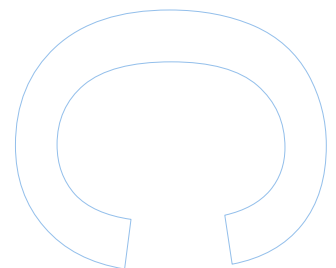
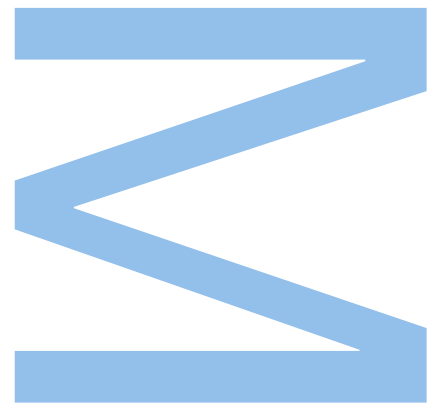


# Laboratórios de andrologia e embriologia em Procriação Medicamentemente Assistida

Patrícia Raquel dos Santos  
Mestrado em Biologia Celular e Molecular  
Departamento de Biologia  
2013

## **Orientador**

Professor Doutor Vasco Manuel Leal Martins de Almeida,  
Professor Auxiliar, FCUP



---

Figura da folha de rosto – Zigoto com dois pronúcleos, semelhantes em tamanho e número de corpos percursoros do nucléolo, e dois glóbulos polares, identificáveis no quadrante superior direito. A fotografia é propriedade do Centro de Estudos de Fertilidade e Esterilidade e foi reproduzida com permissão.



Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

# Agradecimentos

Ao Professor Vasco Almeida, ao Doutor Joaquim Gonçalves, e ao Doutor Jorge Braga, pela oportunidade de desenvolver este estágio no CEIE. Ao meu orientador, Professor Vasco Almeida, agradeço particularmente toda a compreensão e apoio que demonstrou ao longo do estágio e da redação deste relatório.

À Doutora Isabel, pela confiança, companheirismo e partilhas, que certamente tornaram esta experiência mais gratificante e enriquecedora.

Aos amigos, e em particular à Cristina, por depositarem em mim uma confiança que orgulha, motiva, e alimenta a capacidade de esforço!

À minha mãe, por toda a tolerância, meiguice, e entrega. Por tomar suas as nossas causas. Por ser motivo de orgulho e exemplo que tenciono seguir.

Ao Pedro e ao Tiago, pelo incentivo e amizade, e por me fazer ansiar seguir os passos que, sem nem sempre saberem, me orgulho de darem.

Ao meu pai, por procurar incutir a capacidade de relativizar os pesos.

Ao João, por não desistires de encontrar o equilíbrio e o meu sorriso.

E ao pequeno Tomás que, sem saber, me lembra continuamente o porquê de considerar esta área tão gratificante.

## Resumo

A reprodução humana é um processo complexo que requer produção, circulação, e união de gâmetas normais, que resultem no desenvolvimento de um embrião capaz de implantação no endométrio, e de emitir sinais químicos que garantam a sua manutenção. Qualquer transtorno que comprometa esses requisitos, que envolvem numerosas alterações e interações celulares, pode inviabilizar uma gravidez.

Infertilidade designa a incapacidade de estabelecer uma gravidez comprovável por ecografia, após doze meses de relações sexuais frequentes e sem proteção contraceptiva, e estima-se que afete mais de 40 milhões de casais em todo o mundo.

Através do conhecimento e compreensão dos processos biológicos envolvidos na reprodução, e da fisiologia e anatomia normais das estruturas reprodutoras, gâmetas e embriões, puderam desenvolver-se protocolos que se propõem a restituir a capacidade reprodutiva a casais com infertilidade ou patologias transmissíveis à descendência. A reprodução alcançada com recurso a indução da ovulação, estimulação ovárica controlada, inseminação artificial, com sémen de parceiro ou de dador, ou a qualquer tratamento ou procedimento que, visando alcançar gravidez, envolva manipulação *in vitro* de gâmetas masculinos e femininos, ou embriões, é designada procriação medicamente assistida. Investigação em áreas tão distintas como a microscopia, a criobiologia e a biologia da reprodução, possibilita a otimização de meios de cultura, o melhor entendimento dos eventos que podem influenciar o sucesso dos tratamentos existentes, e a conceção de novos protocolos que permitam colmatar falhas dos atuais.

No período de estágio executaram-se protocolos de avaliação de parâmetros espermáticos, processamento de gâmetas para procriação medicamente assistida, e criopreservação de espermatozoides. No laboratório de embriologia foi ainda possível contactar com os protocolos de fertilização *in vitro*, avaliação do desenvolvimento embrionário com recurso a tecnologia de *time-lapse imaging*, preparação de cateteres para transferência de embriões, e criopreservação de embriões e oócitos.

**Palavras-chave:** biologia da reprodução; infertilidade; procriação medicamente assistida; manipulação de gâmetas; avaliação da qualidade de gâmetas e embriões; PrimoVision®; criopreservação de gâmetas e embriões.

## **Abstract**

*Human reproduction is a complex process which involves gametes production, circulation, and union, resulting in the development of an embryo that is able to implant in the endometrium and to secrete chemical signals that ensure its maintenance. Any disorder that compromises these requirements, in any of the multiple cellular modifications and interactions events, might derail pregnancy.*

*Infertility refers to the inability of a couple to achieve clinical pregnancy after twelve months of frequent unprotected sexual intercourses. It is estimated that this condition affects more than 40 million couples around the world.*

*Deep knowledge of biological events involved in reproduction and awareness of normal reproductive systems, gametes, and embryos anatomy and physiology, creates the opportunity to develop protocols for the purpose of restoring the reproductive capacity to couples with infertility or facing diseases transmissible to offspring. Medically assisted reproduction refers to reproduction brought about through ovulation induction, controlled ovarian stimulation, artificial insemination with semen of partner or donor, or by any treatment or procedure that includes the in vitro handling of both male and female gametes, or embryos, in order to establish pregnancy. Research in areas such as microscopy, cryobiology, and reproductive biology, enables culture media improvement, better understanding of events which can affect existing treatments success, and design of new protocols to bridge the remaining gaps.*

*The internship period made possible to perform protocols for sperm parameters assessment, gametes treatment for medically assisted reproduction and sperm cryopreservation. At the embryology laboratory there was the opportunity to contact with in vitro fertilizations protocols, embryonic development assessment using time-lapse imaging technology, loading of embryo transfer catheters, and embryos and oocytes cryopreservation.*

**Key words:** *reproductive biology; infertility; medically assisted reproduction; in vitro manipulation of gametes; gametes and embryos quality assessment; PrimoVision®; gametes and embryos cryopreservation.*

# Índice

Agradecimentos.....	IV
Resumo.....	V
<i>Abstract</i> .....	VI
Índice de Figuras.....	X
Índice de Tabelas.....	XI
Lista de Abreviaturas.....	XIII

## CAPÍTULO I. Introdução. Biologia da reprodução, infertilidade, e Procriação

Medicamente Assistida.....	1
1. ANATOMIA E FISILOGIA DA REPRODUÇÃO HUMANA.....	2
1.1. <i>O aparelho reprodutor masculino</i> .....	2
1.1.1. A espermatogénese e o espermatozoide humano.....	3
1.2. <i>O aparelho reprodutor feminino</i> .....	4
1.2.1. A oogénese e o ócito humano.....	6
1.3. <i>A interação dos gâmetas humanos</i> .....	7
1.3.1. Capacitação espermática.....	9
1.3.2. Fertilização.....	10
1.4. <i>O embrião humano</i> .....	11
2. INFERTILIDADE CONJUGAL – ABORDAGEM E CAUSAS.....	12
2.1. <i>Fatores femininos de infertilidade conjugal</i> .....	12
2.2. <i>Fatores masculinos de infertilidade conjugal</i> .....	13
2.2.1. Espermograma – avaliação de parâmetros espermáticos.....	13
3. PROCRIAÇÃO MEDICAMENTE ASSISTIDA.....	15
3.1. <i>Manipulação laboratorial de gâmetas</i> .....	16
3.1.1. Separação de espermatozoides X e Y por citometria de fluxo.....	17
3.1.2. Maturação in vitro de gâmetas.....	17
3.1.3. Gâmetas artificiais.....	18
3.2. <i>Inseminações artificiais</i> .....	19
3.3. <i>Fertilizações in vitro</i> .....	19

3.3.1. Cultura, monitorização, e seleção de embriões.....	20
3.3.2. Transferência intrauterina de embriões.....	23
3.4. <i>Criopreservação de gâmetas e embriões</i> .....	24
4. OBJETIVOS.....	25
CAPÍTULO II. Materiais e métodos.....	26
1. MATERIAIS, MEIOS E MATERIAL BIOLÓGICO.....	27
1.1. <i>Gâmetas masculinos</i> .....	27
1.2. <i>Gâmetas femininos e embriões</i> .....	28
2. ESTUDO DOS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS.....	28
2.1. <i>Avaliação macroscópica</i> .....	28
2.1.1. Liquefação.....	28
2.1.2. Volume e viscosidade.....	29
2.1.3. pH.....	29
2.1.4. Cor.....	29
2.1.5. Cheiro.....	29
2.2. <i>Avaliação microscópica</i> .....	29
2.2.1. Motilidade.....	30
2.2.2. Vitalidade.....	31
2.2.3. Hipoosmolaridade.....	32
2.2.4. Concentração e número de espermatozoides.....	32
2.2.5. Morfologia.....	34
3. <i>PROCESSAMENTO DE GÂMETAS MASCULINOS</i> .....	35
3.1. <i>Processamento de amostras obtidas por ejaculação</i> .....	35
3.2. <i>Processamento de gâmetas masculinos criopreservados</i> .....	36
3.3. <i>Processamento de fragmentos testiculares obtidos por biópsia</i> .....	36
4. FERTILIZAÇÕES <i>IN VITRO</i> .....	37
4.1. <i>Fertilização in vitro (FIV)</i> .....	37
4.2. <i>Microinjeção intracitoplasmática de um espermatozoide (ICSI)</i> .....	38
4.2.1. <i>Desnudação do oócito</i> .....	38
4.2.2. <i>Avaliação do estado de maturação nuclear do oócito</i> .....	38
4.2.3. <i>Imobilização do espermatozoide, posicionamento do oócito e microinjeção</i> .....	38

4.3. <i>Monitorização da fertilização e do desenvolvimento embrionário</i> .....	40
4.3.1. <i>Avaliação da fertilização</i> .....	40
4.3.2. <i>Avaliação do estado de desenvolvimento embrionário</i> .....	40
4.3.3. <i>Monitorização contínua com recurso a time-lapse imaging</i> .....	40
4.4. <i>Transferência de embriões</i> .....	43
5. <b>CRIOPRESERVAÇÃO DE GÂMETAS E EMBRIÕES</b> .....	43
5.1. <i>Criopreservação de espermatozoides</i> .....	43
5.1.1. <i>Descongelamento de gâmetas masculinos criopreservados</i> .....	44
5.2 <i>Vitrificação de oócitos e embriões</i> .....	44
<b>CAPÍTULO III. Exposição e discussão de resultados</b> .....	45
1. <b>LABORATÓRIO DE ANDROLOGIA</b> .....	46
1.1. <i>Estudo dos parâmetros espermáticos</i> .....	46
1.2. <i>Processamento de gâmetas masculinos</i> .....	46
1.3. <i>Criopreservação de espermatozoides</i> .....	47
2. <b>LABORATÓRIO DE EMBRIOLOGIA</b> .....	47
2.1. <i>Fertilização in vitro (FIV)</i> .....	47
2.2. <i>Microinjeção intracitoplasmática de um espermatozoide (ICSI)</i> .....	47
2.3. <i>Avaliação da fertilização e do desenvolvimento embrionário</i> .....	48
2.4. <i>Transferência de embriões</i> .....	49
2.5. <i>Vitrificação de oócitos e embriões</i> .....	49
<b>CAPÍTULO IV. Conclusões e Considerações</b> .....	51
<b>Referências bibliográficas</b> .....	55

# Índice de Figuras

- Figura 1 – A, B e C - Ultraestrutura de espermatídios redondos (A) e espermatídios alongados (em espermiogénese) (B), sob ampliação de 5250x, e de espermatozoide observado a penetrar a zona pelúcida de um oócito humano, em secção longitudinal de, sob ampliação de 14000x, por microscopia eletrónica de transmissão. D - Diagrama da ultraestrutura do espermatozoide maduro. Adaptação de imagens retiradas de Sathananthan, 2013..... 5
- Figura 2 – Ilustração do trato reprodutor feminino e etapas da migração dos gâmetas masculinos em direção ao local de fertilização. A – Espermatozoides à entrada do cérvix, na transição vagina-útero; B – Interação dos gâmetas masculinos com o epitélio da trompa de Falópio; C – Representação de espermatozoides com motilidade hiperativada; D – Oócito rodeado por células do *cumulus* em secção transversal da ampola. Ilustração retirada de Suarez e Pacey (2006)..... 6
- Figura 3 - Esquema do varrimento da preparação a fresco/centrifugada para determinação da azoospermia do ejaculado. .... 30
- Figura 4 – Estádios de desenvolvimento nuclear (A-C), de oócitos humanos: A – vesícula germinativa (VG) na periferia do quadrante superior direito do oócito; B – metafase I (MI); C – metafase II (MII), com o glóbulo polar I no espaço perivitelino, em cima, ao centro. Adaptação de fotografias retiradas de Mandelbaum, (2000)..... 39
- Figura 5 – Placa de cultura de embriões para monitorização contínua com recurso a *time-lapse imaging*. A – fotografia da placa com extremidade de uma micropipeta de desnudação a servir de escala; B – fotografia de detalhe dos poços da placa de cultura sob ampliação de lupa. Fotografias retiradas da página *online* da empresa Vitrolife. . 42

# Índice de Tabelas

Tabela 1 – Valores mínimos e classificações de referência para amostras consideradas normais pela OMS (WHO, 2010). .....	14
Tabela 2 – Terminologia habitual de designação de variações nos parâmetros da qualidade espermática (WHO, 2010). .....	15
Tabela 3 – Critérios de classificação da motilidade espermática.....	31
Tabela 4 – Diferenças aceitáveis entre valores percentuais para uma dada média, válidas para contagens de 200 espermatozoides em duplicado (Kvist e Björndahl, 2002).....	31
Tabela 5 – Fator de diluição para avaliação da concentração, determinado em função do número médio de espermatozoides observado por campo, sob ampliação de 400x.....	33
Tabela 6 – Diferenças aceitáveis entre duplicados para determinação da concentração (Kvist e Björndahl, 2002).....	33
Tabela 7 – Fator de divisão do número de espermatozoides contados na soma dos duplicados, para cálculo de concentração, em função da diluição e número de quadrículas analisadas (Kvist e Björndahl, 2002).....	34
Tabela 8 – Critérios de classificação da morfologia de espermatozoides.....	35
Tabela 9 – Quadro de classificações de qualidade embrionária dos dias 2 e 3 do desenvolvimento in vitro, com base em critérios morfológicos (Balaban <i>et al.</i> , 2011). PF – Pós-fertilização (hora 0). Qualidade embrionária decrescente de A para D. ....	41
Tabela 10 – Quadro de classificações de qualidade embrionária do dia 4 do desenvolvimento in vitro, com base em critérios morfológicos (Balaban <i>et al.</i> , 2011). PF – Pós-fertilização (hora 0). Qualidade embrionária decrescente de 1 para 3. ....	42
Tabela 11 – Quadro de classificações de blastocistos ao dia 5 do desenvolvimento in vitro, com base em critérios morfológicos (Balaban <i>et al.</i> , 2011). PF – Pós-fertilização (hora 0).	

