a fresco e o grupo com ovócitos vitrificados ($p = 0,000$), considerando um nível de significância de 5%. O mesmo foi confirmado para o número de blastocistos de boa qualidade, que se manteve diferente para ambos os grupos em análise ($p = 0,002$) (Tabela 17). Existem assim evidências para rejeitar a hipótese nula e assumir que entre os ciclos com ovócitos usados a fresco e os ciclos com ovócitos vitrificados, a distribuição do número de blastocistos e, conseqüentemente, de blastocistos de boa qualidade, é diferente.

Tabela 16 - Número total de blastocistos e blastocistos de boa qualidade, e respetivas taxas de formação de blastocistos e de blastocistos de boa qualidade para o grupo dos ovócitos a fresco (F) e grupo dos ovócitos vitrificados (V). Apresentação dos valores da média, desvio padrão (DP), erro padrão, mediana e respetiva amplitude interquartil (IQR) e amplitude com valores mínimo e máximo.

		Total	Média $\pm$ DP	Erro padrão	Mediana (IQR)	Amplitude
Blastocistos	F	268	6,232 $\pm$ 2,662	0,406	6 (4)	1 - 11
	V	89	2,967 $\pm$ 1,938	0,354	3 (2)	0 - 9
Blastocistos de boa qualidade	F	119	2,767 $\pm$ 2,102	0,321	2 (3)	0 - 8
	V	37	1,370 $\pm$ 1,114	0,214	1 (1)	0 - 5
Taxa de formação de blastocistos	F		57,445 $\pm$ 22,253	3,393	58,333 (33,33)	9,1 - 91,7
	V		54,752 $\pm$ 25,877	4,724	58,572 (37,5)	0 - 100
Taxa de blastocistos de boa qualidade	F		25,212 $\pm$ 18,075	2,756	25 (29,2)	0 - 72,7
	V		22,91 $\pm$ 18,719	3,418	25 (33,3)	0 - 71,4

As taxas de formação de blastocistos e de blastocistos de boa qualidade, mostraram-se, contrariamente ao observado nas últimas análises, semelhante entre os grupos em análise, evidenciando valores médios percentuais semelhantes entre os grupos de ovócitos usados a fresco e vitrificados – 57,4% e 54,7% para as taxas de formação de blastocistos e 25,2% e 22,9% para as taxas de blastocistos de boa

qualidade (Tabela 16). Esta aparente aproximação foi corroborada pelos resultados do teste de *Mann-Whitney*, que revelaram valores de P ($p= 0,827$; $p= 0,660$) acima do nível de significância considerado (5%) (Tabela 17), retendo-se, portanto, a hipótese nula assumida, que afirma não existirem diferenças estatisticamente significativas entre ambos os grupos.

Tabela 17 - Teste não paramétrico de *Mann-Whitney* para avaliação das diferenças estatisticamente significativas para o número de embriões em clivagem e respetivas taxas de clivagem, número de blastocistos, número de blastocistos de boa qualidade e respetivas taxas de formação de blastocistos e blastocistos de boa qualidade.

	N	U de Mann-Whitney	ETP	p
Embriões em clivagem	78	127,5	-6,284	0,000
Taxa de clivagem	78	1128,5	4,023	0,000
Blastocistos	73	216,00	-4,841	0,000
Blastocistos de boa qualidade	70	334,00	-3,039	0,002
Taxa de formação de blastocistos	73	625,5	-0,219	0,827
Taxa de blastocistos de boa qualidade	73	606,00	-0,440	0,660

3.2.5. Resultados clínicos – Taxas de implantação e de nados-vivos

As taxas de implantação e de nados-vivos representam, em última análise, as taxas de sucesso para ambos os ciclos, que se traduzem, respetivamente, numa gravidez clínica e num nascimento.

Para ambos os grupos de ovócitos, foram contabilizadas para o cálculo das taxas de implantação o número de transferências que demonstraram sucesso na implantação do embrião, entre todas as transferências realizadas, incluindo transferências com embriões a fresco e embriões vitrificados.

Devido à maior prevalência de insucessos entre as transferências realizadas em ambos os grupos em análise, os valores percentuais das taxas de implantação situaram-se abaixo dos 50% - 38,1% e 44,0% para o grupo dos ovócitos a fresco e dos ovócitos

vitrificados, respetivamente (Tabela 18). O mesmo se verificou para as taxas de nados-vivos por transferência, onde a superioridade observada no número de insucessos reflete as percentagens observadas para ambos os grupos em análise – 27,4% para o grupo de ovócitos a fresco e 32% para o grupo de ovócitos vitrificados (Tabela 19).

Tabela 18 - Representação do número total de casos de sucesso e insucesso de implantação entre todas as transferências realizadas (contagem) e taxas de implantação (percentagens de sucesso destacadas) para os grupos de ovócitos a fresco e grupos de ovócitos vitrificados.

		Implantação		Total
		Sucesso	Insucesso	
Fresco	Contagem	32	52	84
	Percentagem	38,1%	61,9%	100,0%
Vitrificado	Contagem	22	28	50
	Percentagem	44,0%	56,0%	100,0%

A contabilização do número de nascimentos entre todas as transferências com implantação confirmada revelou-se, contrariamente ao sucedido na última análise, mais promissora, com o número de sucessos a sobrepor-se ao número de insucessos (Tabela 19), tanto para o grupo dos ovócitos a fresco, como para o grupo dos ovócitos vitrificados, registando-se, consequentemente, taxas de nados-vivos acima dos 50% - 71,9% e 72,7% para o grupo dos ovócitos a fresco e vitrificados, respetivamente.

Verificou-se, pelo teste do Qui-quadrado de *Pearson* (Tabela 20), que, para uma significância de 5%, não existiam diferenças estatisticamente significativas para as taxas de implantação ($p=0,500$) entre os grupos de ovócitos a fresco e ovócitos vitrificados, retendo-se assim a hipótese nula que assume uma distribuição igual de sucessos na implantação entre ambos os grupos em análise. O mesmo se verificou para as taxas de nados-vivos/GC ($p=0,569$) e nados-vivos/transferência ($p=0,945$), assumindo-se, analogamente às taxas de implantação, uma distribuição igual de sucessos nos nascimentos entre ambos os grupos em análise (Tabela 20).

Tabela 19 – Representação do número total de casos de sucesso e insucesso de nascimentos entre todas as implantações registadas (nados-vivos / GC) e de nascimentos entre todas as transferências registadas (nados-vivos / transferências), e respetivas taxas de sucesso (percentagens destacadas) para o grupo dos ovócitos usados a fresco e grupo dos ovócitos vitrificados.

		Nados-vivos / GC		Total
		Sucesso	Insucesso	
Fresco	Contagem	23	9	32
	Percentagem	71,9%	28,1%	100,0%
Vitrificado	Contagem	16	6	22
	Percentagem	72,7%	27,3%	100,0%
		Nados – vivos / Transferências		Total
		Sucesso	Insucesso	
Fresco	Contagem	23	61	84
	Percentagem	27,4%	72,6%	100,0%
Vitrificado	Contagem	16	34	50
	Percentagem	32,0%	68,0%	100,0%

Tabela 20 - Teste de Qui-Quadrado de Pearson para avaliação das diferenças estatisticamente significativas para as taxas de implantação e taxas de nados-vivos.

	χ^2	gl	Valor p
Taxa de implantação	0,454	1	0,500
Taxa de nados-vivos/GC	0,005	1	0,945
Taxa de nados-vivos	0,324	1	0,569

4. Discussão

O método pelo qual se procede à congelação e armazenamento dos ovócitos de uma paciente do sexo feminino, *i.e.*, criopreservação de ovócitos, tornou-se numa ferramenta essencial nas técnicas de PMA [417], nomeadamente na preservação da fertilidade feminina [470]. Tradicionalmente, a criopreservação era realizada através do método de congelação lenta, cujas taxas de sobrevivência permaneceram baixas [442], em simultâneo com as taxas de nados-vivos [443], independentemente dos esforços realizados em prol da otimização do protocolo, de maneira a minimizar os danos provocados pela congelação e descongelação. A introdução da vitrificação como método de congelação rápida assinalou-se como um importante marco no desenvolvimento das práticas da criopreservação [443]. A vitrificação previne a formação de cristais de gelo ao solidificar os ovócitos até a um estado vítreo, resultando no aumento das taxas de sobrevivência, de fecundação, e numa melhoria dos resultados decorrentes do desenvolvimento embrionário após descongelação [470]. A possibilidade de os ovócitos serem criopreservados de forma segura e eficaz, resultando em altas taxas de sobrevivência [408, 412, 415, 458], em simultâneo com a flexibilidade inerente ao método e aplicações da técnica [344, 420], levou a que a implementação da mesma fosse generalizada como método preferencial de congelação [470]. Como tal, é crucial avaliar rigorosamente os impactos da técnica sobre os resultados dos ciclos, e se, conseqüentemente, serão comparáveis a ciclos com ovócitos a fresco.

Deste modo, o presente estudo teve como principal objetivo a comparação dos resultados de ciclos com ovócitos a fresco e ovócitos vitrificados, sendo os ovócitos provenientes da mesma dadora. Através da avaliação das taxas de fecundação, desenvolvimento embrionário, taxas de implantação e de nados-vivos entre os dois grupos, o estudo permitiu determinar o impacto da vitrificação sobre a qualidade dos ovócitos, e a sua capacidade em gerar uma gravidez futura.

O cálculo das taxas de sobrevivência dos ovócitos vitrificados revelou um valor médio de 89,1%, sugerindo a alta eficácia do processo de vitrificação na preservação da integridade e viabilidade dos ovócitos. Este valor alinha-se com resultados reportados por estudos anteriores [414 – 416, 451, 475, 476], reforçando a eficácia das técnicas de vitrificação atualmente aplicadas, que permitem aumentar as probabilidades de sucesso nas técnicas de PMA. As altas taxas de sobrevivência evidenciadas poderiam, à primeira vista, sugerir que o número de ovócitos disponíveis para inseminação seria satisfatório e comparável ao do grupo dos ovócitos usados a fresco. No entanto, é importante considerar que outras variáveis poderão influenciar

negativamente o *pool* de ovócitos disponível para inseminação, nomeadamente a maturidade ovocitária e o número de ovócitos efetivamente descongelados. Desta forma, e apesar das altas taxas de sobrevivência, o impacto combinado das variáveis levou à redução do número de ovócitos disponível para inseminação, em comparação com o grupo de ovócitos a fresco, confirmado pelo facto de haver de uma diferença, estatisticamente significativa, entre a proporção de ovócitos usados para os ciclos de ovócitos a fresco e vitrificados ($0,522 \pm 0,105$ vs $0,265 \pm 0,126$; $p < 0,001$).

A redução na disponibilidade de ovócitos no grupo dos ciclos com ovócitos vitrificados leva, naturalmente, à redução do número médio de ovócitos fecundados neste grupo, apresentando diferenças estatisticamente significativas quando comparado com o grupo dos ovócitos a fresco ($10,886 \pm 2,243$ vs $5,029 \pm 1,992$; $p = 0,000$). O impacto que a vitrificação poderá ter exercido sobre a capacidade fecundante dos ovócitos, e, conseqüentemente, sobre o número médio de ovócitos fecundados, não deverá, no entanto, ser descartado, uma vez que as taxas de fecundação são significativamente mais baixas para o grupo dos ovócitos vitrificados, apresentando diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo dos ovócitos a fresco (96% vs 70,5%; $p = 0,000$). Em conformidade com os resultados anteriores estão os valores médios do número de embriões em clivagem ao 2º dia ($8,795 \pm 2,278$ vs $4,706 \pm 2,153$; $p = 0,000$), do número de blastocistos ($6,232 \pm 2,662$ vs $2,967 \pm 1,938$; $p = 0,000$) e, conseqüentemente, de blastocistos de boa qualidade ($2,767 \pm 2,102$ vs $1,370 \pm 1,114$; $p = 0,002$), que se apresentaram mais baixos para o grupo dos ovócitos vitrificados, em comparação com o grupo dos ovócitos a fresco. Mais uma vez, o efeito cumulativo da redução inicial do *pool* de ovócitos contribui para a redução do número de ovócitos fecundados e, conseqüentemente, do número de embriões que entram em clivagem e se desenvolvem até à fase de blastocisto, uma vez que, com menos ovócitos, menores são as probabilidades de atingir um número médio de embriões por ciclo semelhante ao do grupo de ovócitos usados a fresco.

Contrariamente ao observado para a distribuição do número de embriões em clivagem, de blastocistos, e de blastocistos de boa qualidade, as taxas de formação de blastocistos (57,4% vs 54,7%; $p=0,827$) e taxas de blastocistos de boa qualidade (25,2% vs 22,9%; $p=0,660$) apresentaram valores semelhantes entre os grupos em análise, confirmando-se uma distribuição equivalente entre os mesmos, sem diferenças estatisticamente significativas entre si, relatando-se, ademais, uma superioridade nas taxas de clivagem no grupo de ovócitos vitrificados (81,4% vs 93,0%; $p = 0,000$). Esta divergência de resultados poderá ser justificada pelo facto da eficiência do

desenvolvimento dos ovócitos fecundados ser semelhante entre ambos os grupos em análise, ainda que o número de embriões gerado por ciclo seja significativamente maior no grupo dos ovócitos a fresco, em virtude de uma maior quantidade de ovócitos disponibilizados. No que se refere aos resultados clínicos, as taxas de implantação apresentaram-se abaixo dos 50% para ambos os grupos de ovócitos, não apresentando diferenças estatisticamente significativas entre si (38,1% vs 44,0%; $p = 0,500$). O mesmo sucede para as taxas de nados-vivos, que não apresentam diferenças estatísticas entre os grupos, apesar de estas apresentarem valores mais altos (71,9% vs 72,7%; $p = 0,945$) quando comparado com as taxas de implantação, o que sugere que, a partir do momento em que o embrião tenha capacidade para implantar, o mesmo terá alta probabilidade de se desenvolver a termo, a não ser que haja alguma alteração genética que o impeça. A ausência de diferenças significativas entre as taxas de nados-vivos indica que a qualidade dos embriões implantados é consistente entre os grupos, independentemente se provêm de ovócitos usados a fresco ou ovócitos vitrificados.

Esta análise mostra que, independentemente da diminuição do número médio de ovócitos disponível para o grupo de ciclos com ovócitos vitrificados, os mesmos são capazes de manter uma qualidade de desenvolvimento comparável à do grupo de ovócitos usados a fresco, levando a resultados clínicos semelhantes entre os dois grupos em análise. O mesmo se verificou no estudo publicado por Domingues *et al.* [473], onde, apesar da evidente diferença entre o número de ovócitos disponível entre os grupos, as taxas de implantação revelaram-se semelhantes, assinalando a eficiência do procedimento. A ideia de que alocação diferenciada de ovócitos poderá impor uma limitação aos resultados presentes é apoiada por Cobo *et al.* [430] e pelo documento instrutório publicado pela ASRM em 2021 [470], que justifica o declínio nas taxas de implantação e de nados-vivos apresentado por Kushnir *et al.* [474] com base na diferenciação da alocação dos ovócitos.

Adicionalmente, foi calculada a taxa de nados-vivos por transferências realizadas, resultando em valores mais baixos comparativamente às taxas de nados-vivos calculadas a partir do número de implantações registadas. Especificamente, a taxa de nados-vivos por transferência foi de 27,4% para o grupo de ovócitos a fresco e 32% para o grupo de ovócitos vitrificados, em comparação com 71,9% e 72,7%, respetivamente, para as taxas de nados-vivos sobre o número de implantações. Esta discrepância de resultados pode ser explicada pelo facto de que, ao calcular a taxa de nados-vivos a partir das gravidezes clínicas registadas, a diferença entre o número de nascimentos e o número de implantações é relativamente pequena, o que reflete uma

alta probabilidade de ocorrência de nascimento a partir das implantações bem-sucedidas, contrariamente à baixa probabilidade que se observa em relação à realização de uma transferência.