Qualidade decrescente de 1 para 3, relativamente à classificação da MCI e TF. Desenvolvimento do blastocisto crescente de 1 para 4. Blastocistos mais desenvolvidos e com melhor classificação da MCI e TF apresentam globalmente a melhor qualidade..... 42

Tabela 12 – Quadro sumário dos protocolos e competências desenvolvidas durante o período de estágio: ✓ - protocolo executado autonomamente; — - protocolo executado sob supervisão ou sem aquisição de autonomia..... 50

Tabela 13 – Quadro sumário dos procedimentos realizados autonomamente ao longo do período de estágio. (a) – Exceto avaliação morfológica de espermatozoides. .... 50

## Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AH	Ácido hialurónico
Ca <sup>2+</sup>	Ião cálcio
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CCO	<i>Cumulus-corona-oócito</i>
CEIE	Centro de Estudos de Infertilidade e Esterilidade
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CPN	Corpos percursores do nucléolo
DGPI	Diagnóstico genético pré-implantação
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	<i>Follicle stimulating hormone</i> , hormona folículo-estimulante
GC	Grânulos corticais
GnRH	<i>Gonadotrophin-releasing hormone</i> , fator de libertação das gonadotrofinas
GP	Glóbulo polar
HCO <sup>3-</sup>	Ião hidrogenocarbonato
IA	Inseminação artificial
ICMART	<i>International committee monitoring assisted reproductive technologies</i>
ICSI	<i>Intracytoplasmic sperm injection</i> , injeção intracitoplasmática de espermatozoides
IUI	Inseminação intrauterina
IMSI	<i>Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection</i> , microinjeção intracitoplasmática de espermatozoides selecionados morfológicamente
K <sup>+</sup>	Ião potássio
LH	<i>Luteinising hormone</i> , hormona luteínizante
MI (I)	Metáfase I (I)
MCI	Massa celular interna
MSOME	<i>Motile sperm organelle morphology examination</i>
O <sub>2</sub>	Oxigénio (na forma molecular)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PKA	<i>Protein kinase A</i> , proteína cinase A
PMA	Procriação medicamente assistida

PN	Pronúcleo
PSA	<i>Prostatic-specific antigen</i> , antígeno específico da próstata
PVP	Polivinilpirrolidona
RA	Reação acrossómica
REL	Retículo endoplasmático liso
RNA	Ácido ribonucleico
SACY	<i>Sperm adenyl cyclase</i> , adenil ciclase específica do sémen
Ser	Serina
SHO	Síndrome de hiperestimulação ovárica
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor</i> , recetores proteicos de ligação de factor sensível a N-etilmaleimida solúvel
Sry	<i>Sex-determining region Y</i> , região de determinação sexual do cromossoma Y
TBC	<i>Tulbulobulbar complexes</i> , estruturas de contacto entre células de Sertoli
TDF	<i>Testicular differentiation factor</i> , fator de diferenciação testicular
TESE	<i>Testicular sperm extraction</i> , biópsia testicular
TF	Trofoectoderme
Thr	Treonina
TRA	Técnica de reprodução assistida
Tyr	Tirosina
VG	Vesícula germinativa
VIH	Vírus da imunodeficiência humana
ZP	Zona pelúcida

## **Capítulo I.**

Introdução. Biologia da reprodução, Infertilidade,  
e Procriação Medicamente Assistida

# 1. ANATOMIA E FISIOLOGIA DA REPRODUÇÃO HUMANA

A capacidade de sobrevivência das espécies, por reprodução sexuada, provém da correta determinação sexual, e da diferenciação e desenvolvimento de gónadas, sistemas de canais, e genitália externa apropriados.

Em humanos, assumindo condições normais, o cromossoma Y atua como fator dominante de determinação sexual masculina, pela expressão da região de determinação sexual do cromossoma Y (*Sry*), localizada no braço curto. O *Sry* não contém intrões, e codifica um fator de transcrição, conhecido como fator de determinação testicular (TDF), que despoleta a diferenciação de células de Sertoli, iniciando o desenvolvimento testicular (Sekido e Lovell-Badge, 2008). As hormonas segregadas pelos testículos induzem o desenvolvimento e diferenciação dos canais de Wolf em vesículas seminais, canais deferentes e epidídimos, e a regressão dos canais de Müller. Na ausência do *Sry*, existe diferenciação de células foliculares e desenvolvimento de ovários, regressão dos canais de Wolf, e os canais de Müller desenvolvem-se e dão origem às trompas de Falópio, útero, e terço superior da vagina (Pearlman *et al.*, 2010).

## 1.1. O aparelho reprodutor masculino

A constituição anatómica do aparelho reprodutor masculino inclui gónadas, glândulas anexas, ductos, e um órgão copulador que, no conjunto, permitem a produção e a deposição de gâmetas masculinos, envolvidos em secreções que exercem funções de nutrição e proteção contra fatores nocivos, no aparelho reprodutor feminino.

As gónadas masculinas humanas, testículos, localizam-se numa bolsa no exterior da cavidade abdominal que permite manter uma temperatura estável inferior à temperatura corporal – que inibiria a produção de gâmetas. Os testículos são constituídos por túbulos seminíferos, com células de Sertoli e células da linha germinativa, e por tecido intersticial, com células de Leydig e vasos sanguíneos.

A função testicular é regulada por controlo endócrino. O fator libertador de gonadotrofinas (GnRH) produzido no hipotálamo estimula a síntese e secreção para a corrente sanguínea de hormona luteinizante (LH) e da hormona folículo-estimulante (FSH) pela hipófise. A LH atua nas células de Leydig, ativando a produção de testosterona, e a FSH sobre as células da linha germinativa, num processo mediado pelas células de Sertoli, estimulando a produção de gâmetas. O sistema é controlado por mecanismos de *feedback* negativo, por efeito da testosterona produzida pelas células de Leydig, e pela inibina produzida pelas células de Sertoli (Shalet, 2009).

Anatomicamente, cada testículo tem adjacente um epidídimo, composto por sistemas de canais contíguos entre o testículo e o canal deferente, e compreende os túbulos eferentes, o ducto epididimal, e a porção proximal do canal deferente. Os túbulos eferentes absorvem parte do fluido segregado nos túbulos seminíferos e impulsionam, através de contrações das células das paredes, o movimento dos gâmetas produzidos no testículo em direção ao ducto epididimal em que convergem. No ducto epididimal ocorrem eventos de maturação que permitem a aquisição de motilidade, e, essencialmente na região distal, armazenamento dos gâmetas (Jequier, 2011a). A propulsão dos gâmetas desde o local de armazenamento até ao exterior, passando pelo canal deferente, ducto ejaculador e uretra peniana, é dependente de contrações, na ejaculação, que resultam de reflexos medulares simpáticos e reflexos somáticos.

As vesículas seminais, a próstata, e as glândulas bulbouretrais e uretrais, constituem as glândulas acessórias do sistema reprodutor masculino, e são responsáveis pela produção de secreções que compõe a maior porção do volume do ejaculado e que não se misturam até serem expelidas para o exterior como resultado da ejaculação. As vesículas seminais segregam um fluido viscoso com frutose – que serve de fonte de energia aos gâmetas –, prostaglandinas, óxido nítrico sintase, e polipéptidos envolvidos na coagulação do ejaculado. A próstata contribui com enzimas proteolíticas com importância na liquefação, espermina, ácido cítrico e iões zinco e magnésio. As secreções das glândulas bulbouretrais e uretrais são essencialmente mucoproteínas que intervêm na lubrificação (Jequier, 2011a).

#### 1.1.1. **A espermatogénese e o espermatozoide humano**

A espermatogénese, produção de gâmetas masculinos, é um processo contínuo desde a puberdade, dependente de controlo hormonal, que envolve divisões mitóticas e meióticas de células diploides de uma população inicial de células da linha germinativa, as espermatogónias, e que acontece no lúmen dos túbulos seminíferos.

As espermatogónias localizam-se entre células de Sertoli adjacentes, na proximidade da parede dos túbulos seminíferos, e podem ser células estaminais (espermatogónias A), ou diferenciadas (espermatogónias B). As espermatogónias A dividem-se por mitoses assegurando a manutenção de uma população de espermatogónias A, e podem diferenciar-se em espermatogónias B, que por divisão mitótica geram mais espermatogónias B, ou espermatócitos I.

Os espermatócitos I iniciam a primeira divisão meiótica, e durante a prófase I, migram no sentido do lúmen e estabelecem ligação com as células de Sertoli através de junções celulares especializadas (TBC – *tubulobulbar complexes*)<sup>1</sup>.

---

1 – TBC são estruturas que auxiliam no estabelecimento de *tight junctions* entre células de Sertoli adjacentes e entre células de Sertoli e espermátídios (Upadhyay *et al.*, 2012).

Quando os espermatócitos I terminam a primeira divisão meiótica, designam-se espermatócitos II, e prosseguem para a segunda divisão meiótica, originando quatro células haploides – os espermatídios (Shalet, 2009).

A formação dos gâmetas masculinos implica ainda um processo designado espermiogénese, em que os espermatídios (Figura 1), redondos e com um núcleo concêntrico, se diferenciam em espermatozoides compostos por cabeça, peça intermédia e cauda. Na espermiogénese existe formação de um filamento axial, axonema, por atividade de centríolos, e o complexo de Golgi produz uma vesícula com enzimas hidrolíticas – acrossoma. A cromatina condensa e forma um núcleo compacto que dá forma à cabeça do espermatozoide, e as mitocôndrias organizam-se em espirais em torno da porção inicial do axonema, dando origem à peça intermédia (Sathananthan, 2013). A porção de axonema não rodeado por mitocôndrias é a designada peça principal, ou cauda. Além destes eventos, a espermiogénese implica ainda a redução do volume citoplasmático do espermatídio, por fagocitose pelas células de Sertoli, com intervenção das junções celulares especializadas (Upadhyay *et al.*, 2012).

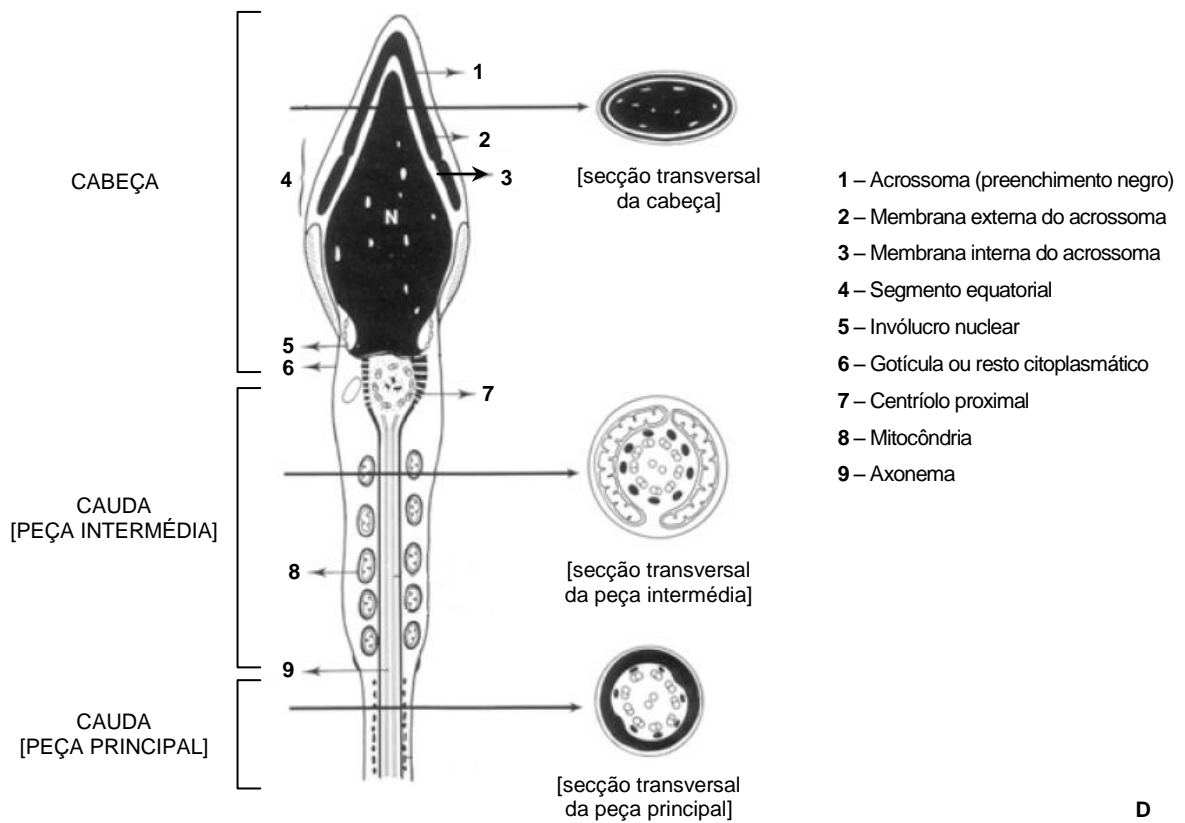
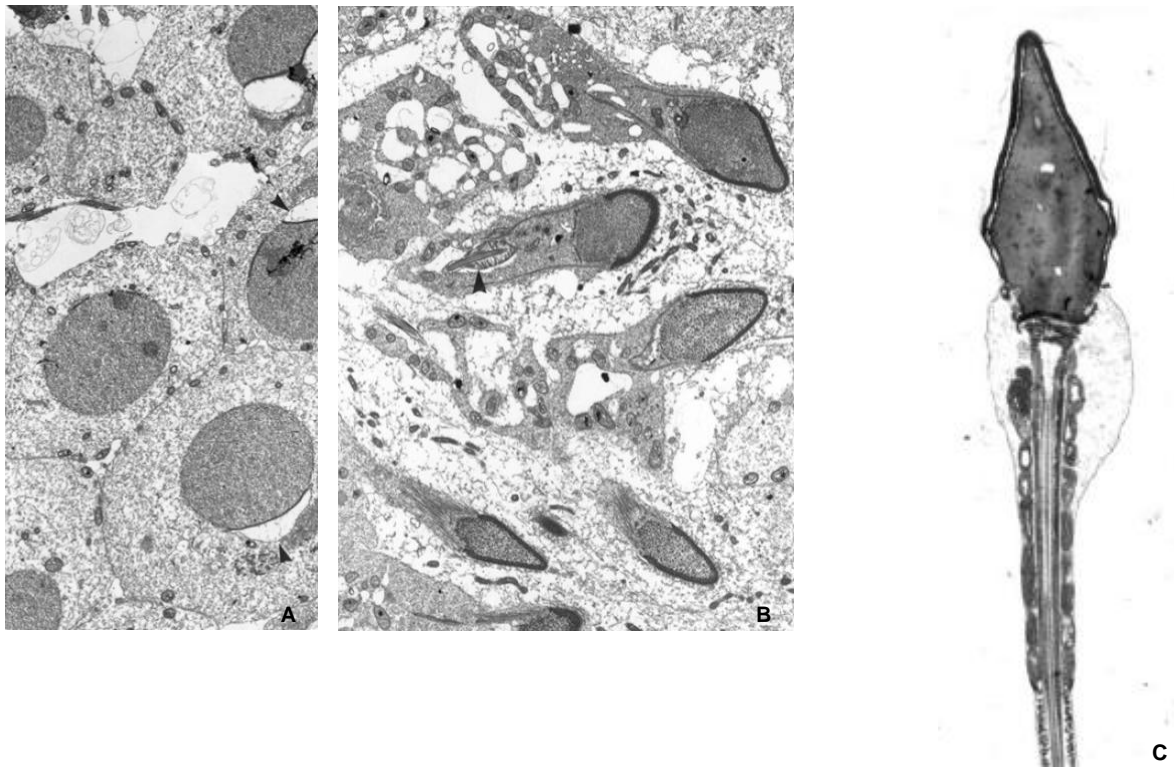
O espermatozoide humano (Figura 1) é uma célula altamente especializada, em estrutura e função, para permitir a progressão pelas vias femininas e o transporte dos cromossomas paternos, e do centrossoma, até ao gâmeta feminino (Sathananthan, 2013), e com frequência apresenta variações morfológicas e anomalias.