Com base nos resultados do presente estudo, pressupõe-se que o declínio reportado no número de ovócitos fecundados e respetivas taxas de fecundação para o grupo de ovócitos vitrificados, contrariamente ao que se observa em estudos anteriores [412 - 415, 471, 472], poderá dever-se ao efeito da diminuição do *pool* de ovócitos inseminados no grupo de ovócitos vitrificados, mas também ao impacto negativo que a vitrificação poderá ter exercido sobre a capacidade fecundante dos ovócitos, o que resulta numa consecutiva diminuição do número de embriões gerados por ciclo no grupo dos ovócitos vitrificados, em relação ao grupo dos ovócitos a fresco. A ausência de diferenças estatisticamente significativas nas taxas de formação de blastocistos e de blastocistos de boa qualidade entre os grupos de ovócitos analisados, e a superioridade reportada nas taxas de clivagem no grupo de ovócitos vitrificados, leva a crer que os ovócitos que efetivamente foram fecundados mantiveram a sua viabilidade e capacidade de desenvolvimento ideal, revelando-se equivalente à dos ovócitos dos ciclos a fresco. Adicionalmente, as taxas de implantação e as taxas de nados-vivos/GC também apresentaram valores semelhantes entre os grupos. O estudo apresentado por Goldman *et al.* [477], que reporta, apesar de uma diminuição nas taxas de formação de blastocistos, a ausência da deteção de diferenças nas taxas de nados-vivos entre os grupos de ovócitos usados a fresco e vitrificados, propõe ainda que o impacto da vitrificação na integridade ovocitária poderá induzir um mecanismo de seleção artificial, beneficiando apenas os ovócitos com maior competência para se manterem viáveis. Esta hipótese sugere que, apesar da vitrificação poder ter um impacto sobre a capacidade fecundante, os ovócitos que sobrevivem ao processo de vitrificação continuam a ter um bom potencial para desenvolver blastocistos de alta qualidade e alcançar taxas de implantação e de nados-vivos comparáveis às dos ciclos com ovócitos a fresco.

O presente estudo apresenta várias qualidades que reforçam a validade dos resultados obtidos. Em primeiro lugar, por se tratar de um estudo com ovócitos provenientes exclusivamente de dadoras, elimina-se a variável da qualidade ovocitária intrínseca, comum em estudos que utilizam ovócitos de casais inférteis. Além disso, o facto de se tratar de um estudo onde os ovócitos da mesma dadora foram divididos entre os grupos de ovócitos usados a fresco e ovócitos vitrificados, permite uma comparação mais direta e precisa dos efeitos da vitrificação. A ausência de diferenças estatísticas

nas idades e IMCs das recetoras entre os dois grupos também contribui para a robustez dos resultados. Adicionalmente, a exclusão de ciclos cujos parâmetros espermáticos não estivessem dentro dos valores normais minimiza a introdução de variáveis que poderiam confundir os resultados.

No entanto, existem algumas limitações a serem consideradas. A disparidade no número de transferências entre os grupos - com 84 transferências registadas para o grupo de ovócitos frescos e 50 para o grupo de ovócitos vitrificados - pode ter influenciado o poder estatístico para a deteção de diferenças nas taxas de implantação. A amostra menor no grupo de ovócitos vitrificados poderá ter levado a uma ampliação dos intervalos de confiança e a uma maior incerteza nas estimativas das taxas de implantação, possivelmente dificultando a deteção de pequenas diferenças que poderiam ser clinicamente relevantes. Assim, embora as taxas de implantação e as taxas de nados-vivos pareçam semelhantes entre os grupos, a diferença no número de transferências pode influenciar essas comparações. O mesmo não se pode concluir para as taxas de nados-vivos/GC, devido ao facto do número de implantações ser igualitário entre os grupos de ovócitos (32 implantações no grupo de ovócitos a fresco e 22 implantações no grupo de ovócitos vitrificado), minimizando o seu impacto sobre a comparação entre as taxas de nados-vivos. Ainda assim, o tamanho da amostra é relativamente pequeno, o que pode limitar a robustez das conclusões. Posto isto, e para melhor entender o impacto da vitrificação dos ovócitos no sucesso de implantação dos embriões, deverão ser feitos estudos com um maior número de transferências, e idealmente igualitário entre os grupos.

A recetividade endometrial não foi diferenciada entre ciclos de transferência a fresco e ciclos com embriões criopreservados, pois as recetoras não passaram por um processo de estimulação ovárica. Esta decisão baseou-se na suposição de que a estimulação afeta a recetividade do endométrio, o que justifica os protocolos de *freeze-all*. Assim, a diferenciação entre ciclos de transferência não faria sentido, uma vez que os protocolos de estimulação seriam semelhantes, independentemente do tipo de transferência realizado.

5. Conclusão

Com base nos resultados discutidos, é possível concluir que, embora a vitrificação seja eficaz na preservação da viabilidade dos ovócitos após desvitrificação, poderá comprometer a sua capacidade fecundante, sendo que a redução do *pool* de ovócitos poderá ter contribuído igualmente para as diferenças observadas no número de embriões em clivagem, de blastocistos e de blastocistos de boa qualidade. A redução da capacidade fecundante dos ovócitos vitrificados não implica, no entanto, que o desenvolvimento embrionário dos ovócitos fecundados seja comprometido, evidenciado pela igualdade entre as taxas de formação de blastocistos e de blastocistos de boa qualidade entre ambos os grupos analisados, e pela superioridade das taxas de clivagem no grupo de ovócitos vitrificados. Os resultados clínicos registados indicam que a capacidade de implantação dos embriões derivados dos ovócitos vitrificados não aparenta ser inferior à dos embriões derivados de ovócitos usados a fresco, reforçando a ideia de que a vitrificação não compromete o desenvolvimento embrionário, e, ultimamente, a capacidade de se obter uma gravidez bem-sucedida.

Referências Bibliográficas

1. Guyton, AC & Hall, JE (2011) 'Endocrinology and Reproduction'. Em *Textbook of Medical Physiology*, 12^a edição, pp 881–1028. Filadélfia: Saunders.
2. Pop, M. G., Crivii, C., & Opincariu, I. (2018). 'Anatomy and function of the hypothalamus'. Em *Hypothalamus in health and diseases*. IntechOpen.
3. McCartney, C. R., & Marshall, J. C. (2019). 'Neuroendocrinology of reproduction'. Em *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology* (pp. 1-24). Elsevier
4. Carlson, Bruce M. (2014). *Human embryology and developmental biology*. 5^a edição.
5. Jones, R. E., & Lopez, K. H. (2014). *Human reproductive biology*. Academic Press.
6. Young, B., Woodford, P., & O'Dowd, G (2013). *Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas*, 6^a edição. Filadélfia: Elsevier.
7. Sherwood, L (2010). 'The Reproductive System'. Em *Human Physiology: From Cells to Systems*, 7^a edição, pp 741–798. Belmont: Brooks/Cole.
8. Speroff, L., & Fritz, M. A. (Eds.) (2005). *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. lippincott Williams & wilkins.
9. Vander, AJ., Lucian, D & Sherman, J (2001). 'Reproduction'. Em *Human Physiology: The Mechanisms of Body Function*, 8^a edição, pp 635–685. Boston: McGraw-Hill Higher Education
10. Rosenwaks, Zev & Wassarman, Paul (2014). *Human Fertility: Methods and Protocols*.
11. Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. (2015). 'The mammalian blood-testis barrier: its biology and regulation'. *Endocrine reviews*, 36(5), 564-591.
12. Vander Borgh, M., & Wyns, C. (2018). 'Fertility and infertility: Definition and epidemiology'. *Clinical biochemistry*, 62, 2-10.
13. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. (2023). 'Definition of infertility: a committee opinion'. *Fertility and Sterility*, 120(6), 1170.
14. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. (2020). 'Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion'. *Fertility and sterility*, 113(3), 533-535.

15. Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., Dyer, S., Racowsky, C., de Mouzon, J., Sokol, R., Rienzi, L., Sunde, A., Schmidt, L., Cooke, I. D., Simpson, J. L., & van der Poel, S. (2017). 'The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 32(9), 1786–1801.
16. Taylor A. (2003). 'ABC of subfertility: extent of the problem'. *BMJ (Clinical research ed.)*, 327(7412), 434–436.
17. World Health Organization (2023). 'Infertility prevalence estimates, 1990–2021'. *World Health Organization*.
18. Silva-Carvalho, J. L., & Santos, A. (2009). Estudo Afrodite: Caracterização da Infertilidade em Portugal. *Porto: Universidade do Porto*.
19. Boivin, J., Bunting, L., Collins, J. A., & Nygren, K. G. (2007). 'International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care'. *Human reproduction*, 22(6), 1506–1512.
20. Cates, W., Farley, T. M., & Rowe, P. J. (1985). 'Worldwide patterns of infertility: is Africa different?'. *Lancet (London, England)*, 2(8455), 596–598.
21. World Health Organization. (1991). 'Infertility: a tabulation of available data on prevalence of primary and secondary infertility'. *World Health Organization*.
22. Larsen U. (2005). 'Research on infertility: which definition should we use?'. *Fertility and sterility*, 83(4), 846–852.
23. Adamson, G. D., de Mouzon, J., Chambers, G. M., Zegers-Hochschild, F., Mansour, R., Ishihara, O., Banker, M., & Dyer, S. J. (2018). 'International committee for monitoring assisted reproductive technology: World report on assisted reproductive technology, 2011'. *Fertility and Sterility*, 110(6), 1067–1080.
24. Thoma, M., Fledderjohann, J., Cox, C., & Adageba, R. K. (2021). 'Biological and social aspects of human infertility: a global perspective'. Em *Oxford research encyclopedia of global public health*.
25. van Balen, F., & Gerrits, T. (2001). 'Quality of infertility care in poor-resource areas and the introduction of new reproductive technologies'. *Human Reproduction*, 16(2), 215–219.
26. Sallam, H. N., & Sallam, N. H. (2016). 'Religious aspects of assisted reproduction'. *Facts, views & vision in ObGyn*, 8(1), 33–48.
27. Inhorn, M. C., Patrizio, P., & Serour, G. I. (2010). 'Third-party reproductive assistance around the Mediterranean: Comparing Sunni Egypt, Catholic Italy

- and multisectarian Lebanon'. *Reproductive BioMedicine Online*, 21(7), 848–853
28. Riezzo, I., Neri, M., Bello, S., Pomara, C., & Turillazzi, E. (2016). 'Italian law on medically assisted reproduction: do women's autonomy and health matter?'. *BMC women's health*, 16, 44.
 29. Simopoulou, M., Sfakianoudis, K., Giannelou, P., Pierouli, A., Rapani, A., Maziotis, E., Galatis, D., Bakas, P., Vlahos, N., Pantos, K., & Koutsilieris, M. (2019). 'Treating Infertility: Current Affairs of Cross-border Reproductive Care'. *Open medicine (Warsaw, Poland)*, 14, 292–299.
 30. Dancet, E. A., Van Empel, I. W., Rober, P., Nelen, W. L., Kremer, J. A., & D'Hooghe, T. M. (2011). 'Patient-centred infertility care: a qualitative study to listen to the patient's voice'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 26(4), 827–833.
 31. Duthie, E. A., Cooper, A., Davis, J. B., Schoyer, K. D., Sandlow, J., Strawn, E. Y., & Flynn, K. E. (2017). 'A conceptual framework for patient-centered fertility treatment'. *Reproductive health*, 14(1), 114.
 32. Holter, H., Sandin-Bojö, A. K., Gejervall, A. L., Wikland, M., Wilde-Larsson, B., & Bergh, C. (2014). 'Patient-centred quality of care in an IVF programme evaluated by men and women'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 29(12), 2695–2703.
 33. Mourad, S. M., Nelen, W. L. D. M., Akkermans, R. P., Vollebergh, J. H. A., Grol, R. P. T. M., Hermens, R. P. M. G., & Kremer, J. A. M. (2010). 'Determinants of patients' experiences and satisfaction with fertility care'. *Fertility and sterility*, 94(4), 1254–1260.
 34. Bala, R., Singh, V., Rajender, S., & Singh, K. (2021). 'Environment, lifestyle, and female infertility'. *Reproductive sciences*, 28, 617-638.
 35. WHO Scientific Group on Recent Advances in Medically Assisted Conception, & World Health Organization. (1992). 'Recent advances in medically assisted conception: report of a WHO scientific group'. *World Health Organization technical report series*, 820, 1–111.
 36. Carson, S. A., & Kallen, A. N. (2021). Diagnosis and management of infertility: a review. *Jama*, 326(1), 65-76.
 37. Zorrilla, M., & Yatsenko, A. N. (2013). The genetics of infertility: current status of the field. *Current genetic medicine reports*, 1, 247-260.

38. Rossi, B. V., Abusief, M., & Missmer, S. A. (2016). 'Modifiable risk factors and infertility: what are the connections?'. *American journal of lifestyle medicine*, 10(4), 220-231.
39. Józków, P., & Rossato, M. (2017). 'The impact of intense exercise on semen quality'. *American journal of men's health*, 11(3), 654-662.
40. Best, D., & Bhattacharya, S. (2015). 'Obesity and fertility'. *Hormone molecular biology and clinical investigation*, 24(1), 5-10.
41. Te Velde, E. R., & Pearson, P. L. (2002). 'The variability of female reproductive ageing'. *Human reproduction update*, 8(2), 141-154.
42. Brugo-Olmedo, S., Chillik, C., & Kopelman, S. (2001). 'Definition and causes of infertility'. *Reproductive biomedicine online*, 2(1), 173-185.
43. Eijkemans, M. J., Van Poppel, F., Habbema, D. F., Smith, K. R., Leridon, H., & Te Velde, E. R. (2014). 'Too old to have children? Lessons from natural fertility populations'. *Human Reproduction*, 29(6), 1304-1312.
44. Holt, W. V., & Fazeli, A. (2016). 'Sperm storage in the female reproductive tract'. *Annual Review of Animal Biosciences*, 4, 291-310.
45. Wilcox, A. J., Weinberg, C. R., & Baird, D. D. (1995). 'Timing of sexual intercourse in relation to ovulation—effects on the probability of conception, survival of the pregnancy, and sex of the baby'. *New England Journal of Medicine*, 333(23), 1517-1521.
46. Walker, M. H., & Tobler, K. J. (2022). 'Female Infertility'. Em *StatPearls*. StatPearls Publishing.
47. Skowrońska, M., Pawłowski, M., & Milewski, R. (2023). 'A literature review and a proposed classification of the relationships between ovulatory infertility and lifestyle factors based on the three groups of ovulation disorders classified by WHO'. *Journal of Clinical Medicine*, 12(19), 6275.
48. Perkins, R. B., Hall, J. E., & Martin, K. A. (1999). 'Neuroendocrine abnormalities in hypothalamic amenorrhea: spectrum, stability, and response to neurotransmitter modulation'. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(6), 1905-1911.
49. Spaziani, M., Carlomagno, F., Tarantino, C., Angelini, F., Vincenzi, L., & Gianfrilli, D. (2023). 'New perspectives in functional hypogonadotropic hypogonadism: beyond late onset hypogonadism'. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 1184530.
50. Franks, S. (2008). 'Polycystic ovary syndrome in adolescents'. *International journal of obesity*, 32(7), 1035-1041.

51. ESHRE, R., & ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. (2004). 'Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS)'. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 19(1), 41-47.
52. Majumdar, A., & Mangal, N. S. (2015). 'Hyperprolactinemia'. *Principles and practice of controlled ovarian stimulation in ART*, 319-328.
53. Capozzi, A., Scambia, G., Pontecorvi, A., & Lello, S. (2015). 'Hyperprolactinemia: pathophysiology and therapeutic approach'. *Gynecological Endocrinology*, 31(7), 506-510.
54. Melmed, S., Casanueva, F. F., Hoffman, A. R., Kleinberg, D. L., Montori, V. M., Schlechte, J. A., & Wass, J. A. (2011). 'Diagnosis and treatment of hyperprolactinemia: an Endocrine Society clinical practice guideline'. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(2), 273-288.
55. Gierach, M., Bruska-Sikorska, M., Rojek, M., & Junik, R. (2022). 'Hyperprolactinemia and insulin resistance'. *Endokrynologia Polska*, 73(6), 959-967.
56. Hart, R. J. (2016). 'Physiological aspects of female fertility: role of the environment, modern lifestyle, and genetics'. *Physiological reviews*, 96(3), 873-909.
57. Mehedintu, C., Plotogea, M. N., Ionescu, S., & Antonovici, M. (2014). 'Endometriosis still a challenge'. *Journal of medicine and life*, 7(3), 349.
58. Bulun S. E. (2009). 'Endometriosis'. *The New England journal of medicine*, 360(3), 268–279.
59. Gupta, S., Goldberg, J. M., Aziz, N., Goldberg, E., Krajcir, N., & Agarwal, A. (2008). 'Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility'. *Fertility and sterility*, 90(2), 247-257.
60. Nelson, L. M., Anast, J. N., Kimzey, L. M., Defensor, R. A., Lipetz, K. J., White, B. J., Shawker, T. H., & Merino, M. J. (1994). 'Development of luteinized graafian follicles in patients with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure'. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 79(5), 1470–1475.
61. Farquhar, C. M., Bhattacharya, S., Repping, S., Mastenbroek, S., Kamath, M. S., Marjoribanks, J., & Boivin, J. (2019). 'Female subfertility'. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), Article 7.
62. Shankar Kikkeri, N., & Nagalli, S. (2023). 'Turner Syndrome'. Em *StatPearls*. StatPearls Publishing.