Considera-se morfológicamente normal um espermatozoide com uma cabeça ovalada e de contornos regulares, com 4-5µm de comprimento e 2-3µm de largura – que deve conter o núcleo e um acrossoma que ocupe 40-70% do volume –, seguida de um flagelo, com cerca de 50µm e sem deformidades. O flagelo pode ser dividido na sua extensão entre a porção em que o axonema é rodeado por espirais de mitocôndrias – peça intermédia –, que deve ser esguia e com um comprimento próximo do da cabeça, e na região posterior – cauda –, em que o flagelo apresenta uma espessura menor e uniforme em todo o comprimento (Sathananthan, 2013; WHO, 2010). Contudo, o principal critério de normalidade espermática consiste na capacidade de fertilizar um oócito e gerar descendência normal (Seandel e Rafii, 2011).

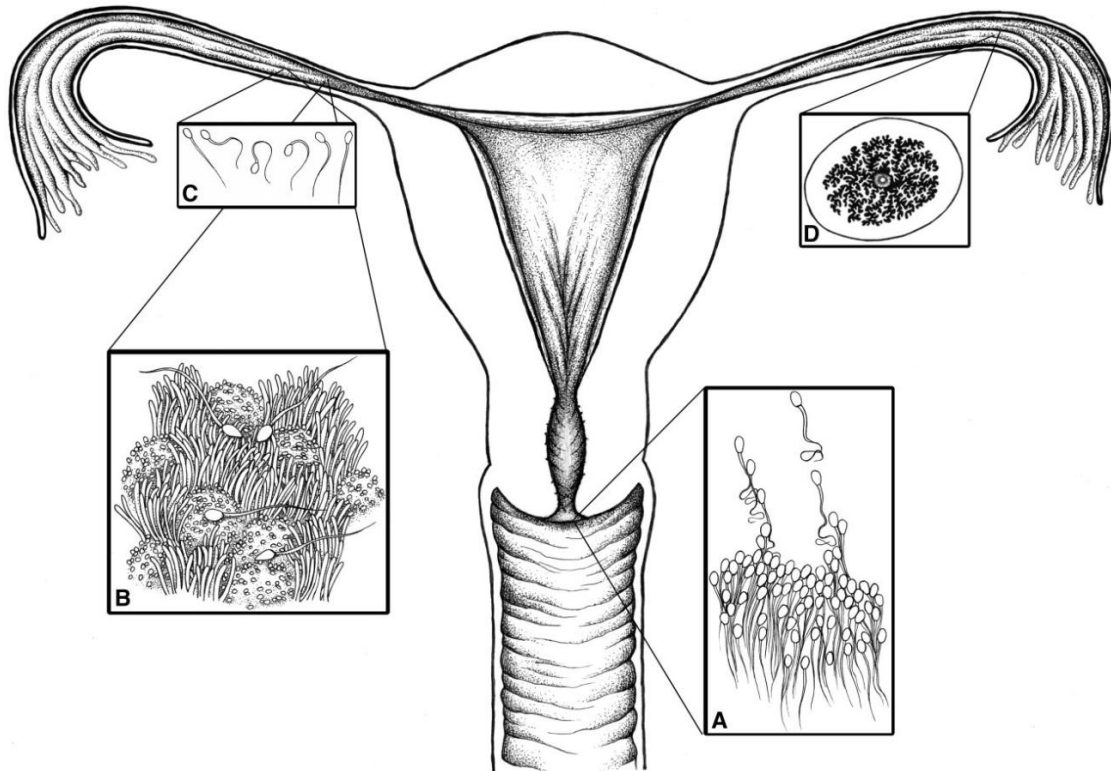
## 1.2. O aparelho reprodutor feminino

Um aparelho reprodutor feminino normalmente desenvolvido compreende dois ovários, duas trompas de Falópio, um útero no qual desembocam, uma vagina, e uma vulva – genitália externa constituída por clitóris, e lábios menores e maiores.

Os ovários são as gónadas femininas e além da produção de oócitos, são responsáveis pela síntese de hormonas. A camada externa dos ovários, córtex, contém



**Figura 1** – A, B e C - Ultraestrutura de espermátídios redondos (A) e espermátídios alongados (em espermiogénese) (B), sob ampliação de 5250x, e de espermatozoide observado a penetrar a zona pelúcida de um ócito humano, em secção longitudinal de, sob ampliação de 14000x, por microscopia eletrónica de transmissão. D - Diagrama da ultraestrutura do espermatozoide maduro. Adaptação de imagens retiradas de Sathananthan, 2013.



**Figura 2** – Ilustração do trato reprodutor feminino e etapas da migração dos gâmetas masculinos em direção ao local de fertilização. A – Espermatozoides à entrada do cérvix, na transição vagina-útero; B – Interação dos gâmetas masculinos com o epitélio da trompa de Falópio; C – Representação de espermatozoides com motilidade hiperativada; D – Oócito rodeado por células do *cumulus* em secção transversal da ampola. Ilustração retirada de Suarez e Pacey (2006).

milhares de células da linha germinativa precursoras dos oócitos, e a região interior, ou medula, é constituída por tecido conjuntivo de suporte, vasos sanguíneos, e enervação.

A constituição das trompas (Figura 2) compreende fímbrias, na extremidade proximal ao ovário correspondente, infundíbulo, ampola, istmo, e uma porção distal intramural, que estabelece a ligação com o útero. Por ação contrátil, as trompas direcionam a migração dos oócitos – libertados sob ação hormonal da LH, e após captação pelas fímbrias – e de eventuais embriões que se formem, em direção ao útero (Figura 2).

O útero constitui o local expectável de implantação do blastocisto gerado por fertilização do oócito e desenvolvimento embrionário, e apresenta um estrato funcional, mensalmente eliminado e novamente desenvolvido, em resultado de isquemia que apenas não ocorre se existirem estímulos produzidos por um embrião para que o endométrio se mantenha sem descamação.

### 1.2.1. **A oogénese e o oócito humano**

A oogénese é o processo complexo de formação de gâmetas femininos e é iniciada ainda no desenvolvimento fetal, quando as oogónias primordiais se

estabelecem, rodeadas por um epitélio de células foliculares, no córtex do ovário. Após alguns ciclos de proliferação mitótica, as oogónias iniciam a meiose e formam oócitos primários que ficam retidos na prófase da primeira divisão meiótica.

O desenvolvimento oocitário é retomado e completado após a puberdade, sob atuação hormonal, e até então, desde que se formam no feto até ao início da puberdade, a maioria dos oócitos primários sofre atresia. A partir da puberdade acontece estimulação hormonal do desenvolvimento oocitário e um conjunto de folículos e respetivos oócitos primários desenvolvem-se e retomam a meiose até à metáfase da segunda divisão meiótica – que só é completada caso ocorra fertilização (Wolpert *et al.*, 2007).

Ao contrário do que ocorre na espermiogénese, cada célula precursora origina apenas um oócito haploide, através de duas divisões meióticas assimétricas que resultam na formação de uma célula e de um glóbulo polar (GP) que degenera.

Durante o desenvolvimento, o oócito é envolvido por células da granulosa e da teca, que intervêm na nutrição e maturação, com hormonas, fatores de crescimento e metabolitos, e é sintetizada uma camada com filamentos embebidos numa matriz de glicoproteínas (zona pelúcida – ZP), entre o oócito e as células foliculares adjacentes.

A morfologia esperada para um oócito humano, é uma estrutura esférica com cerca de 100-120µm de diâmetro, com um citoplasma abundante, uniforme e translúcido, e sem inclusões intracitoplasmáticas, que permite a nutrição de um embrião que dele se forme (Sathanathan, 2013). Além da maioria <sup>2</sup> dos organelos presentes em células somáticas, os oócitos contêm grânulos corticais (GC) na periferia celular, em contiguidade com a oolema (Sathanathan, 2013).

O oócito maduro deve apresentar-se encerrado no interior de uma ZP uniforme e rodeada por uma camada de células foliculares, designada *corona radiata* (Sathanathan, 2013). No espaço perivitelino, compreendido entre o oócito e a ZP, deve ser identificável um GP (Balaban *et al.*, 2011; Sathanathan, 2013).

### 1.3. A interação dos gametas humanos

No decurso da ejaculação no trato genital feminino, milhões de gametas masculinos e o conjunto das secreções das glândulas anexas do sistema reprodutor, são depositados na proximidade do cérvix, num coágulo que se forma espontaneamente e impede que a retirada do pénis implique também a saída precoce do sémen (Lwaleed *et al.*, 2007). Em condições fisiológicas, o coágulo liquefaz entre 5 a 20 minutos após a ejaculação. Os processos que medeiam a liquefação do sémen implicam a ação proteolítica do antigénio específico da próstata (PSA), da vesiculase e de outras proteases da família das calicreínas (Emami *et al.*, 2008; Jequier, 2011b),

---

2 – O oócito maduro não contém centríolos. Após a fertilização o centrossoma de origem paterna assegura a mitose.

contidos nas secreções prostáticas, sobre os polipéptidos de coagulação contribuídos pelas secreções das glândulas seminais (Flori *et al.*, 2008; Jequier, 2011b).

A contribuição testicular do ejaculado constitui a primeira fração do sémen que percorre a uretra peniana e que contacta com o muco cervical. Esta posição facilita a progressão nas vias femininas e permite que o contacto dos gâmetas masculinos com o ambiente ácido hostil da vagina seja minimizado (Jequier, 2011a). As secreções testiculares e epididimais, das vesículas seminais, da próstata, das glândulas bulbouretrais e uretrais, só se encontram quando a ejaculação está concluída e, no coito, as frações que constituem o sémen podem não se misturar integralmente (Jequier, 2011b) e uma porção de espermatozoides pode não ficar sujeita aos processos de coagulação e liquefação (Jequier, 2011a).

O trânsito dos espermatozoides para o útero é condicionado pela constituição do meio altamente viscoso que é o muco cervical, que, durante a ovulação, exhibe alterações na constituição bioquímica que facilitam a progressão espermática (Druart, 2012). Este mecanismo permite que os gâmetas masculinos possam migrar pelo cérvix e útero e aceder ao local de fertilização quando existe um oócito disponível para fertilização.

A progressão de espermatozoides, nas vias femininas, dirigida ao oócito, é orientada por termotaxia e quimiotaxia. A termotaxia – uma das particularidades desenvolvidas no processo de capacitação (1.3.1. *Capacitação espermática*) –, implica a capacidade de reação a gradientes de temperatura, impelindo o movimento espermático em direção a temperaturas mais altas (Bahat *et al.*, 2012), e calcula-se que desempenhe um contributo essencialmente significativo na orientação da migração dos espermatozoides em direção ao local de fertilização.

Yoshida e Yoshida mencionam a progesterona como um dos potenciais agentes de quimiotaxia dos espermatozoides (2011) que são segregados pelo folículo em desenvolvimento até à ovulação, sucedendo a secreção pelo oócito maduro e pelas células do *cumulus* que o circundam (Sun *et al.*, 2005).

A interação do espermatozoide com o oócito acontece na proximidade da ampola, nas trompas de Falópio, e implica a progressão do gâmeta masculino pelas camadas de células do *cumulus* e pela ZP. Ainda não é claro se o processo pelo qual o espermatozoide penetra pela camada de células do *cumulus* depende exclusivamente da ação de motilidade hiperativada e proteínas de membrana (Gadella e Evans, 2011). Em seguida, as alterações na cabeça do espermatozoide que resultam da capacitação (1.3.1. *Capacitação espermática*) permitem a ligação à ZP, e conseqüentemente, que se despolette uma reação rápida e irreversível de exocitose de enzimas hidrolíticas contidas no acrossoma, como a acrosina e a hialuronidase, –

reação acrossómica (RA) – que atuam sobre proteínas da ZP e facilitam a progressão do espermatozoide até ao espaço perivitelino (De Lamirande *et al.*, 2012).

A ligação do espermatozoide à ZP envolve pelo menos três (ZP1, ZP3 e ZP4) proteínas da ZP e várias proteínas espermáticas possivelmente organizadas em complexos proteicos de ligação à ZP, e algumas proteínas destes complexos proteicos espermáticos podem ser necessárias à indução RA. O canal de potássio pode mediar o aumento da concentração citosólica de iões  $\text{Ca}^{2+}$  – que conduz à exocitose do conteúdo do acrossoma – através da ação de uma hiperpolarização de membrana, induzida por iões  $\text{K}^+$ , sobre canais transportadores de cálcio e, pela mesma linha de raciocínio, a presença de uma fosfatase no complexo de ligação à ZP pode indicar que a ligação ativa eventos de sinalização envolvidos na indução da RA (Gadella e Evans, 2011).

A consequente RA resulta da interação de proteínas SNARE (receptores proteicos de ligação de fator sensível a N-etilmaleimida solúvel) entre a membrana exterior do acrossoma e a membrana citoplasmática da região pré-equatorial da cabeça do espermatozoide. As membranas fundem pontualmente, formando vesículas de membrana mista e descontinuidades da membrana externa do acrossoma que permitem a extrusão do seu conteúdo – com a remoção da membrana plasmática da região pré-equatorial em vesículas, a membrana interna e da região equatorial do acrossoma ficam expostas (Kierszenbaum, 2000; Gadella e Evans, 2011).

### 1.3.1. **Capacitação espermática**

A capacitação do espermatozoide engloba mecanismos que atuam sobre a cabeça e a cauda, e concedem a capacidade de fertilização do oócito. As primeiras alterações acontecem segundos após a ejaculação, em consequência das concentrações elevadas do ião cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e do ião hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) presentes no líquido seminal, e resultam na ativação de movimentos vigorosos e assimétricos do flagelo.

O ião  $\text{HCO}_3^-$  entra no espermatozoide através do co-transportador  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ , elevando a sua concentração intracelular, e gera um aumento do pH e na ativação de uma adenilil ciclase solúvel, específica do sémen (SACY). Por outro lado, os níveis de  $\text{HCO}_3^-$  alteram a assimetria da membrana plasmática do espermatozoide, possivelmente pela ativação de uma translocase bidirecional, que faz a translocação de fosfolípidos de membrana e aumenta a disponibilidade de colesterol para aceitadores externos.

Simultaneamente, através de um aumento dos níveis intracelulares de cAMP, a SACY conduz à ativação da proteína cinase A (PKA) – que modula a resposta de canais de cálcio –, induzindo alterações no potencial de membrana e aumentando a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Os restantes eventos envolvidos na capacitação ocorrem no trato genital feminino e, no conjunto, resultam em alterações no padrão de movimento espermático, num processo conhecido como hiperativação, e em alterações na cabeça do espermatozoide. Estes processos são lentos e iniciam-se com a remoção de colesterol da membrana do espermatozoide, que resulta numa membrana mais fluida e em rearranjos de jangadas lipídicas. Nesta fase, a PKA fosforila proteínas em resíduos serina (Ser) e treonina (Thr), mediando a ativação de cinases, e a inibição de fosfatases, que provocam um aumento na fosforilação em resíduos tirosina (Tyr) (Signorelli *et al.*, 2012).

### 1.3.2. **Fertilização**

A fertilização *in vivo* envolve a aderência e fusão espontânea espermatozoide-oócito, e culmina com formação de uma entidade biológica geneticamente distinta e totipotente, o zigoto (Evans, 2012; Sathanathan, 2013).

Em resultado da fusão da membrana espermática com a oolema, é despoletado um aumento transiente na concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  que medeia um conjunto de eventos de sinalização compreendidos no conceito de ativação do oócito – desgranulação cortical, retoma da segunda divisão meiótica, e formação dos pronúcleos haploides paterno e materno (Miyazaki, 2006, Nomikos *et al.*, 2011).

A desgranulação cortical consiste numa reação rápida de excitose de grânulos corticais (GC) para o espaço perivitelino. O conteúdo dos GC atua sobre glicoproteínas da ZP e promove o endurecimento da mesma. Esta reação impede que outros espermatozoides migrem até ao espaço perivitelino, e, conjuntamente com o mosaicismo de membrana gerado pela integração das membranas do espermatozoide e dos GC na oolema, estabelece um bloqueio à polispermia (Sathanathan, 2013).

Simultaneamente com a extrusão do segundo glóbulo polar (GP II) para o espaço perivitelino, após a conclusão da meiose, vesículas do retículo endoplasmático liso (REL) do oócito formam um invólucro nuclear em torno dos cromossomas maternos, originando o pronúcleo (PN) feminino. Após expansão do núcleo espermático no ooplasma, descondensação do ADN, e degradação do invólucro nuclear de origem paterna, o PN masculino apresenta um invólucro nuclear formado por vesículas do REL do oócito (Sathanathan, 2013). Os corpos percursores dos nucléolos<sup>3</sup> (CPN) tornam-se discerníveis durante a formação dos PN e desaparecem antes da singamia e início da clivagem do zigoto, e, por estarem ligados à cromatina, devem exibir polarização e simetria entre os PN masculino e feminino (Papale *et al.*, 2012).

O final da fertilização, cerca de 17 a 20 horas após a fusão espermatozoide-oócito, é mediado pelo centrossoma espermático, que organiza o primeiro fuso mitótico do zigoto.

---

3 - Os nucléolos são locais de síntese de pré RNA ribossómico inerente aos processos de tradução quando o genoma embrionário se torna ativo (Papale *et al.*, 2012).

O fuso mitótico dirige a migração dos PN masculino e feminino para o centro do zigoto, e orienta a rotação necessária para que o eixo longitudinal dos PN se alinhe com o segundo GP. Deste modo os PN adquirem a orientação apropriada ao plano da primeira divisão mitótica (Papale *et al.*, 2012). Os invólucros dos PN justapostos decompõem-se e os cromossomas parentais agrupam-se, durante o processo de singamia, que resulta na formação do zigoto diploide (Sathanathan, 2013).

#### 1.4. O embrião humano

A primeira divisão do zigoto resulta na formação de um embrião com dois blastómeros, que enquanto é conduzido pela trompa até ao útero, sofre mais algumas clivagens, e passa a apresentar primeiro quatro, depois oito, e assim sucessivamente.

A aderência intercelular surge e aumenta no embrião com oito blastómeros, num processo que está associado à ativação do genoma embrionário, e, ao quarto dia, o embrião sofre compactação e apresenta-se como um aglomerado de células indistinguíveis que deve reunir entre 16 e 32 blastómeros (Prados *et al.*, 2012), designado mórula.

A etapa seguinte do desenvolvimento embrionário é a acumulação de fluido entre as células que compõe a mórula – cavitação –, que ocorre habitualmente entre o quarto e quinto dia do desenvolvimento embrionário, e marca o início do estágio de blastocisto. O fluido e o número de células aumentam, e resultam num aumento do volume do blastocisto e consequente diminuição da espessura da ZP que o rodeia. Durante a expansão do blastocisto torna-se progressivamente mais discernível uma massa celular densa – massa celular interna (MCI) – e uma camada de células que revestem internamente a ZP – trofoectoderme (TF), até que o blastocisto eclode (Hardarson *et al.*, 2012), ao quinto dia de desenvolvimento.

A implantação do blastocisto eclodido ocorre entre o sexto e o sétimo dia do desenvolvimento embrionário pós-fertilização (Sathanathan, 2013), e implica ancoragem no endométrio e aderência ao seu epitélio. Em seguida, o blastocisto inicia a infiltração no estroma, e induz a formação de uma rede vascular que permita a sua nutrição e desenvolvimento, e a tolerância materna aos antigénios de origem paterna. Hormonas, fatores de crescimento, citoquininas, moléculas de aderência, e enzimas de degradação da matriz, atuam na interação endométrio-blastocisto, e resultam numa resposta inflamatória local e inflamação sistémica, e permitem a proteção do feto contra infeções e rejeição materna (Abdelhamid, 2013).

O ácido hialurónico (AH) é uma macromolécula abundante no fluido uterino, cuja síntese no endométrio aumenta no período da expectável implantação, e diminui logo no dia que a sucede. Esta variação da disponibilidade do AH, em conjunto com o facto

de o embrião humano e o endométrio expressarem recetores para o AH, sugere que o AH pode estar envolvido na aderência do blastocisto ao endométrio, e que desempenha então um papel fisiológico na implantação (Nakagawa *et al.*, 2012).

## 2. INFERTILIDADE CONJUGAL – ABORDAGEM E CAUSAS

A infertilidade é uma doença do sistema reprodutivo definida como a incapacidade de um casal alcançar uma gravidez clinicamente comprovável por ecografia, após um período igual ou superior a doze meses de relações sexuais frequentes e sem proteção contraceptiva (Zegers-Hochschild *et al.*, 2009). Estima-se que, em 2010, existissem cerca de 48,5 milhões de casais inférteis em todo o mundo (Mascarenhas *et al.*, 2012).

Qualquer transtorno que comprometa processos fisiológicos envolvidos na reprodução, pode dificultar ou impedir que se estabeleça uma gravidez. O estudo do casal infértil tem como propósito identificar o fator de infertilidade e deve iniciar-se pelas investigações mais simples e menos invasivas, e seguir uma metodologia sequencial, de agressividade progressiva, com início na anamnese exhaustiva e exame físico. Devem ser reunidas informações relativas à história reprodutiva, médica, e cirúrgica, sexualidade, elementos ambientais, ocupacionais, ou comportamentais, passíveis de prejuízo à capacidade fértil, e normalidade da anatomia reprodutora.

A identificação de um fator de infertilidade permite, além da seleção de abordagem terapêutica apropriada à restituição da capacidade fértil e à conceção de uma gravidez, a gestão de expectativas em situações em que os tratamentos disponíveis não viabilizem a possibilidade de paternidade biológica.

### 2.1. *Fatores femininos de infertilidade conjugal*

Para que possa ocorrer gravidez, além da libertação de um oócito que seja captado pelas fímbrias, e de desenvolvimento do endométrio adequado à implantação de um eventual embrião, o elemento feminino de um casal deve apresentar um aparelho reprodutor harmonicamente desenvolvido, e capacidade de relaxamento e receção do órgão copulador durante o coito.

Os principais fatores femininos de infertilidade relacionam-se com disfunção ovulatória, malformações anatómicas que resultam do desenvolvimento inadequado dos ductos de Müller (Grimbizis *et al.*, 2013), alterações na permeabilidade das trompas, secreções cervicais hostis, e anomalias uterinas que condicionem a migração dos gametas masculinos e a implantação.

Independentemente de outros fatores, a idade é um fator que condiciona particularmente a fertilidade feminina. Este contraste entre o efeito da idade no homem e na mulher pode ser compreendido pelo facto de os telómeros do oócito encurtarem com o aumento da idade na mulher, enquanto nos gâmetas masculinos, os telómeros alongam com a idade<sup>4</sup> (Kalmbach *et al.*, 2013).

## 2.2. Fatores masculinos de infertilidade conjugal

Ao elemento masculino de um casal que pretenda conceber uma gravidez, é essencial que apresente um órgão copulador normalmente desenvolvido, capaz de ereção, e de ejaculação oportuna com propulsão de gâmetas morfológica e funcionalmente normais, para o interior das vias reprodutoras femininas. Qualquer fator que condicione este sistema pode ser responsável por infertilidade conjugal.

A infertilidade masculina pode dever-se, essencialmente, a causas de etiologia secretora, por fatores testiculares ou hormonais, ou de etiologia excretora, associada a anomalias anatómicas, perturbações erécteis ou sexuais, distúrbios da ejaculação, ou obstruções dos ductos. Além de fatores de origem genética, cirúrgica, ou infecciosa, fatores comportamentais como o consumo de álcool e tabagismo (Gaur *et al.*, 2010), e a prática frequente de sauna (Garolla *et al.*, 2013), podem também condicionar a espermatogénese e inerentemente constituir um entrave à capacidade reprodutiva.

As principais causas identificáveis de fator masculino de infertilidade incluem varicocelo, obstruções do trato genital, falência testicular, criptorquidia, exposição a gonadotóxicos, patologias genéticas, infeções, disfunções hormonais, perturbações imunológicas, disfunção sexual ou eréctil, e doenças sistémicas (Esteves *et al.*, 2011).

### 2.2.1. **Espermograma – avaliação de parâmetros espermáticos**

O fluido produzido pela junção de secreções testiculares e das glândulas acessórias do sistema reprodutor, como resultado da ejaculação – designado sémen, ou esperma – apresenta grande variabilidade, mesmo considerando amostras de um único indivíduo. Além da variação esporádica devida a fatores que pontualmente comprometam a espermatogénese, estão descritas alterações da composição espermática associadas ao aumento da idade (Eskenazi *et al.*, 2003; Ng *et al.*, 2004), flutuações sazonais – melhoria de parâmetros espermáticos na primavera e inverno (Levitas *et al.*, 2013) –, e associação entre tempo de estimulação que precede a ejaculação e a qualidade espermática (Pound *et al.*, 2002). Esta última fonte de influência pode fundamentar a variação da qualidade espermática dependente do método de colheita, que associa melhores parâmetros espermáticos a amostras

---

4 – O aumento do comprimento dos telómeros nos espermatozoides resulta, possivelmente, da ação contínua da telomerase sintetizada em abundância nas espermatogónias (Kalmbach *et al.*, 2013).

obtidas por coito com preservativo sem espermicida, comparando com amostras produzidas por masturbação (WHO, 2010).

Como a função espermática pode ser condicionada por fatores relacionados com os gâmetas, como a motilidade, número, e morfologia, e pela composição do líquido seminal, o espermograma é um procedimento pertinente, inicial, e pouco invasivo, da investigação do elemento masculino do casal infértil. Através da avaliação de propriedades físicas e citomorfológicas do ejaculado, com protocolos claros, bem fundamentados, e padronizados, um espermograma deve reunir informação respeitante à produção de gâmetas, permeabilidade do sistema de ductos pós-testiculares, e atividade secretora das glândulas acessórias do sistema reprodutivo.

Além dos critérios de normalidade (Tabela 1) estabelecidos pela análise de amostras de homens comprovadamente férteis <sup>5</sup>, a interpretação dos dados de um espermograma deve ter em consideração a possibilidade de, no trato genital feminino, a mistura das frações que constituem o sémen não se processar de forma homogénea como simulado em laboratório para a análise dos parâmetros seminais (Jequier, 2011b), e que a expressão da fertilidade masculina é, em muito, dependente do elemento feminino, pelo que extrapolações de (in)fertilidade devem ser feitas com prudência.

A produção de espermatozoides, em situações de azoospermia da amostra seminal (Tabela 2), pode ser confirmada através de análise de fragmentos testiculares obtidos por biópsia. Em contextos de azoospermia obstrutiva, a biópsia testicular torna viável a extração e criopreservação de gâmetas para ciclos de fertilização *in vitro*.

**Tabela 1** – Valores mínimos e classificações de referência para amostras consideradas normais pela OMS (WHO, 2010).

PARÂMETRO	VALOR MÍNIMO/CLASSIFICAÇÃO DE REFERÊNCIA
Liquefação	Completa até 60 minutos após a ejaculação
Volume do ejaculado	1,5mL
Viscosidade	Normal (gotas bem definidas / filamentos de ligação à pipeta < 2cm)
pH	7,2
Cor	Cinzento/esbranquiçado
Aglutinação	Ausente
Motilidade (progressiva + <i>in situ</i> )	40%
Motilidade progressiva	32%
Vitalidade	58%
Hipoosmolaridade	58%
Concentração de espermatozoides	15x10 <sup>6</sup> /mL
Número total de espermatozoides	39 x 10 <sup>6</sup>
Morfologia normal	4%
Número de leucócitos	< 1x10 <sup>6</sup> /mL

5 – A noção de comprovadamente férteis compreende homens que foram pais ou cujas companheiras tenham engravidado num período anterior ao espermograma não superior a um ano (OMS, 2010).

**Tabela 2** – Terminologia habitual de designação de variações nos parâmetros da qualidade espermática (WHO, 2010).

NOMENCLATURA	DESCRIÇÃO
Aspermia	Ausência de sémen (ausência de ejaculação ou ejaculação retrógrada).
Astenozoospermia	Percentagem de espermatozoides progressivos inferior ao limite mínimo de referência.
Azoospermia	Ausência de espermatozoides no ejaculado.
Criptozoospermia	Ausência de espermatozoides nas preparações a fresco do ejaculado, mas identificáveis em preparações após centrifugação da amostra.
Hematospermia	Presença de eritrócitos no ejaculado.
Leucospermia	Presença de leucócitos no ejaculado acima do limite de referência.
Necrozoospermia	Percentagem baixa de espermatozoides vivos /percentagem alta de espermatozoides imóveis.
Normozoospermia	Número total de espermatozoides/concentração, e percentagens de espermatozoides progressivos e morfológicamente normais, iguais ou superiores aos limites de referência.
Oligoastenozoospermia	Número total de espermatozoides/concentração, e percentagem de espermatozoides progressivos, inferiores aos limites de referência.
Oligoastenoteratozoospermia	Número total de espermatozoides/concentração, e percentagens de espermatozoides progressivos, e morfológicamente normais, inferiores aos limites de referência.
Oligoteratospermia	Número total de espermatozoides/concentração, e percentagem de espermatozoides morfológicamente normais, inferiores aos limites de referência.
Oligozoospermia	Número total de espermatozoides, ou concentração, inferior ao limite de referência.
Teratozoospermia	Percentagem de espermatozoides morfológicamente normais inferior ao limite de referência.

### 3. PROCRIAÇÃO MEDICAMENTE ASSISTIDA

Por acordo da OMS e do ICMART (*International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology*), o conceito de procriação medicamente assistida (PMA) define-se como a reprodução alcançada com recurso a indução da ovulação, estimulação ovárica controlada <sup>6</sup>, inseminação intrauterina, intracervical, ou intravaginal, com sémen de parceiro ou de dador, ou a técnicas de reprodução assistida (TRA). Na mesma publicação, o conceito de TRA é clarificado como qualquer tratamento ou procedimento que, visando alcançar gravidez, envolva manipulação *in vitro* de gâmetas masculinos e femininos, ou embriões (Zegers-Hochschild *et al.*, 2009).

Atualmente, a PMA não têm aplicabilidade confinada ao aumento da probabilidade de um casal infértil conseguir uma gravidez pretendida, sendo também pertinente em situações que afigurem o risco de transmissão à descendência de doenças genéticas ou víricas graves. A abordagem terapêutica pode variar desde

---

<sup>6</sup> - A estimulação ovárica controlada consiste no recurso a fármacos para induzir o desenvolvimento e maturação de oócitos, e realiza-se sob controlo com análises e/ou ecografias.

opções de atuação estritamente clínica, como a indução de ovulação e recomendação de coito programado, a procedimentos mais invasivos, como fertilizações *in vitro*, que envolvem a conjugação de protocolos de intervenção clínica e laboratorial, e permitem a manipulação e triagem de gâmetas e embriões. O protocolo a adotar em cada circunstância deverá ser selecionado tendo em consideração as informações recolhidas na investigação do casal, taxas de sucesso, custos, invasividade dos procedimentos, e resultados de eventuais ciclos de tratamento anteriores.

### 3.1. Manipulação laboratorial de gâmetas

Os protocolos de manipulação laboratorial de espermatozoides e oócitos visam assegurar as condições mais propícias à preservação da viabilidade celular dos gâmetas e ao estabelecimento de uma gravidez, e constituem uma etapa crucial para o sucesso de ciclos de inseminação artificial, fertilização *in vitro*, ou criopreservação de gâmetas.