63. Audu, B. M., Massa, A. A., Bukar, M., El-Nafaty, A. U., & Sa'ad, S. T. (2009). 'Prevalence of utero-tubal infertility'. *Journal of obstetrics and gynaecology: the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*, 29(4), 326–328.
64. Anwar, S., & Anwar, A. (2016). 'Infertility: A review on causes, treatment and management'. *Womens Health Gynecol*, 5, 2-5
65. Weström, L., Joesoef, R., Reynolds, G., Hagdu, A., & Thompson, S. E. (1992). 'Pelvic inflammatory disease and fertility. A cohort study of 1,844 women with laparoscopically verified disease and 657 control women with normal laparoscopic results'. *Sexually transmitted diseases*, 19(4), 185–192.
66. National Collaborating Centre for Women's and Children's Health (UK). (2004). 'Fertility: Assessment and Treatment for People with Fertility Problems'. RCOG Press.
67. Leslie, S. W., Soon-Sutton, T. L., & Khan, M. A. B. (2024). 'Male Infertility'. Em *StatPearls*. StatPearls Publishing.
68. Dimitriadis, F., Adonakis, G., Kaponis, A., Mamoulakis, C., Takenaka, A., & Sofikitis, N. (2017). 'Pre-testicular, testicular, and post-testicular causes of male infertility'. *Endocrinology of the testis and male reproduction*, 1, 981.
69. Basaria, S. (2014). 'Male hypogonadism'. *The Lancet*, 383(9924), 1250-1263.
70. Dodé, C., & Hardelin, J. P. (2009). 'Kallmann syndrome'. *European Journal of Human Genetics*, 17(2), 139-146.
71. De Rosa, M., Zarrilli, S., Di Sarno, A., Milano, N., Gaccione, M., Boggia, B., Lombardi, G., & Colao, A. (2003). 'Hyperprolactinemia in men: clinical and biochemical features and response to treatment'. *Endocrine*, 20(1-2), 75–82.
72. Jungwirth, A., Giwercman, A., Tournaye, H., Diemer, T., Kopa, Z., Dohle, G., Krausz, C., & European Association of Urology Working Group on Male Infertility (2012). 'European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update'. *European urology*, 62(2), 324–332.
73. World Health Organization (1992). 'The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics'. *Fertility and sterility*, 57(6), 1289-1293.
74. Brookings, C., Goldmeier, D., & Sadeghi-Nejad, H. (2013). 'Sexually transmitted infections and sexual function in relation to male fertility.' *Korean Journal of Urology*, 54(3), 149-156.
75. Ochsendorf, F. R. (2008). 'Sexually transmitted infections: impact on male fertility'. *Andrologia*, 40(2), 72-75.

76. Gimenes, F., Souza, R. P., Bento, J. C., Teixeira, J. J., Maria-Engler, S. S., Bonini, M. G., & Consolaro, M. E. (2014). 'Male infertility: a public health issue caused by sexually transmitted pathogens'. *Nature Reviews Urology*, 11(12), 672-687.
77. Muratori, M., Marchiani, S., Tamburrino, L., & Baldi, E. (2019). 'Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin'. *Genetic Damage in Human Spermatozoa*, 75-85.
78. Garza, S. D., & Patrizio, P. (2013). 'Reproductive outcomes in patients with male infertility because of Klinefelter's syndrome, Kartagener's syndrome, round-head sperm, dysplasia fibrous sheath, and 'stump'tail sperm: an updated literature review'. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 25(3), 229-246.
79. Skaletsky, H., Kuroda-Kawaguchi, T., Minx, P. J., Cordum, H. S., Hillier, L., Brown, L. G., Repping, S., Pyntikova, T., Ali, J., Bieri, T., Chinwalla, A., Delehaunty, A., Delehaunty, K., Du, H., Fewell, G., Fulton, L., Fulton, R., Graves, T., Hou, S. F., Latrielle, P., ... Page, D. C. (2003). 'The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes'. *Nature*, 423(6942), 825-837.
80. Krausz, C. G. (2005). 'Y chromosome and male infertility'. *Andrologia*, 37, 219-223.
81. Weyandt, T. B., Schrader, S. M., Turner, T. W., & Simon, S. D. (1996). 'Semen analysis of military personnel associated with military duty assignments'. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 10(6), 521-528.
82. Larsen, A. I., Olsen, J., & Svane, O. (1991). 'Gender-specific reproductive outcome and exposure to high-frequency electromagnetic radiation among physiotherapists'. *Scandinavian journal of work, environment & health*, 324-329.
83. Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., & Skakkebaek, N. E. (1992). 'Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years'. *British medical journal*, 305(6854), 609-613.
84. Splingart, C., Frapsauce, C., Veau, S., Barthelemy, C., Royère, D., & Guerif, F. (2012). 'Semen variation in a population of fertile donors: evaluation in a French centre over a 34-year period'. *International journal of andrology*, 35(3), 467-474.
85. Lee, H. S., & Seo, J. T. (2012). 'Advances in surgical treatment of male infertility'. *The world journal of men's health*, 30(2), 108.

86. Dohle, G. R., Colpi, G. M., Hargreave, T. B., Papp, G. K., Jungwirth, A., Weidner, W., & EAU Working Group on Male Infertility (2005). 'EAU guidelines on male infertility'. *European urology*, 48(5), 703–711.
87. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. (2018). 'Management of nonobstructive azoospermia: a committee opinion'. *Fertility and Sterility*, 110(7), 1239-1245.
88. Walsh T.J., & Smith J.F. (2020). 'Male infertility'. McAninch J.W., & Lue T.F.(Eds.), *Smith & Tanagho's General Urology*, 19e. McGraw Hill.
89. Newman, L., Chopra, J., Dossett, C., Shepherd, E., Bercusson, A., Carroll, M., Walker, W., Lucas, J. S., & Cheong, Y. (2023). 'The impact of primary ciliary dyskinesia on female and male fertility: a narrative review'. *Human reproduction update*, 29(3), 347–367.
90. Raperport, C., Desai, J., Qureshi, D., Rustin, E., Balaji, A., Chronopoulou, E., Homburg, R., Khan, K. S., & Bhude, P. (2024). 'The definition of unexplained infertility: A systematic review'. *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology*, 131(7), 880–897.
91. Aboulghar, M. A., Mansour, R. T., Serour, G. I., & Al-Inany, H. G. (2003). 'Diagnosis and management of unexplained infertility: an update'. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 267, 177-188.
92. Gelbaya, T. A., Potdar, N., Jeve, Y. B., & Nardo, L. G. (2014). 'Definition and epidemiology of unexplained infertility'. *Obstetrical & gynecological survey*, 69(2), 109-115.
93. Cousineau, T. M., & Domar, A. D. (2007). 'Psychological impact of infertility'. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*, 21(2), 293–308.
94. Luk, B. H., & Loke, A. Y. (2015). 'The Impact of Infertility on the Psychological Well-Being, Marital Relationships, Sexual Relationships, and Quality of Life of Couples: A Systematic Review'. *Journal of sex & marital therapy*, 41(6), 610–625.
95. Dyer S. J. (2007). 'The value of children in African countries: insights from studies on infertility'. *Journal of psychosomatic obstetrics and gynaecology*, 28(2), 69–77.
96. Hollos, M., Larsen, U., Obono, O., & Whitehouse, B. (2009). 'The problem of infertility in high fertility populations: meanings, consequences and coping mechanisms in two Nigerian communities'. *Social science & medicine* (1982), 68(11), 2061–2068.

97. Nachtigall R. D. (2006). 'International disparities in access to infertility services'. *Fertility and sterility*, 85(4), 871–875.
98. Barnes, L. W. (2014). 'Conceiving masculinity: Male infertility, medicine, and identity'. *Temple University Press*.
99. Greil, A. L., & Johnson, K. M. (2014). 'Gender attitudes: Infertility'. *The Wiley Blackwell Encyclopedia of Health, Illness, Behavior, and Society*, 589-594.
100. Inhorn, M. C., & Patrizio, P. (2015). 'Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century'. *Human reproduction update*, 21(4), 411–426.
101. Noordhuizen, S., de Graaf, P., & Sieben, I. (2010). 'The Public Acceptance of Voluntary Childlessness in the Netherlands: from 20 to 90 per cent in 30 years'. *Social indicators research*, 99(1), 163–181.
102. Ying, L. Y., Wu, L. H., & Loke, A. Y. (2015). 'Gender differences in experiences with and adjustments to infertility: A literature review'. *International journal of nursing studies*, 52(10), 1640–1652.
103. Katz, P., Showstack, J., Smith, J. F., Nachtigall, R. D., Millstein, S. G., Wing, H., Eisenberg, M. L., Pasch, L. A., Croughan, M. S., & Adler, N. (2011). 'Costs of infertility treatment: results from an 18-month prospective cohort study'. *Fertility and sterility*, 95(3), 915–921.
104. Wu, A. K., Elliott, P., Katz, P. P., & Smith, J. F. (2013). 'Time costs of fertility care: the hidden hardship of building a family'. *Fertility and sterility*, 99(7), 2025–2030.
105. Griesinger, G., Diedrich, K., & Altgassen, C. (2007). 'Stronger reduction of assisted reproduction technique treatment cycle numbers in economically weak geographical regions following the German healthcare modernization law in 2004'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 22(11), 3027–3030.
106. Lord, J., Shaw, L., Dobbs, F., & Acharya, U. (2001). 'A time for change and a time for equality-infertility services and the NHS'. *Human fertility (Cambridge, England)*, 4(4), 256–260.
107. ESHRE Task Force on Ethics and Law, Pennings, G., de Wert, G., Shenfield, F., Cohen, J., Tarlatzis, B., & Devroey, P. (2008). 'ESHRE Task Force on Ethics and Law 14: equity of access to assisted reproductive technology'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 23(4), 772–774.
108. Horton, M., Miller, K., Ory, S. J., Dyer, R. K., Pai, H., Simpson, J. L., ... & Bank, E. (2022). 'International Federation of Fertility Societies' Surveillance

- (IFFS) 2022: global trends in reproductive policy and practice'. *Glob Reprod Health*, 7, e58.
109. Macaluso, M., Wright-Schnapp, T. J., Chandra, A., Johnson, R., Satterwhite, C. L., Pulver, A., Berman, S. M., Wang, R. Y., Farr, S. L., & Pollack, L. A. (2010). 'A public health focus on infertility prevention, detection, and management'. *Fertility and sterility*, 93(1).
 110. Koroma, L., & Stewart, L. (2012). 'Infertility: evaluation and initial management'. *Journal of midwifery & women's health*, 57(6), 614-621.
 111. Lindsay, T. J., & Vitrikas, K. R. (2015). 'Evaluation and treatment of infertility'. *American family physician*, 91(5), 308–314.
 112. McLaren, J. F. (2012). 'Infertility evaluation'. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*, 39(4), 453.
 113. National Collaborating Centre for Women's and Children's Health (UK). (2013). 'Fertility: Assessment and Treatment for People with Fertility Problems'. *Royal College of Obstetricians & Gynaecologists*.
 114. Wathen, N. C., Perry, L., Lilford, R. J., & Chard, T. (1984). 'Interpretation of single progesterone measurement in diagnosis of anovulation and defective luteal phase: observations on analysis of the normal range'. *British medical journal (Clinical research ed.)*, 288(6410), 7–9.
 115. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine in collaboration with Society for Reproductive Endocrinology and Infertility (2008). 'Optimizing natural fertility'. *Fertility and sterility*, 90(5 Suppl), S1–S6.
 116. Barron, M. L., & Fehring, R. J. (2005). 'Basal body temperature assessment: is it useful to couples seeking pregnancy?'. *MCN. The American journal of maternal child nursing*, 30(5), 290–298.
 117. Vrontikis, A., Chang, P. L., Kovacs, P., & Lindheim, S. R. (2010). 'Antral follicle counts (AFC) predict ovarian response and pregnancy outcomes in oocyte donation cycles'. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 27(7), 383–389.
 118. Opsahl, M. S., Miller, B., & Klein, T. A. (1993). 'The predictive value of hysterosalpingography for tubal and peritoneal infertility factors'. *Fertility and sterility*, 60(3), 444–448.
 119. World Health Organization. (2021). 'WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen'. *World Health Organization*.

120. Dias, T. R., Cho, C. L., & Agarwal, A. (2019). 'Sperm assessment: Traditional approaches and their indicative value'. *In Vitro Fertilization: A Textbook of Current and Emerging Methods and Devices*, 249-263.
121. Cooper, T. G., Keck, C., Oberdieck, U., & Nieschlag, E. (1993). 'Effects of multiple ejaculations after extended periods of sexual abstinence on total, motile and normal sperm numbers, as well as accessory gland secretions, from healthy normal and oligozoospermic men'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 8(8), 1251–1258.
122. Tyler, J. P., Crockett, N. G., & Driscoll, G. L. (1982). 'Studies of human seminal parameters with frequent ejaculation. I. Clinical characteristics'. *Clinical reproduction and fertility*, 1(4), 273–285.
123. Amann, R. P., & Howards, S. S. (1980). 'Daily spermatozoal production and epididymal spermatozoal reserves of the human male'. *The Journal of urology*, 124(2), 211–215.
124. Amann R. P. (2009). 'Considerations in evaluating human spermatogenesis on the basis of total sperm per ejaculate'. *Journal of andrology*, 30(6), 626–641.
125. Barbagallo, F., Cannarella, R., Crafa, A., Manna, C., La Vignera, S., Condorelli, R. A., & Calogero, A. E. (2022). 'The impact of a very short abstinence period on conventional sperm parameters and sperm DNA fragmentation: a systematic review and meta-analysis'. *Journal of Clinical Medicine*, 11(24), 7303.
126. Ayad, B. M., Van der Horst, G., & du Plessis, S. S. (2018). 'Short abstinence: a potential strategy for the improvement of sperm quality'. *Middle East Fertility Society Journal*, 23(1), 37-43.
127. Du Plessis, S. S., Gokul, S., & Agarwal, A. (2013). 'Semen hyperviscosity: causes, consequences, and cures'. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 5(1), 224–231.
128. Elia, J., Delfino, M., Imbrogno, N., Capogreco, F., Lucarelli, M., Rossi, T., & Mazzilli, F. (2009). 'Human semen hyperviscosity: prevalence, pathogenesis and therapeutic aspects'. *Asian journal of andrology*, 11(5), 609–615.
129. Agarwal, A., Gupta, S., & Sharma, R. (2016). 'Basic semen analysis'. *Andrological evaluation of male infertility: a laboratory guide*, 39-46.
130. Sousa, A. P., Amaral, A., Baptista, M., Tavares, R., Caballero Campo, P., Caballero Peregrín, P., Freitas, A., Paiva, A., Almeida-Santos, T., & Ramalho-

- Santos, J. (2011). 'Not all sperm are equal: functional mitochondria characterize a subpopulation of human sperm with better fertilization potential'. *PloS one*, 6(3), e18112.
131. World Health Organization. (2010). 'WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen'. *World Health Organization*.
132. Kruger, T. F., Menkveld, R., Stander, F. S., Lombard, C. J., Van der Merwe, J. P., van Zyl, J. A., & Smith, K. (1986). 'Sperm morphologic features as a prognostic factor in *in vitro* fertilization'. *Fertility and sterility*, 46(6), 1118–1123.
133. Menkveld, R., Franken, D. R., Kruger, T. F., Oehninger, S., & Hodgen, G. D. (1991). 'Sperm selection capacity of the human zona pellucida'. *Molecular reproduction and development*, 30(4), 346–352.
134. Shin, D. H., & Turek, P. J. (2013). 'Sperm retrieval techniques'. *Nature Reviews Urology*, 10(12), 723-730.
135. Jarow, J. P., Espeland, M. A., & Lipshultz, L. I. (1989). 'Evaluation of the azoospermic patient'. *The Journal of urology*, 142(1), 62–65.
136. Leung, A., Mira, J., & Hsiao, W. (2014). 'Updates on sperm retrieval techniques'. *Translational Andrology and Urology*, 3(1), 94.
137. Esteves, S. C., Miyaoka, R., & Agarwal, A. (2011). 'Sperm retrieval techniques for assisted reproduction'. *International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology*, 37(5), 570–583.
138. Craft, I., Tsirigotis, M., Bennett, V., Taranissi, M., Khalifa, Y., Hogewind, G., & Nicholson, N. (1995). 'Percutaneous epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection in the management of infertility due to obstructive azoospermia'. *Fertility and sterility*, 63(5), 1038–1042.
139. Donoso, P., Tournaye, H., & Devroey, P. (2007). 'Which is the best sperm retrieval technique for non-obstructive azoospermia? A systematic review'. *Human reproduction update*, 13(6), 539–549.
140. Ostad, M., Liotta, D., Ye, Z., & Schlegel, P. N. (1998). 'Testicular sperm extraction for nonobstructive azoospermia: results of a multibiopsy approach with optimized tissue dispersion'. *Urology*, 52(4), 692–696.
141. Turek, P. J., Cha, I., & Ljung, B. M. (1997). 'Systematic fine-needle aspiration of the testis: correlation to biopsy and results of organ “mapping” for mature sperm in azoospermic men'. *Urology*, 49(5), 743-748.