A presença de espermatozoides mortos ou lesados nas amostras de sémen está associada à libertação de espécies reativas de oxigénio e a fragmentação de ADN, e pode comprometer a capacidade fecundante dos gâmetas masculinos viáveis (Roca *et al.*, 2013). Os protocolos de preparação espermática devem permitir a separação de gâmetas e líquido seminal, e a seleção de uma população de espermatozoides funcionalmente e morfológicamente normais, capazes de fertilização (Henkel, 2012; WHO 2010). Adicionalmente, o processamento de amostras seminais pode ser relevante na profilaxia da transmissão à descendência de doenças de origem vírica – a lavagem de gâmetas pode ser suficiente para impedir a transmissão de VIH à descendência e a parceiros não infetados, em casais com o elemento masculino VIH-positivo (Agboghoroma e Giwa-Osagie, 2012) – ou de associação a cromossomas sexuais (3.1.1. *Separação de espermatozoides X e Y por citometria de fluxo*).

É expectável que a secreção da matriz de AH, que se acumula entre as células que rodeiam o oócito, durante o desenvolvimento folicular, aumente a distância intracelular na periferia do oócito, e o estado de expansão dos complexos CCO recolhidos na punção folicular pode indiciar o estado de maturação do gâmeta feminino. A desnudação do oócito é o procedimento, inerente a protocolos de fertilização *in vitro* por microinjeção (3.3. *Fertilizações in vitro*) ou de criopreservação (3.4. *Criopreservação de gâmetas e embriões*), pelo qual, mecânica ou enzimaticamente, se removem as células do complexo CCO que revestem a ZP, e permite confirmar o estado de maturação e as características morfológicas do gâmeta. Sendo os oócitos particularmente suscetíveis a dano, e de forma a evitar oscilações térmicas não fisiológicas, é recomendável o recurso a placas de aquecimento para manter os materiais envolvidos na sua manipulação a aproximadamente 37°C.

### 3.1.1. **Separação de espermatozoides X e Y por citometria de fluxo**

Os conteúdos em ADN de espermatozoides portadores dos cromossomas X, e de portadores do Y, diferem cerca de 3%, e tornam viável a separação de subpopulações espermáticas por citometria de fluxo. Através da marcação com fluoróforos como o Hoechst 33342 – capaz de penetrar a membrana celular de células vivas, e de se ligar de maneira reversível a pares de adenina e timina expostos na cadeia dupla de ADN –, os gâmetas podem ser detetados e separados automaticamente, com base na intensidade da fluorescência que emitem, que dependerá do cromossoma sexual portado (Garner, 2009; De Geyter *et al.*, 2013).

De Geyter (2013) relatou a primeira gravidez, na Suíça, com recurso a citometria de fluxo para seleção de espermatozoides portadores do cromossoma X, no decurso da fertilização *in vitro* de uma portadora da distrofia muscular de Becker<sup>7</sup>. Este registo surge no seguimento de cerca de 924 nascimentos desde a pioneira aplicação da técnica, no início da década de 90. Embora as motivações da implantação da técnica na Suíça se prendam com legislações estritas, que inviabilizam a criação de um número superior a três embriões por ciclo de fertilização *in vitro* – que tornariam pouco praticável o diagnóstico genético pré-implantatório (3.3.1.2. Diagnóstico Genético Pré-Implantatório (DGPI)) –, a seleção de subpopulações de gâmetas masculinos baseada no cromossoma sexual, terá aplicabilidade global ao permitir prevenir a transmissão de doenças genéticas de associação aos cromossomas sexuais, e reduzir o número de embriões supranumerários necessários para DGPI (3.3.1.2. Diagnóstico Genético Pré-Implantatório (DGPI)) (De Geyter *et al.*, 2013). A possibilidade de seleção sexual da descendência, desprovida de motivação relacionada com a profilaxia de doenças graves, suscita, necessariamente, questões éticas, e obrigará a discussão e criação de legislação adequada para salvaguardar aplicações da técnica que sejam consideradas indevidas.

### 3.1.2. **Maturação *in vitro* de gâmetas**

A cultura em meio apropriado – suplementado com LH e FSH – por até 48h, permite que oócitos imaturos amadureçam em ambiente laboratorial, e proporciona uma alternativa simples, mais acessível e segura – não envolve custos de fármacos para estimulação ovárica e inerentemente não acarreta o risco de síndrome de hiperestimulação ovárica (SHO)<sup>8</sup> –, aos protocolos convencionais que envolvem estimulação ovárica prévia a criopreservações de oócitos e a técnicas de fertilização *in vitro*. Ainda assim, os ciclos de

---

7 – A distrofia muscular de Becker é uma doença recessiva associada ao cromossoma X e caracteriza-se pela perda progressiva de força muscular nos membros inferiores e músculos pélvicos (De Geyter *et al.*, 2013).

8 – O síndrome da hiperestimulação ovárica (SHO) consiste numa complicação potencialmente fatal, decorrente de estimulação ovárica com hormonas exógenas.

fertilização *in vitro* com oócitos maturados *in vitro* apresentam taxas de sucesso (nascidos vivos) inferiores aos de ciclos com estimulação ovárica (Gremeau *et al.*, 2012).

Ao viabilizar a gestão laboratorial de oócitos imaturos, recolhidos em qualquer fase do ciclo ovárico <sup>9</sup> (Grynberg *et al.*, 2013), a maturação *in vitro* de oócitos constitui um procedimento particularmente pertinente em contextos de inadiável preservação da fertilidade, ou em que a administração exógena de hormonas para estimulação ovárica não seja eficaz ou configure possível prejuízo, decorrentes de tratamento gonadotóxico iminente, patologias sensíveis a alterações nos níveis de estrogénio, como a leucemia, resistência ovárica ao FSH, insuficiência ovárica precoce, ou ovários poliquísticos.

Em contraste, os protocolos de maturação *in vitro* de células da linha germinativa masculina, em mamíferos, ainda não permitiram estudos conclusivos que possibilitem a aplicabilidade clínica, com segurança, em humanos (Seandel e Rafii, 2011).

Ainda assim, a cultura de testículos de murganhos *ex vivo* – em meio com uma formulação isenta de soro, adequada à cultura de células embrionárias estaminais em estado indiferenciado, e suplementado com FSH e testosterona –, permitiu reconstituir a espermatogénese *in vitro*, e os espermátídios redondos e espermatozoides maturados *in vitro* resultaram, por fertilização *in vitro* com microinjeção intracitoplasmática, em descendência saudável e reprodutivamente competente (Sato *et al.*, 2011), pelo que parece fornecer uma possibilidade promissora de desenvolvimento *in vitro* de gâmetas, para pacientes pré-pubescentes sujeitos a tratamentos gonadotóxicos.

### 3.1.3. **Gâmetas artificiais**

O alcance das técnicas de PMA com gâmetas do casal cinge-se a pacientes com gâmetas em número e qualidade suficientes. Assim, uma porção significativa de casais com infertilidade conjugal fica desprovida de possibilidades de paternidade genética.

Os gâmetas artificiais surgem no sentido de colmatar a carência de gâmetas, e através da incorporação de ADN parental, e com recurso a protocolos de PMA, permitirão tornar viável a geração de descendência biológica em contextos de ausência de gâmetas próprios viáveis. Contudo, embora atualmente seja viável criar células artificiais com semelhanças moleculares e fisiológicas aos gâmetas humanos, os gâmetas artificiais ainda não exibem funcionalidade plena (Kashir *et al.*, 2012).

Apesar das questões éticas que possa despoletar, o desenvolvimento de gâmetas artificiais proporcionará, virtualmente, além de aplicabilidade em uso clínico no tratamento da infertilidade humana, um modelo de estudo e ferramenta de treino relevantes em investigação, e formação, em biologia celular e da reprodução, e em embriologia.

---

9 – Embora a extração de oócitos imaturos seja possível independentemente da fase do ciclo ovárico, idealmente a punção ovárica deveria processar-se no termo da fase folicular, de maneira a recolher, além dos oócitos a maturar *in vitro*, um oócito maduro, do folículo dominante (Grynberg *et al.*, 2013).

### 3.2. Inseminações artificiais

John Hunter, cirurgião inglês que viveu entre 1728 e 1793, terá sido pioneiro na abordagem da infertilidade, sendo-lhe atribuída a responsabilidade pela primeira inseminação artificial humana. Segundo registos escritos do sobrinho, datados de 1799, Hunter terá aconselhado um marido com hipospádias a recolher o ejaculado com uma seringa e a depositá-lo na vagina da mulher (Priehl *et al.*, 2000).

As inseminações artificiais (IA) são procedimentos pouco invasivos e de baixo custo, quando comparadas com os procedimentos de fertilização *in vitro*, e envolvem protocolos laboratoriais simples que permitem, em determinadas circunstâncias, ultrapassar as condicionantes ao estabelecimento de uma gravidez, sendo particularmente pertinentes no contexto de infertilidade conjugal inexplicada, por fator cervical ou imunológico, ou disfunções ejaculatórias (Allahbadia e Merchant, 2012). Usualmente é requerida monitorização do ciclo ovárico ou indução da ovulação, e obtenção, preparação, e transferência intravaginal, intracervical, ou intrauterina (IIU), de gâmetas masculinos – do parceiro (IA intraconjugal, ou homóloga) ou com gâmetas de dador (IA heteróloga) –, com o auxílio de um cateter.

Artigos recentes sugerem que a indução de dano ligeiro e intencional no endométrio despoleta uma resposta inflamatória local que beneficia a recetividade do endométrio à implantação de embriões (Gibreel *et al.*, 2013; Granot *et al.*, 2012; Nastri *et al.*, 2013; Potdar *et al.*, 2012). Abdelhamid (2013) refere que este procedimento, realizado na fase proliferativa do ciclo em que se processe a IA, ou no que o anteceda, aumenta as taxas de gravidez relativamente a ciclos sem lesão do endométrio.

### 3.3. Fertilizações *in vitro*

O conceito de fertilização *in vitro* designa a generalidade das técnicas que impliquem a incorporação de espermatozoides em oócitos como um processo extracorporal, em ambiente laboratorial controlado. Inerentemente, ciclos de tratamento com recurso a fertilização *in vitro*, compreendem etapas de estimulação ovárica controlada, recolha, observação e preparação laboratorial dos oócitos, obtenção e processamento de gâmetas masculinos, e fecundação dos oócitos, e permitem, através da transferência de embriões selecionados após cultura *in vitro*, diretamente para o útero, ultrapassar barreiras físicas que possam condicionar a deslocação de gâmetas, e aumentar as probabilidades de implantação e gravidez. Eventualmente pode ainda existir recurso a hormonas exógenas para assegurar a manutenção do endométrio.

A adicionar à pertinência em contexto de infertilidade conjugal, particularmente em situações de escassez de gâmetas masculinos com capacidade fertilizante, ou

devida a fatores oocitário, tubal ou cervical, a fertilização e desenvolvimento embrionário *in vitro* permitem a profilaxia da transmissão à descendência de doenças graves, de origem genética, através de um estudo genético precoce, alternativo ao diagnóstico genético pré-natal convencional (3.3.1.2. Diagnóstico Genético Pré-Implantatório (DGPI)).

Após a recolha e preparação dos gâmetas masculinos e femininos, a fertilização *in vitro* pode decorrer mediante co-incubação de oócitos e espermatozoides em meio que forneça carboidratos e aminoácidos essenciais, e sob a atmosfera controlada de uma estufa – FIV convencional.

Alternativamente pode ser recomendável proceder à microinjeção intracitoplasmática de um espermatozoide viável e morfológicamente normal em cada oócito maduro disponível – ICSI. Este protocolo permite ultrapassar condicionantes à fertilização relacionados com parâmetros espermáticos anormais, sendo particularmente relevante na sucessão de ciclos de FIV com falha na fertilização ou por número limitado de oócitos disponíveis, e permite a fertilização *in vitro* com espermatozoides imóveis, obtidos por punção testicular ou do epidídimo, e eventualmente com espermátídios.

Contudo, a perceção de normalidade morfológica varia de acordo com a ampliação e resolução empregues. A aplicação de ferramentas computadorizadas permitiu aumentar a capacidade de análise da ultraestrutura celular com ampliações superiores a 6000x, e o desenvolvimento de um método de avaliação de espermatozoides móveis, e não corados, em tempo real (*motile sperm organelle morphology examination* - MSOME), que possibilita a deteção de anomalias morfológicas subtis<sup>10</sup> e de vacúolos na cabeça espermática de gâmetas que, sob a ampliação de 200-400x empregue na ICSI, seriam selecionáveis para microinjeção (Delaroche *et al.*, 2013; Marci *et al.*, 2013; Setti *et al.*, 2013; Wilding *et al.*, 2011). A aplicação deste método à seleção de espermatozoides resultou numa derivação da ICSI, a microinjeção de espermatozoides selecionados morfológicamente (IMSI).

Embora a IMSI possa ser recomendável no contexto de falhas recorrentes na implantação de embriões decorrentes de protocolos alternativos de fertilização *in vitro*, por estar associada ao desenvolvimento de mais embriões de melhor qualidade, e a taxas de fragmentação inferiores (Delaroche *et al.*, 2013; Wilding *et al.*, 2011), o benefício da aplicação generalizada da técnica – que implica custos superiores aos de ciclos de FIV ou ICSI –, é controverso (Marci *et al.*, 2013; Montjean *et al.*, 2012; Setti *et al.*, 2013).

### 3.3.1. **Cultura, monitorização, e seleção de embriões**

A cultura *in vitro* de embriões estabelecidos por fertilização *in vitro* pode processar-se em meios de formulação constante até blastocisto, que não consideram as alterações

---

10 – Entre outras, alterações morfológicas na peça intermédia podem condicionar a função espermática ao interferir na formação do áster pelo centríolo (Terada *et al.*, 2010).

fisiológicas do desenvolvimento embrionário, ou em meios sequenciais, ajustados às necessidades nutricionais específicas de cada estágio do desenvolvimento, e baseados nas alterações decorridas no trato reprodutor feminino. Este segundo sistema de cultura de embriões tem associadas taxas de gravidez superiores e apresenta-se essencial à viabilidade do desenvolvimento de blastocistos (Lane e Gardner, 2007).

A transferência de mais de um embrião acarreta o risco de gravidez múltipla, que pode ter associadas complicações na gestação. Minimizar esse risco, sem prejuízo das taxas de gravidez, depende da seleção de um número limitado de embriões para transferência, com base em critérios com valor prognóstico da viabilidade e capacidade de desenvolvimento e implantação, estabelecidos pela observação padronizada de zigotos, embriões em clivagem, e blastocistos.

À semelhança do que ocorre *in vivo*, os protocolos de fertilização *in vitro* devem despoletar a ativação do oócito e conseqüente extrusão do segundo glóbulo polar, e formação de pronúcleos. Um oócito fecundado normal deve ser esférico, e conter dois GP no interior da ZP, e dois PN justapostos, centrados no citoplasma, de tamanho semelhante, e delimitados por membranas facilmente identificáveis (Balaban *et al.*, 2011; Papale *et al.*, 2012).

Número semelhante de CPN, alinhados equatorialmente na zona de justaposição das membranas dos PN, parece ser correlacionável com competência embrionária (Balaban *et al.*, 2011; Papale *et al.*, 2012; Scott *et al.*, 2000; Scott, 2003), e irregularidades no tamanho e localização dos PN, têm associação com paragem do desenvolvimento e aneuploidias (Papale *et al.*, 2012). No entanto, o valor prognóstico da avaliação morfologia dos pronúcleos é limitado, e não acarreta benefícios adicionais se combinado com a avaliação morfológica de embriões (Nicoli *et al.*, 2013).