142. Ljung, B. M. (1992). 'Techniques of aspiration and smear preparation'. Em *Aspiration biopsy: cytologic interpretation and histologic bases* (pp. 12-30). Igaku-Shoin New York.
143. Palinska-Rudzka, K., & Mathur, R. (2023). 'Principles of controlled ovarian stimulation for assisted reproduction'. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine*, 33(4), 91-96.
144. Racca, A., Drakopoulos, P., Neves, A. R., & Polyzos, N. P. (2020). 'Current therapeutic options for controlled ovarian stimulation in assisted reproductive technology'. *Drugs*, 80(10), 973-994.
145. Cohen, J. (2003). 'A short review of ovarian stimulation in assisted reproductive techniques'. *Reproductive BioMedicine Online*, 6(3), 361-366.
146. Oskowitz, S. P. (2012). 'Treatment Options: I. Ovulation Induction'. *The Boston IVF Handbook of Infertility*, 3rd ed. (pp.57-64). CRC Press.
147. Shoham, Z., & Howles, C. M. (2018). 'Drugs used for ovarian stimulation: Clomiphene citrate, aromatase inhibitors, metformin, gonadotropins, gonadotropin-releasing hormone analogs, and recombinant gonadotropins'. Em *Textbook of Assisted Reproductive Techniques. Clinical Perspectives*, 5th ed. (pp. 499-525). CRC Press.
148. Sharma, M., & Balasundaram, P. (2023). 'Ovulation Induction Techniques'. Em *StatPearls*. StatPearls Publishing.
149. Cole, P. A., & Robinson, C. H. (1990). 'Mechanism and inhibition of cytochrome P-450 aromatase'. *Journal of medicinal chemistry*, 33(11), 2933–2942.
150. Franik, S., Kremer, J. A., Nelen, W. L., Farquhar, C., & Marjoribanks, J. (2015). 'Aromatase inhibitors for subfertile women with polycystic ovary syndrome: summary of a Cochrane review'. *Fertility and sterility*, 103(2), 353–355.
151. Thompson, L. A., Barratt, C. L., Thornton, S. J., Bolton, A. E., & Cooke, I. D. (1993). 'The effects of clomiphene citrate and cyclofenil on cervical mucus volume and receptivity over the periovulatory period'. *Fertility and sterility*, 59(1), 125–129.
152. Gadalla, M. A., Huang, S., Wang, R., Norman, R. J., Abdullah, S. A., El Saman, A. M., Ismail, A. M., van Wely, M., & Mol, B. W. J. (2018). 'Effect of clomiphene citrate on endometrial thickness, ovulation, pregnancy and live birth in anovulatory women: systematic review and meta-analysis'. *Ultrasound in obstetrics & gynecology: the official journal of the*

International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, 51(1), 64–76.

153. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (2013). 'Use of clomiphene citrate in infertile women: a committee opinion'. *Fertility and sterility*, 100(2), 341–348.
154. Legro, R. S., Brzyski, R. G., Diamond, M. P., Coutifaris, C., Schlaff, W. D., Casson, P., Christman, G. M., Huang, H., Yan, Q., Alvero, R., Haisenleder, D. J., Barnhart, K. T., Bates, G. W., Usadi, R., Lucidi, S., Baker, V., Trussell, J. C., Krawetz, S. A., Snyder, P., Ohl, D., ... NICHD Reproductive Medicine Network (2014). 'Letrozole versus clomiphene for infertility in the polycystic ovary syndrome'. *The New England journal of medicine*, 371(2), 119–129.
155. Quaas, A. M., & Legro, R. S. (2019). 'Pharmacology of medications used for ovarian stimulation'. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 33(1), 21-33.
156. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, Birmingham, Alabama (2008). 'Gonadotropin preparations: past, present, and future perspectives'. *Fertility and sterility*, 90(5 Suppl), S13–S20.
157. Ortmann, O., Weiss, J. M., & Diedrich, K. (2002). 'Gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and GnRH agonists: mechanisms of action'. *Reproductive biomedicine online*, 5 Suppl 1, 1–7.
158. Demirel, A., & Guven, S. (2016). 'Agonists versus Antagonists in COH'. *Ovarian Stimulation Protocols*, 79-85.
159. Hugues, J. N. (2002). 'Ovarian stimulation for assisted reproductive technologies'. *Current practices and controversies in assisted reproduction*, (pp-102-125).
160. Binder, H., Dittrich, R., Einhaus, F., Krieg, J., Müller, A., Strauss, R., Beckmann, M. W., & Cupisti, S. (2007). 'Update on ovarian hyperstimulation syndrome: Part 1-Incidence and pathogenesis'. *International journal of fertility and women's medicine*, 52(1), 11–26.
161. ESHRE Guideline Group on Ovarian Stimulation, Bosch, E., Broer, S., Griesinger, G., Grynberg, M., Humaidan, P., ... & Broekmans, F. (2020). 'ESHRE guideline: ovarian stimulation for IVF/ICSI'. *Human reproduction open*, 2020(2), hoaa009.
162. Delcour, C., Robin, G., Delesalle, A. S., Drumez, E., Plouvier, P., Dewailly, D., & Catteau-Jonard, S. (2019). 'Weekly intramuscular progesterone for luteal phase support in women receiving oocyte donation is associated with

- a decreased miscarriage rate'. *Reproductive biomedicine online*, 39(3), 446–451.
163. Fatemi, H. M., Popovic-Todorovic, B., Papanikolaou, E., Donoso, P., & Devroey, P. (2007). 'An update of luteal phase support in stimulated IVF cycles'. *Human reproduction update*, 13(6), 581–590.
 164. Beckers, N. G., Laven, J. S., Eijkemans, M. J., & Fauser, B. C. (2000). 'Follicular and luteal phase characteristics following early cessation of gonadotrophin-releasing hormone agonist during ovarian stimulation for in-vitro fertilization'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 15(1), 43–49.
 165. Humaidan, P., Bungum, L., Bungum, M., & Yding Andersen, C. (2006). 'Rescue of corpus luteum function with peri-ovulatory HCG supplementation in IVF/ICSI GnRH antagonist cycles in which ovulation was triggered with a GnRH agonist: a pilot study'. *Reproductive biomedicine online*, 13(2), 173–178.
 166. Pierson, R. A. (2006). 'Ultrasonography in *In Vitro* Fertilization'. Em *In Vitro Fertilization* (pp. 111-136). CRC Press.
 167. Alper, M. M. (2012). 'Treatment options: III. *In vitro* fertilization'. Em *The Boston IVF Handbook of Infertility*, 3rd ed (pp. 69-82). CRC Press.
 168. Rienzi, L. F., & Ubaldi, F. M. (2018). 'Oocyte retrieval and selection'. Em *Textbook of assisted reproductive techniques. Laboratory Perspectives*, 5th ed. (pp. 88-107). CRC Press.
 169. Dong, J., Albertini, D. F., Nishimori, K., Kumar, T. R., Lu, N., & Matzuk, M. M. (1996). 'Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis'. *Nature*, 383(6600), 531–535.
 170. Albertini, D. F., Combelles, C. M., Benecchi, E., & Carabatsos, M. J. (2001). 'Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development'. *Reproduction (Cambridge, England)*, 121(5), 647–653.
 171. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology (2011). 'The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 26(6), 1270–1283.
 172. Testart, J., Lassalle, B., Frydman, R., & Belaisch, J. C. (1983). 'A study of factors affecting the success of human fertilization *in vitro*. II. Influence of semen quality and oocyte maturity on fertilization and cleavage'. *Biology of reproduction*, 28(2), 425–431.

173. Khamsi, F., Roberge, S., Lacanna, I. C., Wong, J., & Yavas, Y. (1999). 'Effects of granulosa cells, cumulus cells, and oocyte density on *in vitro* fertilization in women'. *Endocrine*, 10(2), 161–166.
174. Rattanachaiyanont, M., Leader, A., & Léveillé, M. C. (1999). 'Lack of correlation between oocyte-corona-cumulus complex morphology and nuclear maturity of oocytes collected in stimulated cycles for intracytoplasmic sperm injection'. *Fertility and sterility*, 71(5), 937–940.
175. Khamsi, F., & Roberge, S. (2001). 'Granulosa cells of the cumulus oophorus are different from mural granulosa cells in their response to gonadotrophins and IGF-I'. *The Journal of endocrinology*, 170(3), 565–573.
176. Laufer, N., Tarlatzis, B. C., DeCherney, A. H., Masters, J. T., Haseltine, F. P., MacLusky, N., & Naftolin, F. (1984). 'Asynchrony between human cumulus-corona cell complex and oocyte maturation after human menopausal gonadotropin treatment for *in vitro* fertilization'. *Fertility and sterility*, 42(3), 366–372.
177. Maggiulli, R., Ubaldi, F., & Rienzi, L. (2012). 'Oocyte Denuding'. *Practical Manual of In Vitro Fertilization: Advanced Methods and Novel Devices*, 93-104.
178. Rienzi, L., Ubaldi, F., Anniballo, R., Cerulo, G., & Greco, E. (1998). 'Preincubation of human oocytes may improve fertilization and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 13(4), 1014–1019.
179. Ebner, T., Moser, M., & Tews, G. (2006). 'Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI?'. *Reproductive biomedicine online*, 12(4), 507–512.
180. Xia P. (1997). 'Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 12(8), 1750–1755.
181. Balaban, B., & Urman, B. (2006). 'Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation'. *Reproductive biomedicine online*, 12(5), 608–615.
182. Ebner, T., Yaman, C., Moser, M., Sommergruber, M., Feichtinger, O., & Tews, G. (2000). 'Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 15(2), 427–430.

183. Kahraman, S., Yakin, K., Dönmez, E., Samli, H., Bahçe, M., Cengiz, G., Sertyel, S., Samli, M., & Imirzalioglu, N. (2000). 'Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 15(11), 2390–2393.
184. Rienzi, L., Ubaldi, F. M., Iacobelli, M., Minasi, M. G., Romano, S., Ferrero, S., Sapienza, F., Baroni, E., Litwicka, K., & Greco, E. (2008). 'Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome'. *Fertility and sterility*, 90(5), 1692–1700.
185. De Sutter, P., Dozortsev, D., Qian, C., & Dhont, M. (1996). 'Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 11(3), 595–597.
186. Ebner, T., Moser, M., Sommergruber, M., Gaiswinkler, U., Shebl, O., Jesacher, K., & Tews, G. (2005). 'Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development'. *Fertility and sterility*, 83(6), 1635–1640.
187. Otsuki, J., Okada, A., Morimoto, K., Nagai, Y., & Kubo, H. (2004). 'The relationship between pregnancy outcome and smooth endoplasmic reticulum clusters in MII human oocytes'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 19(7), 1591–1597.
188. Eichenlaub-Ritter, U., Schmiady, H., Kentenich, H., & Soewarto, D. (1995). 'Recurrent failure in polar body formation and premature chromosome condensation in oocytes from a human patient: indicators of asynchrony in nuclear and cytoplasmic maturation'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 10(9), 2343–2349.
189. Balakier, H., Bouman, D., Sojecki, A., Librach, C., & Squire, J. A. (2002). 'Morphological and cytogenetic analysis of human giant oocytes and giant embryos'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 17(9), 2394–2401.
190. Granot, I., & Dekel, N. (2018). 'Preparation and evaluation of oocytes for intracytoplasmic sperm injection'. In *Textbook of Assisted Reproductive Techniques. Laboratory Perspectives*, 5th ed. (pp. 108-116). CRC Press.
191. Kim, Y. J., Park, C. W., & Ku, S. Y. (2014). 'Indications of intrauterine insemination for male and non-male factor infertility'. *Seminars in reproductive medicine*, 32(4), 306–312.

192. ESHRE Capri Workshop Group (2009). 'Intrauterine insemination'. *Human reproduction update*, 15(3), 265–277.
193. Akanji Tijani, H., & Bhattacharya, S. (2010). 'The role of intrauterine insemination in male infertility'. *Human fertility (Cambridge, England)*, 13(4), 226–232.
194. Cohen, M. R. (1962). 'Intrauterine insemination'. *International journal of fertility*, 7, 235–240.
195. Boomsma, C. M., Heineman, M. J., Cohlen, B. J., & Farquhar, C. (2007). 'Semen preparation techniques for intrauterine insemination'. *The Cochrane database of systematic reviews*, (4), CD004507.
196. Ombelet, W., Dhont, N., Thijssen, A., Bosmans, E., & Kruger, T. (2014). 'Semen quality and prediction of IUI success in male subfertility: a systematic review'. *Reproductive biomedicine online*, 28(3), 300–309.
197. Bayer, S. R. (2012). 'Treatment options: II. intrauterine insemination'. Em *The Boston IVF Handbook of Infertility*, 3rd ed. (pp.65-68). CRC Press.
198. Ahinko-Hakamaa, K., Huhtala, H., & Tinkanen, H. (2007). 'Success in intrauterine insemination: the role of etiology'. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*, 86(7), 855–860.
199. Freour, T., Jean, M., Mirallie, S., Langlois, M. L., Dubourdieu, S., & Barriere, P. (2009). 'Predictive value of CASA parameters in IUI with frozen donor sperm'. *International journal of andrology*, 32(5), 498–504.
200. Wiser, A., Shalom-Paz, E., Reinblatt, S. L., Son, W. Y., Das, M., Tulandi, T., & Holzer, H. (2012). 'Ovarian stimulation and intrauterine insemination in women aged 40 years or more'. *Reproductive biomedicine online*, 24(2), 170–173.
201. Sun, Y., Li, B., Fan, L. Q., Zhu, W. B., Chen, X. J., Feng, J. H., Yang, C. L., & Zhang, Y. H. (2012). 'Does sperm morphology affect the outcome of intrauterine insemination in patients with normal sperm concentration and motility?'. *Andrologia*, 44(5), 299–304.
202. van Weert, J. M., Repping, S., Van Voorhis, B. J., van der Veen, F., Bossuyt, P. M., & Mol, B. W. (2004). 'Performance of the postwash total motile sperm count as a predictor of pregnancy at the time of intrauterine insemination: a meta-analysis'. *Fertility and sterility*, 82(3), 612–620.
203. Lemmens, L., Kos, S., Beijer, C., Brinkman, J. W., van der Horst, F. A., van den Hoven, L., Kieslinger, D. C., van Trooyen-van Vrouwerff, N. J., Wolthuis, A., Hendriks, J. C., Wetzels, A. M., & Semen Section of the Dutch

- Foundation for Quality Assessment in Medical Laboratories (2016). 'Predictive value of sperm morphology and progressively motile sperm count for pregnancy outcomes in intrauterine insemination'. *Fertility and sterility*, 105(6), 1462–1468.
204. Allegra, A., Marino, A., Coffaro, F., Scaglione, P., Sammartano, F., Rizza, G., & Volpes, A. (2007). 'GnRH antagonist-induced inhibition of the premature LH surge increases pregnancy rates in IUI-stimulated cycles. A prospective randomized trial'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 22(1), 101–108.
 205. Bakas, P., Konidaris, S., Liapis, A., Gregoriou, O., Tzanakaki, D., & Creatsas, G. (2011). 'Role of gonadotropin-releasing hormone antagonist in the management of subfertile couples with intrauterine insemination and controlled ovarian stimulation'. *Fertility and sterility*, 95(6), 2024–2028.
 206. Gómez-Palomares, J. L., Juliá, B., Acevedo-Martín, B., Martínez-Burgos, M., Hernández, E. R., & Ricciarelli, E. (2005). 'Timing ovulation for intrauterine insemination with a GnRH antagonist'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 20(2), 368–372.
 207. Kamath, M. S., Bhavé, P., Aleyamma, T., Nair, R., Chandy, A., Mangalaraj, A. M., Muthukumar, K., & George, K. (2010). 'Predictive factors for pregnancy after intrauterine insemination: A prospective study of factors affecting outcome'. *Journal of human reproductive sciences*, 3(3), 129–134.
 208. De Brucker, M., Camus, M., Haentjens, P., Verheyen, G., Collins, J., & Tournaye, H. (2013). 'Assisted reproduction using donor spermatozoa in women aged 40 and above: the high road or the low road?'. *Reproductive biomedicine online*, 26(6), 577–585.
 209. Choe, J., & Shanks, A. L. (2023). 'In Vitro Fertilization'. Em *StatPearls*. StatPearls Publishing.
 210. Steptoe, P. C., & Edwards, R. G. (1978). 'Birth after the reimplantation of a human embryo'. *Lancet (London, England)*, 2(8085), 366.
 211. Huang, J. Y., & Rosenwaks, Z. (2012). 'In vitro fertilisation treatment and factors affecting success'. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*, 26(6), 777–788.
 212. Steptoe, P. C., & Edwards, R. G. (1976). 'Reimplantation of a human embryo with subsequent tubal pregnancy'. *Lancet (London, England)*, 1(7965), 880–882.
 213. Mazzilli, R., Rucci, C., Vaiarelli, A., Cimadomo, D., Ubaldi, F. M., Foresta, C., & Ferlin, A. (2023). 'Male factor infertility and assisted reproductive

- technologies: indications, minimum access criteria and outcomes'. *Journal of Endocrinological Investigation*, 46(6), 1079-1085.
214. Gordon, J. W., Grunfeld, L., Garrisi, G. J., Talansky, B. E., Richards, C., & Laufer, N. (1988). 'Fertilization of human oocytes by sperm from infertile males after zona pellucida drilling'. *Fertility and sterility*, 50(1), 68–73.
 215. Gordon, J. W., & Talansky, B. E. (1986). 'Assisted fertilization by zona drilling: a mouse model for correction of oligospermia'. *The Journal of experimental zoology*, 239(3), 347–354.
 216. Cohen, J., Malter, H., Wright, G., Kort, H., Massey, J., & Mitchell, D. (1989). 'Partial zona dissection of human oocytes when failure of zona pellucida penetration is anticipated'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 4(4), 435–442.
 217. Tucker, M. J., Bishop, F. M., Cohen, J., Wiker, S. R., & Wright, G. (1991). 'Routine application of partial zona dissection for male factor infertility'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 6(5), 676–681.
 218. Ng, S. C., Bongso, A., Ratnam, S. S., Sathananthan, H., Chan, C. L., Wong, P. C., Hagglund, L., Anandakumar, C., Wong, Y. C., & Goh, V. H. (1988). 'Pregnancy after transfer of sperm under zona'. *Lancet (London, England)*, 2(8614), 790.
 219. Neri, Q. V., Pereira, N., Cozzubbo, T., Rosenwaks, Z., & Palermo, G. D. (2017). 'Intracytoplasmic sperm injection: technical aspects'. Em *Textbook of Assisted Reproductive Techniques. Laboratory Perspectives*, 5th ed. (pp. 141-155). CRC Press.
 220. Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., & Van Steirteghem, A. C. (1992). 'Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte'. *Lancet (London, England)*, 340(8810), 17–18.
 221. Ferraretti, A. P., Nygren, K., Andersen, A. N., de Mouzon, J., Kupka, M., Calhaz-Jorge, C., Wyns, C., Gianaroli, L., Goossens, V., & European IVF-Monitoring Consortium (EIM), for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) (2017). 'Trends over 15 years in ART in Europe: an analysis of 6 million cycles'. *Human reproduction open*, 2017(2), hox012.
 222. Pereira, N., Neri, Q. V., Lekovich, J. P., Spandorfer, S. D., Palermo, G. D., & Rosenwaks, Z. (2015). 'Outcomes of Intracytoplasmic Sperm Injection Cycles for Complete Teratozoospermia: A Case-Control Study Using Paired Sibling Oocytes'. *BioMed research international*, 2015, 470819.

223. Palermo, G. D., Cohen, J., Alikani, M., Adler, A., & Rosenwaks, Z. (1995). 'Intracytoplasmic sperm injection: a novel treatment for all forms of male factor infertility'. *Fertility and sterility*, 63(6), 1231–1240.
224. Barnes, F. L. (2012). 'Micromanipulation'. Em *Textbook of Assisted Reproductive Techniques. Laboratory Perspectives*, 4th ed. (pp. 203-211). CRC Press.
225. Elder, K., Dale, B. (2020) 'Micromanipulation Techniques'. Em *In-Vitro Fertilization*. Cambridge University Press, 284-310.
226. Joris, H., Nagy, Z., Van de Velde, H., De Vos, A., & Van Steirteghem, A. (1998). 'Intracytoplasmic sperm injection: laboratory set-up and injection procedure'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 13 Suppl 1, 76–86.
227. Van Steirteghem, A., De Vos, A., Barbieri, R., & Strauss, J. F. (2004). 'Gamete and embryo Manipulation'. Em *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology; Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management*, Strauss JF and Barbieri R (eds), Elsevier Saunders, Philadelphia, USA, pp 875-898.
228. Malter, H. E., & Cohen, J. (2002). 'Intracytoplasmic sperm injection: technical aspects'. *Current practices and controversies in assisted reproduction*, (pp. 126-133).
229. Dozortsev, D., Rybouchkin, A., De Sutter, P., Qian, C., & Dhont, M. (1995). 'Human oocyte activation following intracytoplasmic injection: the role of the sperm cell'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 10(2), 403–407.
230. Fishel, S., Lisi, F., Rinaldi, L., Green, S., Hunter, A., Dowell, K., & Thornton, S. (1995). 'Systematic examination of immobilizing spermatozoa before intracytoplasmic sperm injection in the human'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 10(3), 497–500.
231. Palermo, G., Joris, H., Derde, M. P., Camus, M., Devroey, P., & Van Steirteghem, A. (1993). 'Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection'. *Fertility and sterility*, 59(4), 826–835.
232. Swain, J. E. (2014). 'Decisions for the IVF laboratory: comparative analysis of embryo culture incubators'. *Reproductive biomedicine online*, 28(5), 535-547.
233. Simopoulou, M., Sfakianoudis, K., Rapani, A., Giannelou, P., Anifandis, G., Bolaris, S., Pantou, A., Lambropoulou, M., Pappas, A., Deligeoroglou, E., Pantos, K., & Koutsilieris, M. (2018). 'Considerations Regarding Embryo

- Culture Conditions: From Media to Epigenetics'. *In vivo (Athens, Greece)*, 32(3), 451–460.
234. Sunde, A., Brison, D., Dumoulin, J., Harper, J., Lundin, K., Magli, M. C., Van den Abbeel, E., & Veiga, A. (2016). 'Time to take human embryo culture seriously'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 31(10), 2174–2182.
 235. Swain, J. E. (2012). 'Is there an optimal pH for culture media used in clinical IVF?'. *Human reproduction update*, 18(3), 333-339.
 236. Fawzy, M., Emad, M., AbdelRahman, M. Y., Abdelghafar, H., Hafez, F. F. A., & Bedaiwy, M. A. (2017). 'Impact of 3.5% O₂ culture on embryo development and clinical outcomes: a comparative study'. *Fertility and Sterility*, 108(4), 635-641.
 237. Calzi, F., Papaleo, E., Rbellotti, E., Ottolina, J., Vailati, S., Viganò, P., & Candiani, M. (2012). 'Exposure of embryos to oxygen at low concentration in a cleavage stage transfer program: reproductive outcomes in a time-series analysis'. *Clinical laboratory*, 58(9-10), 997-1003.
 238. Rinaudo, P. F., Giritharan, G., Talbi, S., Dobson, A. T., & Schultz, R. M. (2006). 'Effects of oxygen tension on gene expression in preimplantation mouse embryos'. *Fertility and sterility*, 86(4 Suppl).
 239. Li, W., Goossens, K., Van Poucke, M., Forier, K., Braeckmans, K., Van Soom, A., & Peelman, L. J. (2016). 'High oxygen tension increases global methylation in bovine 4-cell embryos and blastocysts but does not affect general retrotransposon expression'. *Reproduction, fertility, and development*, 28(7), 948–959.
 240. Wale, P. L., & Gardner, D. K. (2012). 'Oxygen regulates amino acid turnover and carbohydrate uptake during the preimplantation period of mouse embryo development'. *Biology of reproduction*, 87(1), 24–8.
 241. Yang, H. W., Hwang, K. J., Kwon, H. C., Kim, H. S., Choi, K. W., & Oh, K. S. (1998). 'Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 13(4), 998–1002.
 242. Hall, J., Gilligan, A., Schimmel, T., Cecchi, M., & Cohen, J. (1998). 'The origin, effects and control of air pollution in laboratories used for human embryo culture'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 13 Suppl 4, 146–155.
 243. Barnes, F. L., Crombie, A., Gardner, D. K., Kausche, A., Lacham-Kaplan, O., Suikkari, A. M., Tiglias, J., Wood, C., & Trounson, A. O. (1995). 'Blastocyst

- development and birth after in-vitro maturation of human primary oocytes, intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 10(12), 3243–3247.
244. Stimpfel, M., Bacer-Kermavner, L., Jancar, N., & Vrtacnik-Bokal, E. (2020). 'The influence of the type of embryo culture media on the outcome of IVF/ICSI cycles'. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology*, 59(6), 848–854.
 245. Biggers, J. D., & Summers, M. C. (2008). 'Choosing a culture medium: making informed choices'. *Fertility and sterility*, 90(3), 473–483.
 246. Machtinger, R., & Racowsky, C. (2012). 'Culture systems: single step'. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 912, 199–209.
 247. ESHRE Working group on Time-lapse technology, Apter, S., Ebner, T., Freour, T., Guns, Y., Kovacic, B., Le Clef, N., Marques, M., Meseguer, M., Montjean, D., Sfontouris, I., Sturmey, R., & Coticchio, G. (2020). 'Good practice recommendations for the use of time-lapse technology'. *Human reproduction open*, 2020(2), hoaa008.
 248. Carrasco, B., Boada, M., Rodríguez, I., Coroleu, B., Barri, P. N., & Veiga, A. (2013). 'Does culture medium influence offspring birth weight?'. *Fertility and sterility*, 100(5), 1283-1288.
 249. Biggers, J. D. (2000). 'Ethical issues and the commercialization of embryo culture media'. *Reproductive biomedicine online*, 1(3), 74-76.
 250. Aparicio-Ruiz, B., Romany, L., & Meseguer, M. (2018). 'Selection of preimplantation embryos using time-lapse microscopy in *in vitro* fertilization: State of the technology and future directions'. *Birth defects research*, 110(8), 648–653.
 251. Nagy, Z. P., Janssenswillen, C., Janssens, R., De Vos, A., Staessen, C., Van de Velde, H., & Van Steirteghem, A. C. (1998). 'Timing of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in humans after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with testicular spermatozoa and after ICSI or in-vitro fertilization on sibling oocytes with ejaculated spermatozoa'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 13(6), 1606–1612.
 252. Ebner, T. (2017). 'Analysis of fertilization'. Em *Textbook of Assisted Reproductive Techniques. Laboratory Perspectives*, 5th ed. (pp. 193-199). CRC Press.
 253. Tesarik, J., & Mendoza, C. (2006). 'Analysis of Fertilization'. Em *In Vitro Fertilization* (pp. 203-218). CRC Press.

254. Gianaroli, L., Magli, M. C., Ferraretti, A. P., Fortini, D., & Grieco, N. (2003). 'Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection'. *Fertility and sterility*, 80(2), 341–349.
255. Payne, D., Flaherty, S. P., Barry, M. F., & Matthews, C. D. (1997). 'Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 12(3), 532–541.
256. Garello, C., Baker, H., Rai, J., Montgomery, S., Wilson, P., Kennedy, C. R., & Hartshorne, G. M. (1999). 'Pronuclear orientation, polar body placement, and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization: further evidence for polarity in human oocytes?'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 14(10), 2588–2595.
257. Papale, L., Fiorentino, A., Montag, M., & Tomasi, G. (2012). 'The zygote'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 27 Suppl 1, i22–i49.
258. Levron, J., Munné, S., Willadsen, S., Rosenwaks, Z., & Cohen, J. (1995). 'Male and female genomes associated in a single pronucleus in human zygotes'. *Biology of reproduction*, 52(3), 653–657.
259. Munné, S., & Cohen, J. (1998). 'Chromosome abnormalities in human embryos'. *Human reproduction update*, 4(6), 842–855.
260. Reichman, D. E., Jackson, K. V., & Racowsky, C. (2010). 'Incidence and development of zygotes exhibiting abnormal pronuclear disposition after identification of two pronuclei at the fertilization check'. *Fertility and sterility*, 94(3), 965–970.
261. Scott, L. (2003). 'Pronuclear scoring as a predictor of embryo development'. *Reproductive biomedicine online*, 6(2), 201-214.
262. Hegde, A., & Behr, B. (2014). 'Embryo culture and selection: morphological criteria'. *Human Fertility: Methods and Protocols*, 501-532.
263. Kahraman, S., Kumtepe, Y., Sertyel, S., Dönmez, E., Benkhalifa, M., Findikli, N., & Vanderzwalmen, P. (2002). 'Pronuclear morphology scoring and chromosomal status of embryos in severe male infertility'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 17(12), 3193–3200.
264. Pederson T. (1998). 'Growth factors in the nucleolus?'. *The Journal of cell biology*, 143(2), 279–281.
265. Zollner, U., Zollner, K. P., Hartl, G., Dietl, J., & Steck, T. (2002). 'The use of a detailed zygote score after IVF/ICSI to obtain good quality blastocysts:

- the German experience'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 17(5), 1327–1333. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.5.1327>
266. Stalf, T., Herrero, J., Mehnert, C., Manolopoulos, K., Lenhard, A., & Gips, H. (2002). 'Influence of polarization effects in ooplasm and pronuclei on embryo quality and implantation in an IVF program'. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 19, 355-362.
267. Van Montfoort, A. P., Dumoulin, J. C., Kester, A. D., & Evers, J. L. (2004). 'Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 19(9), 2103–2108.
268. Giorgetti, C., Hans, E., Terriou, P., Salzmann, J., Barry, B., Chabert-Orsini, V., Chinchole, J. M., Franquebalme, J. P., Glowaczower, E., Sitri, M. C., Thibault, M. C., & Roulier, R. (2007). 'Early cleavage: an additional predictor of high implantation rate following elective single embryo transfer'. *Reproductive biomedicine online*, 14(1), 85–91.
269. Shoukir, Y., Campana, A., Farley, T., & Sakkas, D. (1997). 'Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 12(7), 1531–1536.
270. Sakkas, D., Shoukir, Y., Chardonens, D., Bianchi, P. G., & Campana, A. (1998). 'Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 13(1), 182–187.
271. Hardarson, T., Hanson, C., Sjögren, A., & Lundin, K. (2001). 'Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 16(2), 313–318.
272. Magli, M. C., Gianaroli, L., & Ferraretti, A. P. (2001). 'Chromosomal abnormalities in embryos'. *Molecular and cellular endocrinology*, 183 Suppl 1, S29–S34.
273. Ceyhan, S. T., Jackson, K. V., Racowsky, C. C. D., Racowsky, C., & Schlegel Pn, V. V. B. (2009). 'Biennial review of infertility'. *Humana, New York*, 143-184.
274. Scott, L., Finn, A., O'Leary, T., McLellan, S., & Hill, J. (2007). 'Morphologic parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal

- development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 22(1), 230–240.
275. Prados, F. J., Debrock, S., Lemmen, J. G., & Agerholm, I. (2012). 'The cleavage stage embryo'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 27 Suppl 1, i50–i71.
276. Holte, J., Berglund, L., Milton, K., Garello, C., Gennarelli, G., Revelli, A., & Bergh, T. (2007). 'Construction of an evidence-based integrated morphology cleavage embryo score for implantation potential of embryos scored and transferred on day 2 after oocyte retrieval'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 22(2), 548–557.
277. Van Blerkom, J., Davis, P., & Alexander, S. (2001). 'A microscopic and biochemical study of fragmentation phenotypes in stage-appropriate human embryos'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 16(4), 719–729.
278. Alikani, M., Cohen, J., Tomkin, G., Garrisi, G. J., Mack, C., & Scott, R. T. (1999). 'Human embryo fragmentation *in vitro* and its implications for pregnancy and implantation'. *Fertility and sterility*, 71(5), 836–842.
279. Plachot, M., De Grouchy, J., Junca, A. M., Mandelbaum, J., Cohen, J., & Salat-Baroux, J. (1988). 'Chromosome analysis of ovocytes and human embryos collected after fertilization *in vitro*. A model of natural selection against aneuploidy'. *Revue Francaise de Gynecologie et D'obstetrique*, 83(10), 613-617.
280. Pellestor, F., Girardet, A., Andréo, B., Arnal, F., & Humeau, C. (1994). 'Relationship between morphology and chromosomal constitution in human preimplantation embryo'. *Molecular reproduction and development*, 39(2), 141–146.
281. Kligman, I., Benadiva, C., Alikani, M., & Munne, S. (1996). 'The presence of multinucleated blastomeres in human embryos is correlated with chromosomal abnormalities'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 11(7), 1492–1498.
282. Desai, N. N., Goldstein, J., Rowland, D. Y., & Goldfarb, J. M. (2000). 'Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 15(10), 2190–2196.
283. Tao, J., Tamis, R., Fink, K., Williams, B., Nelson-White, T., & Craig, R. (2002). 'The neglected morula/compact stage embryo transfer.' *Human reproduction (Oxford, England)*, 17(6), 1513–1518.