Até ao quarto dia do desenvolvimento *in vitro*, os principais critérios morfológicos de avaliação de embriões são a aparência dos blastómeros, a fragmentação celular, e a presença de multinucleação, que é identificável com recurso a sistemas de monitorização contínua (3.3.1.1. *Sistemas de monitorização temporizada automática*). A fragmentação, multinucleação, e assimetrias, estão associadas a um maior risco de anomalias pós-mitóticas (Balaban *et al.*, 2011).

Ao quarto dia do desenvolvimento *in vitro* (cerca de 92 horas após fertilização), é expectável que o embrião se apresente em mórula ou que exista evidência de compactação, envolvendo, virtualmente, todo o volume de blastómeros. Um volume superior a metade do embrião não compactado é um mau prognóstico da capacidade de desenvolvimento de blastocisto (Balaban *et al.*, 2011).

Cerca de 116 horas após a fertilização, idealmente, deve ser observável um blastocisto expandido, com uma MCI proeminente, facilmente identificável, composta por muitas células compactas, e com uma TF composta por muitas células que

formam um epitélio coeso, sendo que a MCI tem elevado valor prognóstico da capacidade de implantação (Balaban *et al.*, 2011).

É possível que entretanto sejam identificados transcritos de células do cumulus que tenham valor preditivo da competência oocitária e sejam adequados à utilização clínica e possibilitem uma avaliação ainda mais precoce, e consequente gestão de expectativas quanto ao desenvolvimento embrionário (Uyar *et al.*, 2013).

### 3.3.1.1. **Sistemas de monitorização temporizada automática**

Com o advento de ferramentas de *time-lapse imaging* para monitorização da fecundação e desenvolvimento embrionário *in vitro*, surgiu a oportunidade de observação contínua, e análise detalhada da morfologia, sem retirar o material biológico da atmosfera condicionada da estufa. Por não surtir efeitos nefastos distintos dos que as observações convencionais no exterior da estufa produzem, a monitorização temporizada automática permite a apreensão de mais informação sem prejuízo dos embriões (Cruz *et al.*, 2011).

Além de proporcionar um incremento significativo na compreensão sobre processos dinâmicos que intervêm no desenvolvimento embrionário, a aplicação de sistemas de monitorização contínua permitiu o estabelecimento de critérios de cinética e sincronia de clivagens, preditivos da competência para desenvolvimento até blastocisto e implantação (Hlinka *et al.*, 2012; Chamayou *et al.*, 2013; Cruz *et al.*, 2012).

A celeridade e sincronia das clivagens, além da proporcionalidade dos blastómeros, apresentam associação com a qualidade do blastocisto gerado. Embriões com clivagens precoces apresentam maior probabilidade de desenvolvimento até blastocisto do que embriões com desenvolvimento retardado, e desenvolvem blastocistos com TF mais coesa e MCI mais compacta. Do mesmo modo, embriões com maior sincronia na transição entre dois e quatro blastómeros estão associados a blastocistos com melhores morfologias. Relativamente ao potencial de implantação, a formação de 5 blastómeros entre as 48,8 e as 56,6 horas, após fertilização por ICSI, aparenta ser o critério mais preditivo. Em suma, é sugerido que a seleção de embriões para transferência se baseie numa hierarquia de critérios, sendo o tempo decorrido até à formação de um embrião com 5 blastómeros o principal, seguido da sincronia das clivagens entre dois e quatro blastómeros, e duração dessa mesma transição (Cruz *et al.*, 2012).

Os critérios de cinética a que sistemas de *time-lapse image* permitem acesso, são particularmente relevantes pela capacidade de diferenciar embriões morfológicamente semelhantes, e possibilitam a redução da exposição a condições artificiais de cultura *in vitro*, através da transferência de embriões em clivagem com características preditivas da qualidade em blastocisto.

### 3.3.1.2. **Diagnóstico Genético Pré-Implantação (DGPI)**

O diagnóstico genético pré-implantação (DGPI) baseia-se na possibilidade de biópsia de oócitos, zigotos ou embriões pré-implantatários, através de técnicas de micromanipulação, para remoção de GP, blastómeros, ou porções da TF, consoante a necessidade de rastreamento da contribuição exclusivamente materna ou da constituição genética total do embrião (Montag *et al.*, 2013).

Particularmente pertinente por permitir despistar a presença de anomalias, causadas por um gene específico, ou cromossómicas, numéricas ou estruturais, o DGPI pode ser também importante na averiguação de uma causa genética para falhas repetidas na implantação de embriões em ciclos anteriores de fertilização *in vitro*.

### 3.3.2. **Transferência Intrauterina de embriões**

A transferência intrauterina decorre, por norma, entre o segundo e o quinto dia do desenvolvimento *in vitro*, com recurso a cateteres, e os embriões selecionados são depositados no fundo do útero, à saída das trompas, sob orientação ecográfica.

O paradigma de que, idealmente, uma transferência embrionária não deverá causar dano no endométrio, tem sido contrariado por um número crescente de publicações que referem taxas de sucesso <sup>11</sup> superiores em transferências a que se antecedeu indução intencional de dano – por curetagem ou biópsia – no endométrio (Abdelhamid, 2013; Gibreel *et al.*, 2013; Nastri *et al.*, 2013; Potdar *et al.*, 2012).

O mecanismo despoletado, de resposta inflamatória local, resulta na libertação de citocinas e fatores de crescimento que promovem um desenvolvimento de tecido endometrial favorável à implantação, e na alteração da expressão genética do endométrio, que gera um aumento da secreção de proteínas de adesão (Granot *et al.*, 2012; Potdar *et al.*, 2012).

Também passíveis de aumentar as taxas de sucesso de transferência de embriões são a co-transferência de células autólogas do *cumulus*, recuperadas na desnudação dos oócitos e capazes de produção adjuvante de fatores de crescimento e citocinas (Benkalifa *et al.*, 2011; Cihangir *et al.*, 2010; Parikh *et al.*, 2006; Parikh *et al.*, 2012), e a transferência em meio suplementado com ácido hialurónico, que pode aumentar a adesão do blastocisto ao endométrio (Nakagawa *et al.*, 2012; Salamonsen *et al.*, 2001; Valojerdi *et al.*, 2006).

#### 3.3.2.1. **Eclosão facilitada**

Falhas na implantação em endométrios adequadamente desenvolvidos, podem resultar da incapacidade do blastocisto eclodir da ZP. A aplicação de técnicas que produzam descontinuidades na ZP ou promovam a diminuição da sua espessura, com

---

11 – Por taxa de sucesso de ciclos de PMA deve entender-se a efetiva implantação e comprovação clínica de gravidez.

recurso a meios químicos, mecânicos ou laser, permite aumentar a capacidade do blastocisto eclodir (Zegers-Hochschild *et al.*, 2009), sendo particularmente relevante em embriões com ZP demasiado espessa ou rígida, ciclos que sucedam transferências com falha recorrente na implantação, ou ciclos de criopreservação (Belil e Veiga, 2012).

Contudo, o protocolo de eclosão facilitada ou assistida pode desencadear efeitos adversos como danos no embrião que diminuam a sua viabilidade, ou o aumento do risco de divisão da MCI durante a eclosão, e inerente desenvolvimento de gémeos monozigóticos, e, por norma, é praticado no terceiro dia do desenvolvimento embrionário, ou em blastocistos. (Belil e Veiga, 2012).

### 3.4. Criopreservação de gâmetas e embriões

A preservação da fertilidade é uma área emergente da medicina em que a aplicação de técnicas de criopreservação de gâmetas permite conservar a capacidade reprodutiva em situações que acarretem o risco do seu prejuízo (González *et al.*, 2012). Contextos em que por doença, ou no decurso de tratamentos com efeitos gonadotóxicos, exista a possibilidade de perda de fertilidade, são situações pertinentes para a aplicação de técnicas de criopreservação de gâmetas ou embriões. Embora se possam colocar objeções éticas, também a mudança de paradigmas sociais que, com frequência, se traduz em protelar a constituição de família com descendência para idades em que o decréscimo da fertilidade constitui um entrave, constitui um contexto de aplicação de técnicas de criopreservação de gâmetas para preservação da fertilidade.

As técnicas de criopreservação de gâmetas e embriões são ainda pertinentes na gestão de material biológico supranumerário, no decurso dos ciclos de tratamento interrompidos, na impossibilidade de comparência do membro masculino do casal no dia previsto do tratamento, e na organização de bancos de gâmetas de dador <sup>12</sup>.

Os métodos de criopreservação envolvem exposição a agentes crioprotetores, arrefecimento a temperaturas negativas, armazenamento, descongelação e restituição das condições fisiológicas após diluição e remoção dos crioprotetores, e atualmente os mais difundidos são a congelação lenta e a congelação ultrarrápida ou vitrificação.

Enquanto a congelação lenta envolve um arrefecimento lento e controlado até temperaturas negativas, seguida de arrefecimento rápido por imersão em azoto líquido para armazenamento, a vitrificação alia altas concentrações de crioprotetores a uma diminuição brusca da temperatura (Liu *et al.*, 2012).

Embora a vitrificação seja simples e apresente bons resultados clínicos, geralmente com taxas de sobrevivência e viabilidade de oócitos, embriões e blastocistos superiores às resultantes de congelação lenta (Mukaida e Oka, 2012), é

---

<sup>12</sup> – O armazenamento de amostras de dador por um período de quarentena permite a realização de análises para despistagem de doenças infecciosas e validação das amostras para utilização em PMA.

controverso se as diferenças não se possam dever à não otimização do protocolo de congelação lenta, e se a exposição a tão elevadas concentrações de crioprotetores não terá consequências a longo prazo (Edgar e Gook, 2012).

#### 4. OBJETIVOS

Foram objetivos do estágio no Centro de Estudos de Infertilidade e Esterilidade a aquisição das competências profissionais, técnicas, e científicas, inerentes à prática de PMA, e aplicáveis em investigação em áreas como a biologia da reprodução.

Através de trabalho laboratorial supervisionado foi pretendido o contacto com os procedimentos laboratoriais de um laboratório de andrologia e subsequente desenvolvimento de autonomia no estudo dos parâmetros espermáticos, preparação de gâmetas masculinos para criopreservação, inseminação artificial ou fertilização *in vitro*, e criopreservação de gâmetas masculinos.

No laboratório de embriologia, com recurso a material biológico degenerado ou supranumerário, procurou-se o contacto com as metodologias aplicadas na preparação de gâmetas femininos para TRA, micromanipulação em microscópio ótico provido de micromanipuladores, avaliação da qualidade oocitária e embrionária, e criopreservação de gâmetas femininos e embriões. Também o contacto com protocolos alternativos passíveis de otimizar resultados e facilitar rotinas em laboratório foi um objetivo deste estágio.

## **Capítulo II.**

### **Materiais e Métodos**

# 1. MATERIAIS, MEIOS E MATERIAL BIOLÓGICO

Todos os materiais, reagentes, meios, e material biológico, utilizados durante o período de estágio, foram disponibilizados pelos laboratórios de andrologia e embriologia do Centro de Estudos de Infertilidade e Esterilidade (CEIE), sito na Rua D. Manuel II, 51-B, 4050-345 Porto, no período compreendido entre setembro de 2013 e julho de 2014.

A manipulação de amostras no contexto de protocolos de PMA, ou de criopreservação de gâmetas e embriões, decorreu em condições de assepsia asseguradas pela limpeza periódica das superfícies de trabalho, repetida sempre que justificável, e pela utilização de fatos de trabalho, câmaras de fluxo laminar, e materiais não tóxicos, estéreis, e descartáveis.

## 1.1. *Gâmetas masculinos*

Por norma, manipularam-se ou analisaram-se amostras de sémen obtidas por masturbação, sendo o ejaculado recolhido na íntegra, em recipientes de colheita de fluidos biológicos, estéreis e devidamente identificados com o nome do dador da amostra, após períodos de 2 a 5 dias de abstinência sexual.

As colheitas de ejaculado por masturbação decorridas na clínica processaram-se em local próprio que permitiu controlar as flutuações térmicas, com recurso a sistema de ar condicionado, e o tempo decorrido entre a recolha e o estudo do ejaculado.

As amostras obtidas no exterior da clínica, por masturbação ou por coito com preservativo sem espermicida, próprio para a recolha de ejaculado, foram mantidas a uma temperatura fisiológica até à entrega no laboratório, num intervalo de tempo não superior a 30 minutos, pelo transporte do recipiente junto à superfície corporal.

Perdas de ejaculado e irregularidades no processo da colheita, se no contexto de um espermograma, foram anotadas e, em caso de perda da porção inicial do ejaculado, foi agendada uma nova colheita, atendendo ao período de abstinência convencional.

Num único caso de ausência de espermatozoides no ejaculado, o andrologista procedeu a uma biópsia testicular para recolha de fragmentos do testículo, que foram colocados em placa de Petri aquecida, com 1mL de meio de preparação de gâmetas equilibrado com uma antecedência de 12 horas, a 37 °C, em estufa com 6% CO<sub>2</sub>.

Todas as amostras foram mantidas em estufa a 37°C até o início da avaliação dos parâmetros espermáticos ou processamento da amostra.

## 1.2. Gâmetas femininos e embriões

O contacto com as rotinas do laboratório de embriologia que implicassem a manipulação de material biológico, decorreu com recurso a gâmetas ou embriões degenerados, ou supranumerários, decorrentes de ciclos de fertilização *in vitro*.

Os oócitos humanos foram aspirados por punção folicular, via vaginal e ecoguiada por ultrassonografia, realizada por ginecologistas em mulheres devidamente sedadas, após estimulação ovárica controlada. O líquido folicular foi aspirado por pressão negativa, para tubos de fundo redondo aquecidos, e mantidos a cerca de 37°C, num suporte de tubos metálico sobre uma placa de aquecimento.

Terminada a punção, o líquido folicular foi transferido para placas de Petri aquecidas na superfície termicamente condutora de uma câmara de fluxo laminar, e foi iniciada a pesquisa de complexos *cumulus*-corona-oócito (CCO) sob ampliação de uma lupa. Os CCO foram transferidos para meio apropriado à manipulação de gâmetas no exterior da estufa, equilibrado de véspera a 37°C.

Após aspirações e rejeições para promover a desagregação de resíduos, os CCO foram lavados em meio de preparação de gâmetas e colocados na estufa a 37°C, com 6% CO<sub>2</sub> e 5% O<sub>2</sub>, no mesmo meio, equilibrado de véspera na mesma estufa.

## 2. ESTUDO DOS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS

### 2.1. Avaliação macroscópica

A análise do ejaculado foi iniciada até uma hora após a colheita, de forma a evitar alterações espermáticas devidas a desidratação ou temperatura (WHO, 2010). Por norma, após confirmação da liquefação espontânea da amostra (2.1.1. *Liquefação*), iniciou-se a avaliação dos parâmetros microscópicos (2.2. *Avaliação Microscópica*) e retomou-se e concluiu-se a avaliação macroscópica das amostras no período de reação do teste de vitalidade (2.2.2. *Vitalidade*).

#### 2.1.1. Liquefação

A liquefação do sémen foi percecionada pela alteração da consistência da amostra – desde uma mistura heterogénea com grânulos gelatinosos, até uma amostra progressivamente mais homogénea e com aspeto fluido – e, classificada como completa ou incompleta <sup>1</sup>, até 60 minutos após a ejaculação.

### 2.1.2. **Volume e viscosidade**

O volume <sup>2</sup> e a viscosidade foram avaliados através da aspiração do ejaculado com uma pipeta graduada de 5mL e consequente gotejar por ação da gravidade. Classificou-se a viscosidade das amostras como normal, ou aumentada <sup>3</sup>, consoante formassem gotas bem definidas, ou filamentos com mais de cerca de 2 cm.

### 2.1.3. **pH**

Os valores de pH foram determinados em amostras homogeneizadas por agitação, através da impregnação de tiras de papel indicador para valores de pH compreendidos entre 6 e 10, e consulta da tabela de correspondência de cores.

### 2.1.4. **Cor**

Classificaram-se como normais amostras com uma coloração cinzento-esbranquiçado, e colorações desviantes foram registadas nas observações <sup>4</sup>.