284. Wiley, L. M. (1987). 'Development of the blastocyst: role of cell polarity in cavitation and cell differentiation'. Em *The mammalian preimplantation embryo: regulation of growth and differentiation in vitro* (pp. 65-93). Boston, MA: Springer US.
285. Hardarson, T., Van Landuyt, L., & Jones, G. (2012). 'The blastocyst'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 27 Suppl 1, i72–i91.
286. Richter, K. S., Harris, D. C., Daneshmand, S. T., & Shapiro, B. S. (2001). 'Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape'. *Fertility and sterility*, 76(6), 1157–1167.
287. Gardner R. L. (2000). 'Flow of cells from polar to mural trophectoderm is polarized in the mouse blastocyst'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 15(3), 694–701.
288. Scott L. A. (2000). 'Oocyte and embryo polarity'. *Seminars in reproductive medicine*, 18(2), 171–183.
289. Meseguer, M., Herrero, J., Tejera, A., Hilligsøe, K. M., Ramsing, N. B., & Remohí, J. (2011). 'The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 26(10), 2658–2671.
290. Gallego, R. D., Remohí, J., & Meseguer, M. (2019). 'Time-lapse imaging: the state of the art'. *Biology of Reproduction*, 101(6), 1146-1154.
291. Ciray, H. N., Campbell, A., Agerholm, I. E., Aguilar, J., Chamayou, S., Esbert, M., & Sayed, S. (2014). 'Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group'. *Human reproduction*, 29(12), 2650-2660
292. Kovacs, P. (2014). 'Embryo selection: the role of time-lapse monitoring'. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12, 1-11.
293. Kieslinger, D. C., De Gheselle, S., Lambalk, C. B., De Sutter, P., Kosteljik, E. H., Twisk, J. W., van Rijswijk, J., Van den Abbeel, E., & Vergouw, C. G. (2016). 'Embryo selection using time-lapse analysis (Early Embryo Viability Assessment) in conjunction with standard morphology: a prospective two-center pilot study'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 31(11), 2450–2457.
294. Chung, Y. H., Hsiao, Y. H., Kao, W. L., Hsu, C. H., Yao, D. J., & Chen, C. (2015). 'Microwells support high-resolution time-lapse imaging and development of preimplanted mouse embryos'. *Biomicrofluidics*, 9(2), 022407.

295. Armstrong, S., Bhide, P., Jordan, V., Pacey, A., Marjoribanks, J., & Farquhar, C. (2019). 'Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction'. *The Cochrane database of systematic reviews*, 5(5), CD011320.
296. Nakahara, T., Iwase, A., Goto, M., Harata, T., Suzuki, M., Ienaga, M., Kobayashi, H., Takikawa, S., Manabe, S., Kikkawa, F., & Ando, H. (2010). 'Evaluation of the safety of time-lapse observations for human embryos'. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 27(2-3), 93–96.
297. Cruz, M., Gadea, B., Garrido, N., Pedersen, K. S., Martínez, M., Pérez-Cano, I., Muñoz, M., & Meseguer, M. (2011). 'Embryo quality, blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients whose embryos were monitored by time-lapse imaging'. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 28(7), 569–573.
298. Kirkegaard, K., Hindkjaer, J. J., Grøndahl, M. L., Kesmodel, U. S., & Ingerslev, H. J. (2012). 'A randomized clinical trial comparing embryo culture in a conventional incubator with a time-lapse incubator'. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 29(6), 565–572.
299. Insua, M. F., Cobo, A. C., Larreategui, Z., Ferrando, M., Serra, V., & Meseguer, M. (2017). 'Obstetric and perinatal outcomes of pregnancies conceived with embryos cultured in a time-lapse monitoring system'. *Fertility and sterility*, 108(3), 498–504.
300. Lundin, K., & Park, H. (2020). 'Time-lapse technology for embryo culture and selection'. *Uppsala journal of medical sciences*, 125(2), 77-84.
301. Vandame, J., Fossard, C., Filali, M., Benammar, A., Ranga, S., Pirtea, P., Racowsky, C., Ayoubi, J. M., & Poulain, M. (2022). 'Investigation of the reliability of semi-automatic annotation by the Geri time-lapse system'. *Reproductive biomedicine online*, 45(1), 35–45.
302. Podsiadly, B., Goulding, L., Stevenson, K., Donohue, A., McArthur, S., Woolcott, R., & Roy, T. (2016). 'PP-038-Culture in the Genea Embryo Review Incubator (GERI) time-lapse bench top incubation system provides equivalent results to standard bench top incubation'. *Reproductive BioMedicine Online*, 1(32), S18.
303. Picou, A., Werland, H., Silverberg, K. M., & VerMilyea, M. (2019). 'Blastocyst formation and pregnancy rate comparison between standard large box (Sanyo) incubators and a novel Geri® time-lapse incubator'. *Reproductive BioMedicine Online*, 39, e7.

304. Basille, C., Frydman, R., El Aly, A., Hesters, L., Fanchin, R., Tachdjian, G., Steffann, J., LeLorc'h, M., & Achour-Frydman, N. (2009). 'Preimplantation genetic diagnosis: state of the art'. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 145(1), 9–13.
305. El Tokhy, O., Salman, M., & El-Toukhy, T. (2024). 'Preimplantation genetic diagnosis'. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine*.
306. Mertzaniadou, A., Spits, C., Nguyen, H. T., Van de Velde, H., & Sermon, K. (2013). 'Evolution of aneuploidy up to Day 4 of human preimplantation development'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 28(6), 1716–1724.
307. Fesahat, F., Kalantar, S. M., Sheikha, M. H., Saeedi, H., Montazeri, F., Firouzabadi, R. D., & Khalili, M. A. (2018). 'Developmental and cytogenetic assessments of preimplantation embryos derived from in-vivo or in-vitro matured human oocytes'. *European journal of medical genetics*, 61(4), 235–241.
308. Fesahat, F., Montazeri, F., & Hoseini, S. M. (2020). 'Preimplantation genetic testing in assisted reproduction technology'. *Journal of gynecology obstetrics and human reproduction*, 49(5), 101723.
309. Rabinowitz, M., Ryan, A., Gemelos, G., Hill, M., Baner, J., Cinnioglu, C., Banjevic, M., Potter, D., Petrov, D. A., & Demko, Z. (2012). 'Origins and rates of aneuploidy in human blastomeres'. *Fertility and sterility*, 97(2), 395–401.
310. Munné, S., Chen, S., Fischer, J., Colls, P., Zheng, X., Stevens, J., Escudero, T., Oter, M., Schoolcraft, B., Simpson, J. L., & Cohen, J. (2005). 'Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriages'. *Fertility and sterility*, 84(2), 331–335.
311. Franasiak, J. M., Forman, E. J., Hong, K. H., Werner, M. D., Upham, K. M., Treff, N. R., & Scott, R. T., Jr (2014). 'The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening'. *Fertility and sterility*, 101(3), 656–663.e1.
312. Harris, B. S., Bishop, K. C., Kuller, J. A., Alkilany, S., & Price, T. M. (2021). 'Preimplantation genetic testing: a review of current modalities'. *F&S Reviews*, 2(1), 43-56.
313. Greco, E., Yakovlev, P., Kornilov, N., Vyatkina, S., Bogdanova, D., Ermakova, M., Tarasova, Y., Tikhonov, A., Pendina, A., Biricik, A., Sessa, M. T., Listorti, I., Ronsini, C., Greco, P. F., Victor, A., Barnes, F., Zouves, C.,

- Spinella, F., & Viotti, M. (2023). 'Two clinical case reports of embryonic mosaicism identified with PGT-A persisting during pregnancy as true fetal mosaicism'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 38(2), 315–323.
314. Demko, Z. P., Simon, A. L., McCoy, R. C., Petrov, D. A., & Rabinowitz, M. (2016). 'Effects of maternal age on euploidy rates in a large cohort of embryos analyzed with 24-chromosome single-nucleotide polymorphism-based preimplantation genetic screening'. *Fertility and sterility*, 105(5), 1307–1313.
315. Rubio, C., Simón, C., Vidal, F., Rodrigo, L., Pehlivan, T., Remohí, J., & Pellicer, A. (2003). 'Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 18(1), 182–188.
316. Del Carmen Nogales, M., Bronet, F., Basile, N., Martínez, E. M., Liñán, A., Rodrigo, L., & Meseguer, M. (2017). 'Type of chromosome abnormality affects embryo morphology dynamics'. *Fertility and sterility*, 107(1), 229–235.e2.
317. Coco R. (2018). 'Genetic counseling prior to Assisted Reproductive Technology procedures in the era of cytogenomics'. *JBRA assisted reproduction*, 22(4), 375–380.
318. Verlinsky, Y., Rechitsky, S., Verlinsky, O., Kenigsberg, D., Moshella, J., Ivakhnenko, V., Masciangelo, C., Strom, C., & Kuliev, A. (2002). 'Polar body-based preimplantation diagnosis for X-linked disorders'. *Reproductive biomedicine online*, 4(1), 38–42.
319. Thornhill, A. R., deDie-Smulders, C. E., Geraedts, J. P., Harper, J. C., Harton, G. L., Lavery, S. A., Moutou, C., Robinson, M. D., Schmutzler, A. G., Scriven, P. N., Sermon, K. D., Wilton, L., & ESHRE PGD Consortium (2005). 'ESHRE PGD Consortium 'Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 20(1), 35–48.
320. Magli, M. C., Gianaroli, L., Ferraretti, A. P., Toschi, M., Esposito, F., & Fasolino, M. C. (2004). 'The combination of polar body and embryo biopsy does not affect embryo viability'. *Human Reproduction*, 19(5), 1163-1169.
321. Delhanty J. D. (2011). 'Is the polar body approach best for pre-implantation genetic screening?'. *Placenta*, 32 Suppl 3, S268–S270.
322. Greco, E., Litwicka, K., Minasi, M. G., Cursio, E., Greco, P. F., & Barillari, P. (2020). 'Preimplantation genetic testing: where we are today'. *International journal of molecular sciences*, 21(12), 4381.

323. De Vos, A., Staessen, C., De Rycke, M., Verpoest, W., Haentjens, P., Devroey, P., Liebaers, I., & Van de Velde, H. (2009). 'Impact of cleavage-stage embryo biopsy in view of PGD on human blastocyst implantation: a prospective cohort of single embryo transfers'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 24(12), 2988–2996.
324. Scott, R. T., Jr, Upham, K. M., Forman, E. J., Zhao, T., & Treff, N. R. (2013). 'Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial'. *Fertility and sterility*, 100(3), 624–630.
325. Rubio, C., Bellver, J., Rodrigo, L., Castillón, G., Guillén, A., Vidal, C., Giles, J., Ferrando, M., Cabanillas, S., Remohí, J., Pellicer, A., & Simón, C. (2017). 'In vitro fertilization with preimplantation genetic diagnosis for aneuploidies in advanced maternal age: a randomized, controlled study'. *Fertility and sterility*, 107(5), 1122–1129.
326. Ubaldi, F. M., Cimadomo, D., Capalbo, A., Vaiarelli, A., Buffo, L., Trabucco, E., Ferrero, S., Albani, E., Rienzi, L., & Levi Setti, P. E. (2017). 'Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy testing in women older than 44 years: a multicenter experience'. *Fertility and sterility*, 107(5), 1173–1180.
327. Munné, S., Kaplan, B., Frattarelli, J. L., Child, T., Nakhuda, G., Shamma, F. N., Silverberg, K., Kalista, T., Handyside, A. H., Katz-Jaffe, M., Wells, D., Gordon, T., Stock-Myer, S., Willman, S., & STAR Study Group (2019). 'Preimplantation genetic testing for aneuploidy versus morphology as selection criteria for single frozen-thawed embryo transfer in good-prognosis patients: a multicenter randomized clinical trial'. *Fertility and sterility*, 112(6), 1071–1079.e7.
328. McArthur, S. J., Leigh, D., Marshall, J. T., de Boer, K. A., & Jansen, R. P. (2005). 'Pregnancies and live births after trophoctoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts'. *Fertility and sterility*, 84(6), 1628–1636.
329. McArthur, S. J., Leigh, D., Marshall, J. T., Gee, A. J., De Boer, K. A., & Jansen, R. P. (2008). 'Blastocyst trophoctoderm biopsy and preimplantation genetic diagnosis for familial monogenic disorders and chromosomal translocations'. *Prenatal diagnosis*, 28(5), 434–442.
330. Katz-Jaffe, M. G. (2006). 'Preimplantation Genetic Diagnosis'. Em *In Vitro Fertilization* (pp. 333-350). CRC Press.

331. Harton, G. L., Magli, M. C., Lundin, K., Montag, M., Lemmen, J., Harper, J. C., & European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) PGD Consortium/Embryology Special Interest Group (2011). 'ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group--best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS)'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 26(1), 41–46.
332. Neumann, K., Sermon, K., Bossuyt, P., Goossens, V., Geraedts, J., Traeger-Synodinos, J., ... & Griesinger, G. (2020). 'An economic analysis of preimplantation genetic testing for aneuploidy by polar body biopsy in advanced maternal age'. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 127(6), 710-718.
333. Friedenthal, J., Maxwell, S. M., Munné, S., Kramer, Y., McCulloh, D. H., McCaffrey, C., & Grifo, J. A. (2018). 'Next generation sequencing for preimplantation genetic screening improves pregnancy outcomes compared with array comparative genomic hybridization in single thawed euploid embryo transfer cycles'. *Fertility and sterility*, 109(4), 627–632.
334. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. (2021). 'Guidance on the limits to the number of embryos to transfer: a committee opinion'. *Fertility and Sterility*, 116(3), 651-654.
335. Brauer, A. A., & Schattman, G. (2014). 'Embryo transfer'. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1154, 541–548.
336. Hammadeh, M. E., Fischer-Hammadeh, C., & Ali, K. R. (2011). 'Assisted hatching in assisted reproduction: a state of the art'. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 28(2), 119–128.
337. Huisman, G. J., Fauser, B. C., Eijkemans, M. J., & Pieters, M. H. (2000). 'Implantation rates after *in vitro* fertilization and transfer of a maximum of two embryos that have undergone three to five days of culture'. *Fertility and sterility*, 73(1), 117–122.
338. Meldrum D. R. (1993). 'Female reproductive aging--ovarian and uterine factors'. *Fertility and sterility*, 59(1), 1–5.
339. Carroll, J., Depypere, H., & Matthews, C. D. (1990). 'Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes'. *Journal of reproduction and fertility*, 90(2), 547–553.

340. Alteri, A., Viganò, P., Maizar, A. A., Jovine, L., Giacomini, E., & Rubino, P. (2018). 'Revisiting embryo assisted hatching approaches: a systematic review of the current protocols'. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 35(3), 367–391.
341. Blake, D. A., Forsberg, A. S., Johansson, B. R., & Wikland, M. (2001). 'Laser zona pellucida thinning--an alternative approach to assisted hatching'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 16(9), 1959–1964.
342. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. (2022). 'The role of assisted hatching in *in vitro* fertilization: a guideline'. *Fertility and Sterility*, 117(6), 1177-1182.
343. Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology (2013). 'Mature oocyte cryopreservation: a guideline'. *Fertility and sterility*, 99(1), 37–43.
344. Argyle, C. E., Harper, J. C., & Davies, M. C. (2016). 'Oocyte cryopreservation: where are we now?'. *Human reproduction update*, 22(4), 440–449.
345. Iussig, B., Maggiulli, R., Fabozzi, G., Bertelle, S., Vaiarelli, A., Cimadomo, D., Ubaldi, F. M., & Rienzi, L. (2019). 'A brief history of oocyte cryopreservation: Arguments and facts'. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*, 98(5), 550–558.
346. Pegg D. E. (2002). 'The history and principles of cryopreservation'. *Seminars in reproductive medicine*, 20(1), 5–13.
347. Vajta, G., & Nagy, Z. P. (2006). 'Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification'. *Reproductive biomedicine online*, 12(6), 779–796.
348. Best B. P. (2015). 'Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions'. *Rejuvenation research*, 18(5), 422–436.
349. Meryman H. T. (1971). 'Cryoprotective agents'. *Cryobiology*, 8(2), 173–183.
350. Levi Setti, P. E., Albani, E., Novara, P. V., Cesana, A., & Morreale, G. (2006). 'Cryopreservation of supernumerary oocytes in IVF/ICSI cycles'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 21(2), 370–375.
351. Borini, A., Levi Setti, P. E., Anserini, P., De Luca, R., De Santis, L., Porcu, E., La Sala, G. B., Ferraretti, A., Bartolotti, T., Coticchio, G., & Scaravelli, G. (2010). 'Multicenter observational study on slow-cooling oocyte cryopreservation: clinical outcome'. *Fertility and sterility*, 94(5), 1662–1668.

352. Magli, M. C., Lappi, M., Ferraretti, A. P., Capoti, A., Ruberti, A., & Gianaroli, L. (2010). 'Impact of oocyte cryopreservation on embryo development'. *Fertility and sterility*, 93(2), 510–516.
353. Boldt, J., Tidswell, N., Sayers, A., Kilani, R., & Cline, D. (2006). 'Human oocyte cryopreservation: 5-year experience with a sodium-depleted slow freezing method'. *Reproductive biomedicine online*, 13(1), 96–100.
354. Borini, A., Sciajno, R., Bianchi, V., Sereni, E., Flamigni, C., & Coticchio, G. (2006). 'Clinical outcome of oocyte cryopreservation after slow cooling with a protocol utilizing a high sucrose concentration'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 21(2), 512–517.
355. Glujovsky, D., Riestra, B., Sueldo, C., Fiszbajn, G., Repping, S., Nodar, F., Papier, S., & Ciapponi, A. (2014). 'Vitrification versus slow freezing for women undergoing oocyte cryopreservation'. *The Cochrane database of systematic reviews*, 2014(9), CD010047.
356. Grout, B. W., & Morris, G. J. (2009). 'Contaminated liquid nitrogen vapour as a risk factor in pathogen transfer'. *Theriogenology*, 71(7), 1079–1082.
357. Vajta, G., Rienzi, L., & Ubaldi, F. M. (2015). 'Open versus closed systems for vitrification of human oocytes and embryos'. *Reproductive biomedicine online*, 30(4), 325–333.
358. Tamburrino, L., Traini, G., Marcellini, A., Vignozzi, L., Baldi, E., & Marchiani, S. (2023). 'Cryopreservation of human spermatozoa: Functional, molecular and clinical aspects'. *International journal of molecular sciences*, 24(5), 4656.
359. Anger, J. T., Gilbert, B. R., & Goldstein, M. (2003). 'Cryopreservation of sperm: indications, methods and results'. *The Journal of urology*, 170(4 Pt 1), 1079–1084.
360. Oktay, K., Harvey, B. E., Partridge, A. H., Quinn, G. P., Reinecke, J., Taylor, H. S., Wallace, W. H., Wang, E. T., & Loren, A. W. (2018). 'Fertility Preservation in Patients With Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Update'. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 36(19), 1994–2001.
361. Ozimic, S., Ban-Frangez, H., & Stimpfel, M. (2023). 'Sperm cryopreservation today: Approaches, efficiency, and pitfalls'. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(6), 4716-4734.
362. Isachenko, E., Isachenko, V., Katkov, I. I., Dessole, S., & Nawroth, F. (2003). 'Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of

- cryoprotectants: from past practical difficulties to present success'. *Reproductive biomedicine online*, 6(2), 191–200.
363. Benson, J. D., Woods, E. J., Walters, E. M., & Critser, J. K. (2012). 'The cryobiology of spermatozoa'. *Theriogenology*, 78(8), 1682–1699.
 364. Gómez-Torres, M. J., Medrano, L., Romero, A., Fernández-Colom, P. J., & Aizpurúa, J. (2017). 'Effectiveness of human spermatozoa biomarkers as indicators of structural damage during cryopreservation'. *Cryobiology*, 78, 90–94.
 365. Degl'Innocenti, S., Filimberti, E., Magini, A., Krausz, C., Lombardi, G., Fino, M. G., Rastrelli, G., Maggi, M., & Baldi, E. (2013). 'Semen cryopreservation for men banking for oligospermia, cancers, and other pathologies: prediction of post-thaw outcome using basal semen quality'. *Fertility and sterility*, 100(6), 1555–63.e633.
 366. Tamburrino, L., Cambi, M., Marchiani, S., Manigrasso, I., Degl'Innocenti, S., Forti, G., Maggi, M., Baldi, E., & Muratori, M. (2017). 'Sperm DNA fragmentation in cryopreserved samples from subjects with different cancers'. *Reproduction, fertility, and development*, 29(4), 637–645.
 367. MacKenna, A., Crosby, J., Huidobro, C., Correa, E., & Duque, G. (2017). 'Semen quality before cryopreservation and after thawing in 543 patients with testicular cancer'. *JBRA assisted reproduction*, 21(1), 31–34.
 368. Hamano, I., Hatakeyama, S., Nakamura, R., Fukuhara, R., Noro, D., Tanaka, T., Yoneyama, T., Yamamoto, H., Yoneyama, T., Hashimoto, Y., Koie, T., Yokoyama, Y., & Ohyama, C. (2018). 'Differences in semen characteristics between patients with testicular cancer and other malignancies using various cut-off values'. *International journal of urology: official journal of the Japanese Urological Association*, 25(9), 817–824.
 369. Esteves, S. C., Zini, A., Coward, R. M., Evenson, D. P., Gosálvez, J., Lewis, S. E. M., Sharma, R., & Humaidan, P. (2021). 'Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations'. *Andrologia*, 53(2), e13874.
 370. Li, Z., Wang, L., Cai, J., & Huang, H. (2006). 'Correlation of sperm DNA damage with IVF and ICSI outcomes: a systematic review and meta-analysis'. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 23(9-10), 367–376.
 371. Du, C., & Tuo, Y. (2023). 'Correlation of DNA fragments with routine semen parameters and lifestyle and their impact on assisted reproductive outcomes'. *Revista internacional de andrologia*, 21(2), 100337.

372. Chatterjee, S., & Gagnon, C. (2001). 'Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing'. *Molecular reproduction and development*, 59(4), 451–458.
373. Liu, T., Gao, J., Zhou, N., Mo, M., Wang, X., Zhang, X., Yang, H., Chen, Q., Ao, L., Liu, J., Cui, Z., & Cao, J. (2016). 'The effect of two cryopreservation methods on human sperm DNA damage'. *Cryobiology*, 72(3), 210–215.
374. Neild, D. M., Gadella, B. M., Chaves, M. G., Miragaya, M. H., Colenbrander, B., & Agüero, A. (2003). 'Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation'. *Theriogenology*, 59(8), 1693–1705.
375. Kumar, A., Prasad, J. K., Srivastava, N., & Ghosh, S. K. (2019). 'Strategies to Minimize Various Stress-Related Freeze-Thaw Damages During Conventional Cryopreservation of Mammalian Spermatozoa'. *Biopreservation and biobanking*, 17(6), 603–612.
376. Woolley, D. M., & Richardson, D. W. (1978). 'Ultrastructural injury to human spermatozoa after freezing and thawing'. *Journal of reproduction and fertility*, 53(2), 389–394.
377. Zhu, W. J., & Liu, X. G. (2000). 'Cryodamage to plasma membrane integrity in head and tail regions of human sperm'. *Asian journal of andrology*, 2(2), 135–138.
378. European IVF-monitoring Consortium (EIM), European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), Calhaz-Jorge, C., De Geyter, C., Kupka, M. S., de Mouzon, J., Erb, K., Mocanu, E., Motrenko, T., Scaravelli, G., Wyns, C., & Goossens, V. (2017). 'Assisted reproductive technology in Europe, 2013: results generated from European registers by ESHRE'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 32(10), 1957–1973.
379. Nagy, Z. P., Shapiro, D., & Chang, C. C. (2020). 'Vitrification of the human embryo: a more efficient and safer *in vitro* fertilization treatment'. *Fertility and sterility*, 113(2), 241-247.
380. Loutradi, K. E., Kolibianakis, E. M., Venetis, C. A., Papanikolaou, E. G., Pados, G., Bontis, I., & Tarlatzis, B. C. (2008). 'Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis'. *Fertility and sterility*, 90(1), 186-193.
381. Wong, K. M., Mastenbroek, S., & Repping, S. (2014). 'Cryopreservation of human embryos and its contribution to *in vitro* fertilization success rates'. *Fertility and sterility*, 102(1), 19-26.

382. Trounson, A., & Mohr, L. (1983). 'Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo'. *Nature*, 305(5936), 707–709.
383. Zeilmaker, G. H., Alberda, A. T., van Gent, I., Rijkmans, C. M., & Drogendijk, A. C. (1984). 'Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos'. *Fertility and sterility*, 42(2), 293–296.
384. Puissant, F., Van Rysselberge, M., Barlow, P., Deweze, J., & Leroy, F. (1987). 'Embryo scoring as a prognostic tool in IVF treatment'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 2(8), 705–708.
385. Bodri, D., Guillén, J. J., Trullenque, M., Schwenn, K., Esteve, C., & Coll, O. (2010). 'Early ovarian hyperstimulation syndrome is completely prevented by gonadotropin releasing-hormone agonist triggering in high-risk oocyte donor cycles: a prospective, luteal-phase follow-up study'. *Fertility and sterility*, 93(7), 2418–2420.
386. Manzanares, M. A., Gómez-Palomares, J. L., Ricciarelli, E., & Hernández, E. R. (2010). 'Triggering ovulation with gonadotropin-releasing hormone agonist in *in vitro* fertilization patients with polycystic ovaries does not cause ovarian hyperstimulation syndrome despite very high estradiol levels'. *Fertility and sterility*, 93(4), 1215–1219.
387. Bourdon, M., Maignien, C., Pocate-Cheriet, K., Plu Bureau, G., Marcellin, L., Patrat, C., Chapron, C., & Santulli, P. (2021). 'The freeze-all strategy after IVF: which indications?'. *Reproductive biomedicine online*, 42(3), 529–545.
388. Check, J. H., Choe, J. K., Katsoff, D., Summers-Chase, D., & Wilson, C. (1999). 'Controlled ovarian hyperstimulation adversely affects implantation following *in vitro* fertilization-embryo transfer'. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 16(8), 416–420.
389. Nikas, G., Develioglou, O. H., Toner, J. P., & Jones, H. W., Jr (1999). 'Endometrial pinopodes indicate a shift in the window of receptivity in IVF cycles'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 14(3), 787–792.
390. Yu Ng, E. H., Yeung, W. S., Yee Lan Lau, E., So, W. W., & Ho, P. C. (2000). 'High serum oestradiol concentrations in fresh IVF cycles do not impair implantation and pregnancy rates in subsequent frozen-thawed embryo transfer cycles'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 15(2), 250–255.
391. Bourgain, C., & Devroey, P. (2003). 'The endometrium in stimulated cycles for IVF'. *Human reproduction update*, 9(6), 515–522.

392. Diedrich, K., Fauser, B. C., Devroey, P., Griesinger, G., & Evian Annual Reproduction (EVAR) Workshop Group (2007). 'The role of the endometrium and embryo in human implantation'. *Human reproduction update*, 13(4), 365–377.
393. Cha, J., Sun, X., & Dey, S. K. (2012). 'Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy'. *Nature medicine*, 18(12), 1754–1767.
394. Shi, Y., Sun, Y., Hao, C., Zhang, H., Wei, D., Zhang, Y., Zhu, Y., Deng, X., Qi, X., Li, H., Ma, X., Ren, H., Wang, Y., Zhang, D., Wang, B., Liu, F., Wu, Q., Wang, Z., Bai, H., Li, Y., ... Chen, Z. J. (2018). 'Transfer of Fresh versus Frozen Embryos in Ovulatory Women'. *The New England journal of medicine*, 378(2), 126–136.
395. Vuong, L. N., Dang, V. Q., Ho, T. M., Huynh, B. G., Ha, D. T., Pham, T. D., Nguyen, L. K., Norman, R. J., & Mol, B. W. (2018). 'IVF Transfer of Fresh or Frozen Embryos in Women without Polycystic Ovaries'. *The New England journal of medicine*, 378(2), 137–147.
396. Chen, Z. J., Shi, Y., Sun, Y., Zhang, B., Liang, X., Cao, Y., Yang, J., Liu, J., Wei, D., Weng, N., Tian, L., Hao, C., Yang, D., Zhou, F., Shi, J., Xu, Y., Li, J., Yan, J., Qin, Y., Zhao, H., ... Legro, R. S. (2016). 'Fresh versus Frozen Embryos for Infertility in the Polycystic Ovary Syndrome'. *The New England journal of medicine*, 375(6), 523–533.
397. Roque, M., Haahr, T., Geber, S., Esteves, S. C., & Humaidan, P. (2019). 'Fresh versus elective frozen embryo transfer in IVF/ICSI cycles: a systematic review and meta-analysis of reproductive outcomes'. *Human reproduction update*, 25(1), 2–14.
398. Wei, D., Liu, J. Y., Sun, Y., Shi, Y., Zhang, B., Liu, J. Q., ... & Chen, Z. J. (2019). 'Frozen versus fresh single blastocyst transfer in ovulatory women: a multicentre, randomised controlled trial'. *The lancet*, 393(10178), 1310-1318.
399. Wang, A., Santistevan, A., Hunter Cohn, K., Copperman, A., Nulsen, J., Miller, B. T., Widra, E., Westphal, L. M., & Yurttas Beim, P. (2017). 'Freeze-only versus fresh embryo transfer in a multicenter matched cohort study: contribution of progesterone and maternal age to success rates'. *Fertility and sterility*, 108(2), 254–261.e4.
400. Özgür, K., Berkkanoglu, M., Bulut, H., Isikli, A., & Coetzee, K. (2015). 'Higher clinical pregnancy rates from frozen-thawed blastocyst transfers compared to fresh blastocyst transfers: a retrospective matched-cohort study'. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 32(10), 1483–1490.

401. Walker, Z., Lanes, A., & Ginsburg, E. (2022). 'Oocyte cryopreservation review: outcomes of medical oocyte cryopreservation and planned oocyte cryopreservation'. *Reproductive biology and endocrinology*, 20(1), 10.
402. Chen C. (1986). 'Pregnancy after human oocyte cryopreservation'. *Lancet (London, England)*, 1(8486), 884–886.
403. Bernard, A., & Fuller, B. J. (1996). 'Cryopreservation of human oocytes: a review of current problems and perspectives'. *Human reproduction update*, 2(3), 193–207.
404. Benagiano, G., & Gianaroli, L. (2004). 'The new Italian IVF legislation'. *Reproductive biomedicine online*, 9(2), 117–125.
405. Cascante, S. D., Berkeley, A. S., Licciardi, F., McCaffrey, C., & Grifo, J. A. (2023). 'Planned oocyte cryopreservation: the state of the ART'. *Reproductive BioMedicine Online*, 103367.
406. Kuwayama, M. (2007). 'Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method'. *Theriogenology*, 67(1), 73-80.
407. Chian, R. C., Huang, J. Y., Tan, S. L., Lucena, E., Saa, A., Rojas, A., Ruvalcaba Castellón, L. A., García Amador, M. I., & Montoya Sarmiento, J. E. (2008). 'Obstetric and perinatal outcome in 200 infants conceived from vitrified oocytes'. *Reproductive biomedicine online*, 16(5), 608–610.
408. Cobo, A., Meseguer, M., Remohí, J., & Pellicer, A. (2010). 'Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 25(9), 2239–2246.
409. Grifo, J. A., & Noyes, N. (2010). 'Delivery rate using cryopreserved oocytes is comparable to conventional *in vitro* fertilization using fresh oocytes: potential fertility preservation for female cancer patients'. *Fertility and sterility*, 93(2), 391–396.
410. Noyes, N., Porcu, E., & Borini, A. (2009). 'Over 900 oocyte cryopreservation babies born with no apparent increase in congenital anomalies'. *Reproductive biomedicine online*, 18(6), 769–776.
411. Noyes, N., Knopman, J., Labella, P., McCaffrey, C., Clark-Williams, M., & Grifo, J. (2010). 'Oocyte cryopreservation outcomes including pre-cryopreservation and post-thaw meiotic spindle evaluation following slow cooling and vitrification of human oocytes'. *Fertility and sterility*, 94(6), 2078–2082.

412. Rienzi, L., Romano, S., Albricci, L., Maggiulli, R., Capalbo, A., Baroni, E., Colamaria, S., Sapienza, F., & Ubaldi, F. (2010). 'Embryo development of fresh 'versus' vitrified metaphase II oocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-oocyte study'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 25(1), 66–73.
413. Trokoudes, K. M., Pavlides, C., & Zhang, X. (2011). 'Comparison outcome of fresh and vitrified donor oocytes in an egg-sharing donation program'. *Fertility and sterility*, 95(6), 1996–2000.
414. Cobo, A., Kuwayama, M., Pérez, S., Ruiz, A., Pellicer, A., & Remohí, J. (2008). 'Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method'. *Fertility and sterility*, 89(6), 1657–1664.
415. Parmegiani, L., Cognigni, G. E., Bernardi, S., Cuomo, S., Ciampaglia, W., Infante, F. E., Tabarelli de Fatis, C., Arnone, A., Maccarini, A. M., & Filicori, M. (2011). 'Efficiency of aseptic open vitrification and hermetical cryostorage of human oocytes'. *Reproductive biomedicine online*, 23(4), 505–512.
416. Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine. (2018). 'Fertility preservation and reproduction in patients facing gonadotoxic therapies: an Ethics Committee opinion'. *Fertility and sterility*, 110(3), 380–386.
417. Cobo, A., García-Velasco, J., Domingo, J., Pellicer, A., & Remohí, J. (2018). 'Elective and Onco-fertility preservation: factors related to IVF outcomes'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 33(12), 2222–2231.
418. Anderson, R. A., Davies, M. C., Lavery, S. A., & Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (2020). 'Elective Egg Freezing for Non-Medical Reasons: Scientific Impact Paper No. 63'. *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology*, 127(9), e113–e121.
419. Johnston, M., Richings, N. M., Leung, A., Sakkas, D., & Catt, S. (2021). 'A major increase in oocyte cryopreservation cycles in the USA, Australia and New Zealand since 2010 is highlighted by younger women but a need for standardized data collection'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 36(3), 624–635.
420. Pai, H. D., Baid, R., Palshetkar, N. P., Pai, A., Pai, R. D., & Palshetkar, R. (2021). 'Oocyte Cryopreservation - Current Scenario and Future Perspectives: A Narrative Review'. *Journal of human reproductive sciences*, 14(4), 340–349.