### 2.1.5. **Cheiro**

A perceção da intensidade do cheiro de uma amostra é um parâmetro sujeito a alguma subjetividade. O odor das amostras foi classificado como ausente, putrefacto, ou característico (*sui generis*).

## 2.2. **Avaliação microscópica**

A avaliação microscópica das amostras de sémen executou-se em microscópio de contraste de fase, sob critérios de avaliação padronizados. Com recurso a uma placa de aquecimento, a 37,5 °C, as amostras e as lâminas usadas nas preparações de sémen a fresco, foram mantidas a uma temperatura fisiológica, minimizando as condições que pudessem suscitar alteração nos parâmetros de avaliação.

---

1 – A liquefação pode ser induzida por diluição em soro fisiológico, aspiração e expulsão repetidas, ou por digestão com enzimas proteolíticas como a bromelina, para facilitar a observação dos parâmetros microscópicos. Este tipo de intervenção deve ser tido em consideração na avaliação do espermograma pela possível alteração na morfologia e motilidade dos espermatozoides. Em caso de diluição, a avaliação da concentração de espermatozoides deve considerar o fator de diluição aplicado (WHO, 2010).

2 – As recomendações mais recentes da OMS aconselham a pesagem do recipiente de colheita vazio, e após a colheita do ejaculado. A subtração destes valores fornece o peso do ejaculado, que com base na densidade do sémen ( $\approx 1 \text{ g/mL}$ ), permite uma estimativa mais precisa do volume do ejaculado (Cooper *et al.*, 2007; WHO, 2010).

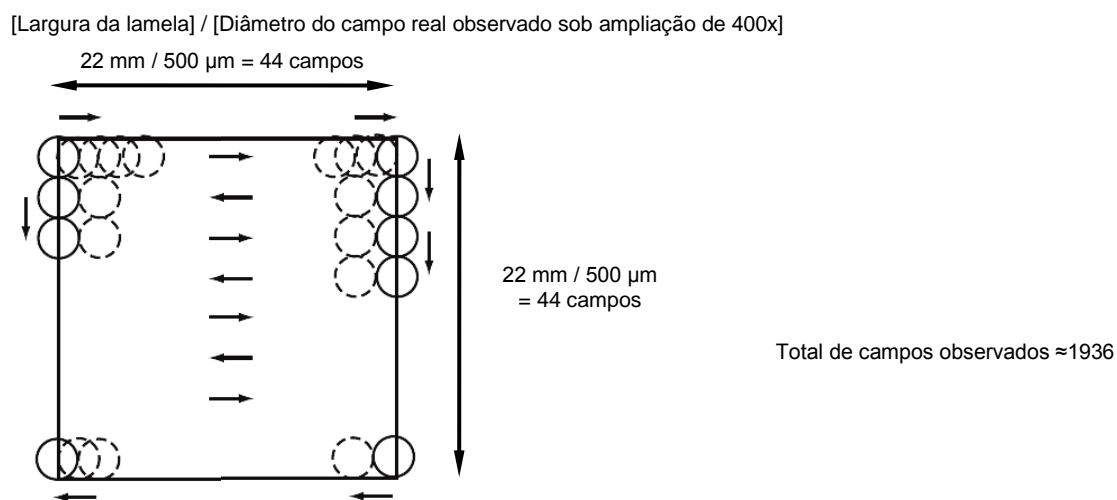
3 – A viscosidade pode ser diminuída com recurso aos métodos de indução da liquefação (nota 1) (WHO, 2010).

4 – Alterações na cor do ejaculado podem fornecer indícios úteis na abordagem do casal infértil. A presença de eritrócitos no ejaculado é responsável por conferir-lhe tonalidades desde o rosado até ao vermelho vivo, e tons amarelados podem ser reflexo do consumo de determinadas vitaminas ou medicamentos (WHO, 2010).

A profundidade fixa de 20 µm nas preparações de amostra a fresco foi assegurada pela aplicação de um volume padrão de 10 µL de amostra, entre lâminas limpas pré-aquecidas, e lamelas de 22x22 µm.

A avaliação microscópica iniciou-se pela observação sob ampliação de 100x, e permitia uma perceção da composição geral do ejaculado e a identificação, se aplicável, de espermatozoides agregados ou aglutinados <sup>5</sup>.

No caso de não terem sido encontrados espermatozoides nos campos observados, procedeu-se à observação atenta e sistemática de toda a lâmina, com a objetiva de 40x, segundo a representação da figura 3. As amostras em que, ainda assim, não foram encontrados espermatozoides, foram transferidas para um tubo de fundo cónico e centrifugadas a 1200 rpm, por 10 minutos. Após remoção do sobrenadante até ao sedimento – ou até cerca de dois terços da altura da marcação de 0,1 mL no tubo (≈ 50 µL), quando este não fosse identificável –, e repetiu-se a observação sistemática de uma lâmina com 10 µL da amostra homogeneizada. Se na lâmina com amostra concentrada não tiverem sido observados espermatozoides, anotou-se, nas observações do espermograma, a informação de azoospermia (Tabela 2). Nestas amostras preparou-se um esfregaço fixado e corado segundo o protocolo empregue na avaliação da morfologia espermática (2.2.5. *Morfologia*) e não se procedeu à avaliação dos restantes critérios de avaliação microscópica do ejaculado.



**Figura 3** – Esquema do varrimento da preparação a fresco/centrifugada para determinação da azoospermia do ejaculado.

### 2.2.1. **Motilidade**

Se não tiver sido percecionado movimento entre a lâmina e lamela (*drifting*), a lâmina utilizada na observação microscópica inicial foi observada com a objetiva de 40x, para avaliar a motilidade. Caso se verificasse *drifting*, preparou-se uma nova lâmina.

5 – A agregação consiste na aderência entre espermatozoides imóveis entre si, ou entre espermatozoides móveis e filamentos de muco, células não espermáticas, ou resíduos presentes na amostra. A aglutinação refere-se à aderência de espermatozoides móveis entre si, envolvendo apenas cabeças ou caudas, ou entre cabeças e caudas (WHO, 2010).

Com o auxílio de um contador de células, classificou-se o movimento de um total de 200 espermatozoides – em pelo menos cinco campos afastados das margens<sup>6</sup> –, segundo as categorias de espermatozoide imóvel, com motilidade *in situ*, progressivo lento, e progressivo rápido, como disposto na tabela 3, e em duplicado. Na impossibilidade de contar 200 espermatozoides numa lâmina, contaram-se 25, 50, ou 100, e registou-se essa informação nas observações.

Os resultados foram convertidos a valores percentuais, atendendo ao arredondamento para o número par mais próximo, e procedeu-se ao cálculo das médias dos duplicados para cada classificação de movimento. Após confirmar que a diferença percentual entre valores nos duplicados para a categoria mais representada estava compreendida entre a variação prevista na amostragem (Tabela 4), aceitaram-se os resultados. Caso a diferença excedesse o valor máximo aceitável, repetiu-se a avaliação.

**Tabela 3** – Critérios de classificação da motilidade espermática.

CLASSIFICAÇÃO	DESCRIÇÃO
Motilidade progressiva rápida	Movimento com progressão de pelo menos 25 µm/s ( ≈ 10 cabeças de espermatozoide por segundo)
Motilidade progressiva lenta	Movimento com progressão de 5-24 µm/s
Motilidade <i>in situ</i>	Qualquer padrão de movimento não progressivo (< 5 µm/s)
Imobilidade	Ausência de movimento

**Tabela 4** – Diferenças aceitáveis entre valores percentuais para uma dada média, válidas para contagens de 200 espermatozoides em duplicado (Kvist e Björndahl, 2002).

MÉDIA (%)	DIFERENÇA ACEITÁVEL	MÉDIA (%)	DIFERENÇA ACEITÁVEL
0	1	56-72	9
1	2	73-80	8
2-3	3	81-86	7
4-6	4	87-90	6
7-9	5	91-93	5
10-13	6	94-96	4
14-19	7	97-98	3
20-27	8	99	2
28-44	9	100	1
45-55	10		

### 2.2.2. Vitalidade

Para avaliar a vitalidade, adicionaram-se 10µL de eosina Y a 0,5% a 10 µL de amostra homogeneizada. Após 5 minutos, pipetaram-se 10µL da mistura para a extremidade de uma lâmina limpa e, com o auxílio de outra lâmina, preparou-se um esfregaço. A lâmina foi observada sob ampliação 400x, com o filtro de campo brilhante.

6 – A observação em campos afastados das margens da lâmina tem como intuito prevenir a avaliação de espermatozoides com alterações de motilidade devidas a desidratação da preparação.

Esporadicamente avaliou-se a vitalidade pelo teste de eosina-nigrosina <sup>7</sup>. Para este método, adicionaram-se duas gotas de eosina Y 1% a 50 µL do ejaculado, num tubo de ensaio estéril, e homogeneizou-se a mistura. Após 30 segundos adicionam-se três gotas de nigrosina 5%, repetindo a homogeneização e, num período de, no máximo, 30 segundos, preparou-se um esfregaço com 10 µL da mistura, coberto com uma lamela antes de secar, que se analisou com o mesmo filtro e ampliação.

Nos dois protocolos, com o auxílio do contador de células, procedeu-se à contagem e distinção de 200 espermatozoides corados (avermelhados) e não corados (esverdeados ou incolores) – se não se localizassem facilmente 200, avaliaram-se 25, 50, ou 100 –, e apresentou-se como resultado o valor percentual de espermatozoides não corados (vivos, com integridade membranar) <sup>8</sup>.

### 2.2.3. **Hipoosmolaridade** <sup>8-9</sup>

Para avaliar a hipoosmolaridade, adicionaram-se 10 µL de amostra homogeneizada a 90 µL de solução hipoosmótica – frutose e citrato de sódio em água destilada (Jeyendran *et al.*, 1984) – e manteve-se a mistura na estufa a 37 °C, por 30 minutos. Após este período, preparou-se uma lâmina com 10 µL cobertos por uma lamela que se observou ao microscópio com filtro de contraste de fase sob ampliação de 400x. Com recurso ao contador de células, distinguiram-se 200 espermatozoides com caudas enroladas e esticadas – se a contagem de 200 espermatozoides não tiver sido viável, avaliaram-se 25, 50, ou 100 – e apresentou-se como resultado da hipoosmolaridade a percentagem de espermatozoides com caudas enroladas.

### 2.2.4. **Concentração e número de espermatozoides**

Para determinar a concentração de espermatozoides no ejaculado, diluíram-se 50µL de amostra homogeneizada, aspirados com micropipeta de deslocamento positivo<sup>10</sup>,

---

7 – O teste com eosina-nigrosina permite conservar a lâmina para reavaliações posteriores e, por aumentar o contraste entre as cabeças dos espermatozoides e o fundo de visualização, simplifica a distinção (WHO, 2010).

8 – Os testes de vitalidade e hipoosmolaridade permitem avaliar a integridade membranar, e determinar se a imobilidade espermática está associada a morte celular ou danos na membrana, ou a danos estruturais no flagelo. Os primeiros baseiam-se no princípio de que espermatozoides vivos são impermeáveis à eosina, que cora de vermelho os espermatozoides mortos ou com danos membranares e devem resultar em valores percentuais necessariamente superiores ao valor percentual de espermatozoides não imóveis. O teste de hipoosmolaridade assume a semi-permeabilidade da membrana intacta que, em condições hipoosmóticas, deve resultar em influxo de solução, e consequente aumento de volume, percecionável pelo enrolar da cauda (Jeyendran *et al.*, 1984), e o resultado percentual pode diferir, para uma mesma amostra, do valor da vitalidade, já que espermatozoides vivos, impermeáveis à eosina, podem não apresentar membranas funcionais capazes de reação a soluções hipoosmóticas (Jeyendran *et al.*, 1984).

9 – O teste de hipoosmolaridade, por não comprometer a integridade de espermatozoides viáveis, pode ser útil na seleção de espermatozoides viáveis para ICSI, em amostras que não apresentem movimento espermático.

10 – As micropipetas de deslocamento positivo garantem maior reprodutibilidade no manuseamento de amostras viscosas por ação de um pistão que impede que permaneça amostra nas paredes do capilar.

em 50, 200 ou 450  $\mu\text{L}$  de solução tampão salina de 3,5% de formol, dependendo do número de espermatozoides observáveis, por campo, numa observação microscópica em ampliação 400x (Tabela 5). Aspiraram-se 10 $\mu\text{L}$  da diluição e carregaram-se, por capilaridade, as câmaras de contagem de um hemocítmetro Neubauer Improved devidamente montado que ficou por cerca de 30 minutos em câmara húmida – caixa de Petri com gaze embebida em água destilada – para permitir a deposição de células.

As câmaras de contagem foram observadas ao microscópio ótico em contraste de fase com ampliação de 400x. Analisaram-se, em cada câmara, 5, 10 ou 25 quadrículas para que se contassem pelo menos 200 espermatozoides – na impossibilidade de totalizar este número, considerou-se o número total nas 25 quadrículas.

Calcularam-se a soma e a diferença entre os valores das contagens e consultou-se a tabela 6 para avaliar a significância da diferença. Confirmando-se que os duplicados não apresentavam diferenças estatisticamente relevantes, procedeu-se ao cálculo da concentração pela divisão do número de espermatozoides contados nos duplicados por um valor dependente da diluição e do número de quadrículas contadas (Tabela 7).

O valor da concentração foi apresentado em milhões de espermatozoides por mL, e calculou-se o número total de espermatozoides no ejaculado <sup>11</sup> através pelo produto da concentração pelo volume total do ejaculado.

**Tabela 5** – Fator de diluição para avaliação da concentração, determinado em função do número médio de espermatozoides observado por campo, sob ampliação de 400x.

NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDES OBSERVADOS	FACTOR DE DILUIÇÃO
<15	1:2 (50 $\mu\text{L}$ amostra + 50 $\mu\text{L}$ fixador)
15-100	1:5 (50 $\mu\text{L}$ amostra + 200 $\mu\text{L}$ fixador)
>>100	1:10 (50 $\mu\text{L}$ amostra + 450 $\mu\text{L}$ fixador)

**Tabela 6** – Diferenças aceitáveis entre duplicados para determinação da concentração (Kvist e Björndahl, 2002).

SOMA	VALOR LIMITE	SOMA	VALOR LIMITE	SOMA	VALOR LIMITE	SOMA	VALOR LIMITE
0	0	59-66	15	235-250	30	528-550	45
1	1	67-75	16	251-266	31	551-575	46
2	2	76-84	17	267-283	32	576-599	47
3-4	3	85-93	18	284-300	33	600-624	48
5-6	4	94-104	19	301-318	34	625-650	49
7-9	5	105-114	20	319-337	35	651-677	50
10-12	6	115-125	21	338-356	36	678-703	51
13-16	7	126-137	22	357-375	37	704-731	52
17-21	8	138-149	23	376-395	38	732-759	53
22-26	9	150-162	24	396-416	39	760-787	54
27-31	10	163-175	25	417-437	40	788-816	55
32-37	11	176-189	26	438-459	41	817-845	56
38-43	12	190-205	27	460-481	42	846-875	57
44-51	13	206-218	28	482-503	43	876-906	58
52-58	14	219-234	29	504-527	44	907-937	59

11 – Ocorre naturalmente, pela idade, decréscimo da espermatogénese, e da secreção de fluidos pelas glândulas acessórias. A concentração de espermatozoides no ejaculado pode manter-se inalterada, e o número total de espermatozoides no ejaculado variar, pelo que é um parâmetro mais informativo quanto à função testicular e potência de emissão dos ductos pós-testiculares (Ng *et al.*, 2004; WHO, 2010).

**Tabela 7** – Fator de divisão do número de espermatozoides contados na soma dos duplicados, para cálculo de concentração, em função da diluição e número de quadrículas analisadas (Kvist e Björndahl, 2002).