421. Donnez, J., & Dolmans, M. M. (2013). 'Fertility preservation in women'. *Nature reviews. Endocrinology*, 9(12), 735–749.
422. Cobo, A., Giles, J., Paoletti, S., Pellicer, A., Remohí, J., & García-Velasco, J. A. (2020). 'Oocyte vitrification for fertility preservation in women with endometriosis: an observational study'. *Fertility and sterility*, 113(4), 836–844.
423. Cobo, A., Garrido, N., Crespo, J., José, R., & Pellicer, A. (2012). 'Accumulation of oocytes: a new strategy for managing low-responder patients'. *Reproductive biomedicine online*, 24(4), 424–432.
424. Garcia-Velasco, J. A., Domingo, J., Cobo, A., Martínez, M., Carmona, L., & Pellicer, A. (2013). 'Five years' experience using oocyte vitrification to preserve fertility for medical and nonmedical indications'. *Fertility and sterility*, 99(7), 1994–1999.
425. American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Gynecologic Practice and Practice Committee (2014). 'Female age-related fertility decline. Committee Opinion No. 589'. *Fertility and sterility*, 101(3), 633–634.
426. Tsafrir, A., Holzer, H., Miron-Shatz, T., Eldar-Geva, T., Gal, M., Ben-Ami, I., Dekel, N., Weintraub, A., Goldberg, D., Schonberger, O., Srebnik, N., & Hyman, J. (2021). 'Why have women not returned to use their frozen oocytes?: a 5-year follow-up of women after planned oocyte cryopreservation'. *Reproductive biomedicine online*, 43(6), 1137–1145.
427. Inhorn, M. C., Birenbaum-Carmeli, D., Birger, J., Westphal, L. M., Doyle, J., Gleicher, N., Meirow, D., Dirnfeld, M., Seidman, D., Kahane, A., & Patrizio, P. (2018). 'Elective egg freezing and its underlying socio-demography: a binational analysis with global implications'. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 16(1), 70.
428. Goold, I., & Savulescu, J. (2009). 'In favour of freezing eggs for non-medical reasons'. *Bioethics*, 23(1), 47–58.
429. Solé, M., Santaló, J., Boada, M., Clua, E., Rodríguez, I., Martínez, F., Coroleu, B., Barri, P. N., & Veiga, A. (2013). 'How does vitrification affect oocyte viability in oocyte donation cycles? A prospective study to compare outcomes achieved with fresh versus vitrified sibling oocytes'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 28(8), 2087–2092.
430. Cobo, A., Garrido, N., Pellicer, A., & Remohí, J. (2015). 'Six years' experience in ovum donation using vitrified oocytes: report of cumulative

- outcomes, impact of storage time, and development of a predictive model for oocyte survival rate'. *Fertility and sterility*, 104(6), 1426–34.e348.
431. Nagy, Z. P., Chang, C. C., Shapiro, D. B., Bernal, D. P., Elsner, C. W., Mitchell-Leef, D., Toledo, A. A., & Kort, H. I. (2009). 'Clinical evaluation of the efficiency of an oocyte donation program using egg cryo-banking'. *Fertility and sterility*, 92(2), 520–526.
 432. Nagy, Z. P., Anderson, R. E., Feinberg, E. C., Hayward, B., & Mahony, M. C. (2017). 'The Human Oocyte Preservation Experience (HOPE) Registry: evaluation of cryopreservation techniques and oocyte source on outcomes'. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 15(1), 10.
 433. Stoop, D., van der Veen, F., Deneyer, M., Nekkebroeck, J., & Tournaye, H. (2014). 'Oocyte banking for anticipated gamete exhaustion (AGE) is a preventive intervention, neither social nor nonmedical'. *Reproductive biomedicine online*, 28(5), 548–551.
 434. Johnson, M. H., Pickering, S. J., & George, M. A. (1988). 'The influence of cooling on the properties of the zona pellucida of the mouse oocyte'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 3(3), 383–387.
 435. Vincent, C., Pickering, S. J., & Johnson, M. H. (1990). 'The hardening effect of dimethylsulphoxide on the mouse zona pellucida requires the presence of an oocyte and is associated with a reduction in the number of cortical granules present'. *Journal of reproduction and fertility*, 89(1), 253–259.
 436. Al-Hasani, S., Diedrich, K., van der Ven, H., Reinecke, A., Hartje, M., & Krebs, D. (1987). 'Cryopreservation of human oocytes'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 2(8), 695–700.
 437. Gualtieri, R., Iaccarino, M., Mollo, V., Prisco, M., Iaccarino, S., & Talevi, R. (2009). 'Slow cooling of human oocytes: ultrastructural injuries and apoptotic status'. *Fertility and sterility*, 91(4), 1023–1034.
 438. Nottola, S. A., Coticchio, G., Sciajno, R., Gambardella, A., Maione, M., Scaravelli, G., Bianchi, S., Macchiarelli, G., & Borini, A. (2009). 'Ultrastructural markers of quality in human mature oocytes vitrified using cryoleaf and cryoloop'. *Reproductive biomedicine online*, 19 Suppl 3, 17–27.
 439. Fuller, B., & Paynter, S. (2004). 'Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine'. *Reproductive biomedicine online*, 9(6), 680–691.
 440. Paynter, S. J., Cooper, A., Gregory, L., Fuller, B. J., & Shaw, R. W. (1999). 'Permeability characteristics of human oocytes in the presence of the

- cryoprotectant dimethylsulphoxide'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 14(9), 2338–2342.
441. Porcu, E., Fabbri, R., Seracchioli, R., Ciotti, P. M., Magrini, O., & Flamigni, C. (1997). 'Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes'. *Fertility and sterility*, 68(4), 724–726.
 442. Edgar, D. H., & Gook, D. A. (2012). 'A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos'. *Human reproduction update*, 18(5), 536–554.
 443. Rienzi, L., Gracia, C., Maggiulli, R., LaBarbera, A. R., Kaser, D. J., Ubaldi, F. M., Vanderpoel, S., & Racowsky, C. (2017). 'Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance'. *Human reproduction update*, 23(2), 139–155.
 444. Kuleshova, L., Gianaroli, L., Magli, C., Ferraretti, A., & Trounson, A. (1999). 'Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 14(12), 3077–3079.
 445. Antinori, M., Licata, E., Dani, G., Cerusico, F., Versaci, C., & Antinori, S. (2007). 'Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries'. *Reproductive biomedicine online*, 14(1), 72–79.
 446. Cao, Y. X., Xing, Q., Li, L., Cong, L., Zhang, Z. G., Wei, Z. L., & Zhou, P. (2009). 'Comparison of survival and embryonic development in human oocytes cryopreserved by slow-freezing and vitrification'. *Fertility and sterility*, 92(4), 1306–1311.
 447. Fadini, R., Brambillasca, F., Renzini, M. M., Merola, M., Comi, R., De Ponti, E., & Dal Canto, M. B. (2009). 'Human oocyte cryopreservation: comparison between slow and ultrarapid methods'. *Reproductive biomedicine online*, 19(2), 171–180.
 448. Smith, G. D., Serafini, P. C., Fioravanti, J., Yadid, I., Coslovsky, M., Hassun, P., Alegretti, J. R., & Motta, E. L. (2010). 'Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification'. *Fertility and sterility*, 94(6), 2088–2095.
 449. Kuwayama, M., Vajta, G., Kato, O., & Leibo, S. P. (2005). 'Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes'. *Reproductive biomedicine online*, 11(3), 300–308.

450. Bolton, V. N., Hayden, C., Robinson, M., Abdo, D., Pericleous-Smith, A., & Association of Reproductive and Clinical Scientists and British Fertility Society (2023). 'Human oocyte cryopreservation: revised evidence for practice'. *Human fertility (Cambridge, England)*, 26(1), 2–16.
451. Kazem, R., Thompson, L. A., Srikantharajah, A., Laing, M. A., Hamilton, M. P., & Templeton, A. (1995). 'Cryopreservation of human oocytes and fertilization by two techniques: in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 10(10), 2650–2654.
452. Fabbri, R., Porcu, E., Marsella, T., Primavera, M. R., Seracchioli, R., Ciotti, P. M., Magrini, O., Venturoli, S., & Flamigni, C. (1998). 'Oocyte cryopreservation'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 13 Suppl 4, 98–108.
453. Oktay, K., Cil, A. P., & Bang, H. (2006). 'Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis'. *Fertility and sterility*, 86(1), 70–80.
454. Almodin, C. G., Minguetti-Camara, V. C., Paixao, C. L., & Pereira, P. C. (2010). 'Embryo development and gestation using fresh and vitrified oocytes'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 25(5), 1192–1198.
455. Ubaldi, F., Anniballo, R., Romano, S., Baroni, E., Albricci, L., Colamaria, S., Capalbo, A., Sapienza, F., Vajta, G., & Rienzi, L. (2010). 'Cumulative ongoing pregnancy rate achieved with oocyte vitrification and cleavage stage transfer without embryo selection in a standard infertility program'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 25(5), 1199–1205.
456. Rienzi, L., Cobo, A., Paffoni, A., Scarduelli, C., Capalbo, A., Vajta, G., Remohí, J., Ragni, G., & Ubaldi, F. M. (2012). 'Consistent and predictable delivery rates after oocyte vitrification: an observational longitudinal cohort multicentric study'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 27(6), 1606–1612.
457. Cascante, S. D., Blakemore, J. K., DeVore, S., Hodes-Wertz, B., Fino, M. E., Berkeley, A. S., Parra, C. M., McCaffrey, C., & Grifo, J. A. (2022). 'Fifteen years of autologous oocyte thaw outcomes from a large university-based fertility center'. *Fertility and sterility*, 118(1), 158–166.
458. Cobo, A., & Diaz, C. (2011). 'Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials'. *Fertility and sterility*, 96(2), 277–285.
459. Forman, E. J., Li, X., Ferry, K. M., Scott, K., Treff, N. R., & Scott, R. T., Jr (2012). 'Oocyte vitrification does not increase the risk of embryonic

- aneuploidy or diminish the implantation potential of blastocysts created after intracytoplasmic sperm injection: a novel, paired randomized controlled trial using DNA fingerprinting'. *Fertility and sterility*, 98(3), 644–649.
460. Chamayou, S., Sicali, M., Alecci, C., Ragolia, C., Liprino, A., Nibali, D., Storaci, G., Cardea, A., & Guglielmino, A. (2017). 'The accumulation of vitrified oocytes is a strategy to increase the number of euploid available blastocysts for transfer after preimplantation genetic testing'. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 34(4), 479–486.
461. Di Pietro, C., Vento, M., Guglielmino, M. R., Borzì, P., Santonocito, M., Ragusa, M., Barbagallo, D., Duro, L. R., Majorana, A., De Palma, A., Garofalo, M. R., Minutolo, E., Scollo, P., & Purrello, M. (2010). 'Molecular profiling of human oocytes after vitrification strongly suggests that they are biologically comparable with freshly isolated gametes'. *Fertility and sterility*, 94(7), 2804–2807.
462. D'Aurora, M., Budani, M. C., Franchi, S., Sarra, A., Stuppia, L., Tiboni, G. M., & Gatta, V. (2019). 'Dynactin pathway-related gene expression is altered by aging, but not by vitrification'. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 88, 48–55.
463. De Munck, N., Petrusa, L., Verheyen, G., Staessen, C., Vandeskelde, Y., Sterckx, J., Bocken, G., Jacobs, K., Stoop, D., De Rycke, M., & Van de Velde, H. (2015). 'Chromosomal meiotic segregation, embryonic developmental kinetics and DNA (hydroxy)methylation analysis consolidate the safety of human oocyte vitrification'. *Molecular human reproduction*, 21(6), 535–544.
464. Van Reckem, M., Blockeel, C., Bonduelle, M., Buysse, A., Roelants, M., Verheyen, G., Tournaye, H., Hes, F., & Belva, F. (2021). 'Health of 2-year-old children born after vitrified oocyte donation in comparison with peers born after fresh oocyte donation'. *Human reproduction open*, 2021(1), hoab002.
465. Levi-Setti, P. E., Borini, A., Patrizio, P., Bolli, S., Vigiliano, V., De Luca, R., & Scaravelli, G. (2016). 'ART results with frozen oocytes: data from the Italian ART registry (2005-2013)'. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 33(1), 123–128.
466. Wennerholm, U. B., Söderström-Anttila, V., Bergh, C., Aittomäki, K., Hazekamp, J., Nygren, K. G., Selbing, A., & Loft, A. (2009). 'Children born after cryopreservation of embryos or oocytes: a systematic review of outcome data'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 24(9), 2158–2172.

467. Pelkonen, S., Koivunen, R., Gissler, M., Nuojua-Huttunen, S., Suikkari, A. M., Hydén-Granskog, C., Martikainen, H., Tiitinen, A., & Hartikainen, A. L. (2010). 'Perinatal outcome of children born after frozen and fresh embryo transfer: the Finnish cohort study 1995-2006'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 25(4), 914–923.
468. Cobo, A., Serra, V., Garrido, N., Olmo, I., Pellicer, A., & Remohí, J. (2014). 'Obstetric and perinatal outcome of babies born from vitrified oocytes'. *Fertility and sterility*, 102(4), 1006–1015.e4.
469. Lockwood G. M. (2011). 'Social egg freezing: the prospect of reproductive 'immortality' or a dangerous delusion?'. *Reproductive biomedicine online*, 23(3), 334–340.
470. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. (2021). 'Evidence-based outcomes after oocyte cryopreservation for donor oocyte *in vitro* fertilization and planned oocyte cryopreservation: a guideline'. *Fertility and Sterility*, 116(1), 36-47.
471. García, J. I., Noriega-Portella, L., & Noriega-Hoces, L. (2011). 'Efficacy of oocyte vitrification combined with blastocyst stage transfer in an egg donation program'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 26(4), 782–790.
472. Katayama, K. P., Stehlik, J., Kuwayama, M., Kato, O., & Stehlik, E. (2003). 'High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy'. *Fertility and sterility*, 80(1), 223–224.
473. Domingues, T. S., Aquino, A. P., Barros, B., Mazetto, R., Nicolielo, M., Kimati, C. M., Devecchi, T., Bonetti, T. C. S., Serafini, P. C., & Motta, E. L. A. (2017). 'Egg donation of vitrified oocytes bank produces similar pregnancy rates by blastocyst transfer when compared to fresh cycle'. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 34(11), 1553–1557.
474. Kushnir, V. A., Darmon, S. K., Barad, D. H., & Gleicher, N. (2018). 'New national outcome data on fresh versus cryopreserved donor oocytes'. *Journal of ovarian research*, 11(1), 2.
475. Setti, A. S., Braga, D. P. A. F., Iaconelli, A., & Borges, E. (2021). 'Fresh oocyte cycles yield improved embryo quality compared with frozen oocyte cycles in an egg-sharing donation programme'. *Zygote (Cambridge, England)*, 29(3), 234–238.
476. Braga, D. P., Setti, A. S., Figueira, R. C., Azevedo, M.deC., Iaconelli, A., Jr, Lo Turco, E. G., & Borges, E., Jr (2016). 'Freeze-all, oocyte vitrification, or

- fresh embryo transfer? Lessons from an egg-sharing donation program'. *Fertility and sterility*, 106(3), 615–622.
477. Goldman, K. N., Noyes, N. L., Knopman, J. M., McCaffrey, C., & Grifo, J. A. (2013). 'Oocyte efficiency: does live birth rate differ when analyzing cryopreserved and fresh oocytes on a per-oocyte basis?'. *Fertility and sterility*, 100(3), 712–717.
478. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, & Practice Committee for the Society for Assisted Reproductive Technology. (2021). 'Guidance regarding gamete and embryo donation'. *Fertility and sterility*, 115(6), 1395-1410.
479. ASEBIR (2015) Cuadernos de embriología clínica - Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos. Madrid: Góbal, Agencia Creativa Digital.
480. Magli, M. C., Jones, G. M., Lundin, K., & van den Abbeel, E. (2012). 'Atlas of human embryology: from oocytes to preimplantation embryos. Preface'. *Human reproduction (Oxford, England)*, 27 Suppl 1, i1.
481. ESHRE Special Interest Group of Embryology and Alpha Scientists in Reproductive Medicine (2017). 'The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of ART laboratory performance indicators'. *Reproductive biomedicine online*, 35(5), 494–510.