		FACTOR DE DILUIÇÃO		
		1:2	1:5	1:10
NÚMERO DE QUADRÍCULAS CONTADAS	25	100	40	20
	10	40	16	8
	5	20	8	4

### 2.2.5. *Morfologia*

Para proceder à avaliação da morfologia espermática das amostras analisadas, prepararam-se esfregaços com 10 µL de amostra homogeneizada, que, depois de secos, foram fixados por imersão em metanol durante cerca de 10 segundos<sup>12</sup>. Nas amostras com concentração inferior a 15 milhões de espermatozoides/mL, prepararam-se esfregaços após centrifugação a 1200 rpm por 10 minutos, com 10 µL de sedimento ressuspendido num volume de sobrenadante inferior a 0,1 mL.

Após fixação, as lâminas foram coradas por imersão durante 15 minutos em solução de papanicolau, seguida de lavagem em água corrente, imersão em solução Shorr por 5 minutos e, novamente, lavagem em água corrente<sup>13</sup>. As lâminas foram novamente fixadas em metanol por 10 segundos e, depois de secas, foram armazenadas para avaliação posterior, ou observadas ao microscópio ótico sob ampliação de 1000x, com a objetiva de imersão em óleo e o filtro de campo brilhante.

Com recurso ao contador de células contaram-se e distinguiram-se 200 espermatozoides com base nos critérios de classificação da morfologia espermática listados na tabela 8, e contabilizaram-se os defeitos apresentados em cada um. Quando aplicável, registaram-se a presença de células imaturas e leucócitos, expressos como proporção por cada 100 espermatozoides.

Registaram-se o valor percentual de espermatozoides com morfologia normal – pelo conceito de espermatozoide potencialmente fertilizante, estabelecido pela observação da morfologia de espermatozoides recuperados do trato reprodutor feminino (WHO, 2010) –, a proporção de cada defeito no total de espermatozoides anormais, em percentagem, e o valor obtido pela divisão da soma de todos os defeitos, pelo número de espermatozoides anormais – índice de teratozoospermia<sup>14</sup>.

12 - Após fixação as lâminas podem ser guardadas. A coloração e observação podem ser realizadas posteriormente e eventualmente noutra centro.

13 – A coloração com as soluções de Papanicolau e Shorr é conhecida como coloração de Papanicolau e resulta em preparações em que os acrossomas surgem a azul claro, a região pós-acrossómica, peça intermédia e cauda a azul-escuro, e os restos citoplasmáticos a encarnado.

14 – O índice de teratozoospermia refere-se ao número médio de anomalias por espermatozoide anormal.

**Tabela 8 – Critérios de classificação da morfologia de espermatozoides.**

CLASSIFICAÇÃO	DESCRIÇÃO
Normal	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cabeça oval, de contornos regulares, com 4,0-4,5 µm comprimento e 2,5-3,5 µm de largura;</li> <li>- Região acrossómica bem definida que ocupe cerca de 40-70% da área da cabeça, e sem mais de dois vacúolos (que não devem exceder 20% do volume da cabeça);</li> <li>- Peça intermédia estreita, com comprimento ≈ cabeça e inserção no eixo longitudinal;</li> <li>- Cauda não quebrada nem enrolada, com cerca de 10 vezes o comprimento da cabeça;</li> <li>- Resto citoplasmático inferior a 1/3 do tamanho da cabeça;</li> <li>- Ausência de defeitos identificáveis em qualquer região que o constituía.</li> </ul>
Anormal	<p><i>Defeitos na cabeça:</i>            Contempla cabeças amorfas, com dimensões anormais, acéfalos, bicéfalos, com cabeças alongadas ou pontiagudas, com região acrossómica aberrante ou ausente...</p> <p><i>Defeitos no pescoço ou peça intermédia:</i>            Anomalia no comprimento, espessura, inserção, ...</p> <p><i>Defeitos na cauda:</i>            Cauda quebrada, enrolada, ausente, com comprimento anormal, espermatozoides bicaudados...</p> <p><i>Resto citoplasmático excessivo:</i>            Gota citoplasmática maior que 1/3 do tamanho da cabeça.</p>

### 3. PROCESSAMENTO DE GÂMETAS MASCULINOS

#### 3.1. *Processamento de amostras obtidas por ejaculação*

As amostras de sémen liquefeitas, colhidas em contexto de PMA ou criopreservação de gâmetas, foram processadas por combinação de protocolos de separação de gâmetas por gradientes de densidade e por migração positiva (“*swim up*”).

Prepararam-se, por amostra, dois tubos cónicos, estéreis, com uma coluna de 1mL de sílica coloidal a 80%, em meio de preparação de gâmetas – com albumina sérica e gentamicina, tamponado com bicarbonado, e equilibrado por cerca de 18 horas em estufa a 37 °C com 6% CO<sub>2</sub> –, sob uma coluna de igual volume de meio com 40% de sílica coloidal. As amostras foram transferidas, em volume idêntico nos dois tubos, para o topo das colunas de gradientes de separação por densidades, e centrifugadas por 25 minutos, a 1200 rpm, em centrífuga aquecida a 37°C.

Após centrifugação, aspirou-se e descartou-se o sobrenadante até a marca de 0,5mL, nos dois tubos. Transferiram-se os sedimentos ressuspensos para um tubo estéril, devidamente identificado – com o nome do cônjuge, se para PMA, ou do dador da amostra, se em contexto de criopreservação de gâmetas –, adicionaram-se 2mL de meio de preparação de gâmetas, e após homogeneização, repetiu-se a centrifugação

por 10 minutos a 1200 rpm, na estufa aquecida. O sobrenadante acima da marca dos 0,5mL foi aspirado e rejeitado, e repetiram-se a lavagem em 2mL de meio de preparação de gâmetas e a centrifugação a 1200 rpm por 10 minutos.

Após a segunda lavagem, retirou-se o sobrenadante até ao sedimento, sem o perturbar, ou até os 0,5mL se este não fosse identificável. Adicionaram-se, lentamente e com o auxílio de uma seringa, 0,1 a 0,5mL de meio de preparação de gâmetas, dependendo do volume do sedimento – para permitir a migração ascendente dos espermatozoides viáveis – e deixou-se o tubo por, pelo menos, 30 minutos, inclinado e com a tampa semiaberta, em estufa a 37 °C com 6% CO<sub>2</sub>.

### 3.2. *Processamento de gâmetas masculinos criopreservados*

Após descongelação das palhetas ou criotubos com gâmetas masculinos criopreservados, à temperatura ambiente, transferiram-se as amostras para um tubo de fundo cónico, estéril e devidamente identificado, e adicionou-se meio de preparação de gâmetas numa razão de 5 vezes o volume da amostra a processar, lentamente e com agitação do tubo após adição de cada gota de meio.

Após 10-15 minutos à temperatura ambiente, na câmara de fluxo laminar, as amostras foram centrifugadas a 1000 rpm, por 10 minutos, e rejeitou-se o sobrenadante até ao sedimento – ou até à marca dos 0,5 mL no casos em que não era identificável sedimento. Adicionaram-se então 0,1-0,5 mL de meio de preparação de gâmetas e o tubo foi deixado inclinado e com a tampa semi-aberta na estufa a 37°C, com 6% CO<sub>2</sub>, por, pelo menos, 30 minutos.

### 3.3. *Processamento de fragmentos testiculares obtidos por biópsia*

Imediatamente após a recolha, os fragmentos testiculares foram transportados para o laboratório, onde foram macerados com o auxílio de duas lâminas de bisturi, sob ampliação da lupa e sobre uma superfície aquecida na câmara de fluxo laminar.

Após homogeneizar o tecido macerado com o meio de preparação de gâmetas, observaram-se 10 µL da amostra ao microscópio ótico para avaliar a presença de espermatozoides, ou células da linha germinativa.

Com uma pipeta de Pasteur, transferiu-se a totalidade do meio de preparação de gâmetas com tecido macerado para um tubo de fundo cónico estéril e guardou-se em estufa a 37 °C com 6% CO<sub>2</sub>. Repetiu-se o processo para todos os fragmentos recolhidos, tendo o cuidado de identificar os tubos com tecido macerado em que tivesse sido confirmada a presença de gâmetas nas lâminas observadas.

As amostras foram centrifugadas em centrífuga a 37 °C, a 1000 rpm, durante 15 minutos. Aspiraram-se os sobrenadantes e os sedimentos foram transferidos para novos tubos, devidamente identificados, a que se adicionaram 2 mL de meio de preparação de gâmetas. Repetiu-se a centrifugação a 1000 rpm por 10 minutos, rejeitando os sobrenadantes, e adicionaram-se cerca de 0,3 mL de meio de preparação de gâmetas.

Os tubos foram mantidos na estufa a 37 °C, com 6% CO<sub>2</sub>, por cerca de 30 minutos, e após este período, procedeu-se, para cada tubo com amostra, à observação sistemática de uma lâmina com 10µL do sedimento ressuspendido.

As amostras em que se encontraram gâmetas na observação da lâmina preparada com o sedimento ressuspendido, foram criopreservadas (5.1. *Criopreservação de espermatozoides*), e o conteúdo dos restantes tubos foi descartado.

## 4. FERTILIZAÇÕES *IN VITRO*

### 4.1. *Fertilização in vitro (FIV)*

Terminados os 30 minutos de migração positiva do protocolo de preparação de gâmetas masculinos (3. *Processamento de gâmetas masculinos*) – e cerca de 5 horas após a punção e triagem dos oócitos –, carregaram-se as câmaras de contagem de um hemocítmetro Neubauer Improved com 10 µL do sobrenadante homogeneizado.

Imediatamente estimou-se o número de espermatozoides progressivos rápidos (2.2.1. *Motilidade*) em 5 quadrículas equidistantes (N), e calculou-se o volume de amostra, em microlitros (µL), necessário para a incubação dos oócitos com 50 mil espermatozoides progressivos rápidos (Z), através da fórmula abaixo indicada:

$$Z = \frac{1}{N} \quad \left[ \text{que advém da fórmula original } \frac{N \times 5 \times 10 \times 1000}{50000} = \frac{1}{Z} \right]$$

[Número de espermatozoides contidos em 1 µL]  
N x [1/5 quadrículas contadas] x [profundidade da câmara] x [1 µL= 0,001 mL, logo: 0,001 milhões / µL]

A cada poço da placa com oócitos adicionou-se o volume correspondente a 50-100 mil espermatozoides – procedendo, se necessário, à diluição mínima da amostra que tornasse exequível a aspiração da amostra necessária com as micropipetas disponíveis.

Cerca de 16-18 horas após a incubação com espermatozoides, removeram-se as células circundantes dos pré-zigotos através de aspirações repetidas com a pipeta

de desnudação acoplada ao respetivo suporte, e procedeu-se à avaliação da fertilização (4.3.1. *Avaliação da fertilização*).

## 4.2. *Microinjeção intracitoplasmática de um espermatozoide (ICSI)*

### 4.2.1. *Desnudação do oócito*

Cerca de 3 horas após a triagem do material biológico obtido na punção folicular, sob ampliação de uma lupa, os complexos CCO foram transferidos para uma solução com hialuronidase, em que permaneceram por 15 a 30 segundos, para promover a digestão da matriz de ácido hialurónico e a desagregação das células do *cumulus*-corona.

Os CCO foram transferidos, com o mínimo volume possível de solução com enzima, para meio apropriado à manipulação de gâmetas no exterior da estufa, e sujeitos a aspirações e rejeições repetidas, com pipeta de desnudação, em poços sequenciais do mesmo meio, até se conseguirem remover a maioria das células aderentes ao oócito.

### 4.2.2. *Avaliação do estado de maturação nuclear do oócito*<sup>15</sup>

Imediatamente após a desnudação, os oócitos foram observados ao microscópio ótico invertido e classificados como oócitos em VG – se apresentassem um núcleo intracitoplasmático (vesícula germinativa - VG) –, oócitos em metáfase I (MI) quando não apresentassem VG nem primeiro glóbulo polar, ou oócitos em metáfase II (MII) se apresentassem o primeiro glóbulo polar no espaço perivitelino.

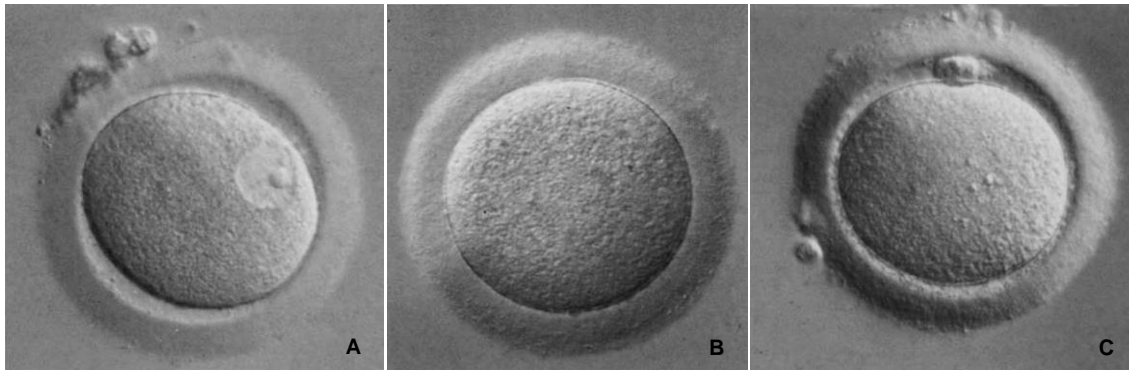
Após confirmação do estado de maturação oocitária, os oócitos foram transferidos para meio adequado ao desenvolvimento de embriões em clivagem, equilibrado com uma antecedência mínima de 12 horas, e colocados na estufa, a 37 °C, com 5% O<sub>2</sub> e 6% CO<sub>2</sub>.

### 4.2.3. *Imobilização do espermatozoide, posicionamento do oócito e microinjeção*

Cerca de 5 horas após a punção, dispuseram-se, numa placa de Petri, duas gotas alongadas de meio de manipulação de gâmetas masculinos com polivinilpirrolidona (PVP), e um número de gotas de meio de manipulação de gâmetas sob a atmosfera exterior à estufa apropriado ao número de oócitos a microinjetar. Recobriram-se todos os meios com óleo de parafina – para assegurar a conservação da temperatura, pH e osmolaridade dos meios –, e a placa foi guardada na estufa a 37°C, durante 15 minutos.

---

15 – Cerca de 10% dos oócitos puncionados podem apresentar um núcleo intracitoplasmático, conhecido como vesícula germinativa (VG), característico da prófase da primeira divisão mitótica, e cerca de 5% não apresentam nem o primeiro GP nem VG, e são geralmente classificáveis como oócitos em metáfase I (MI), ainda que não tenham progredido necessariamente para o alinhamento característico dos cromossomas (Rienzi *et al.*, 2012). Assume-se o estado de maturidade nuclear do oócito - metáfase II (MII) –, quando o primeiro glóbulo polar (GP) é visível no espaço perivitelino (Figura 4).



**Figura 4** – Estádios de desenvolvimento nuclear (A-C), de oócitos humanos: A – vesícula germinativa (VG) na periferia do quadrante superior direito do oócito; B – metafase I (MI); C – metafase II (MII), com o glóbulo polar I no espaço perivitelino, em cima, ao centro. Adaptação de fotografias retiradas de Mandelbaum, (2000).

Após os 15 minutos, adicionou-se uma gota de 10  $\mu$ L da amostra de gâmetas masculinos preparados (3. *Processamento de gâmetas masculinos*) à primeira gota de meio com PVP, e, sob ampliação da lupa, na câmara de fluxo laminar, dispuseram-se os oócitos nas gotas de meio de manipulação de gâmetas no exterior da estufa.

Sob ampliação de 400x no microscópio ótico invertido, equipado com micromanipuladores <sup>16</sup>, e com recurso à microagulha de microinjeção, procedeu-se à aspiração de espermatozoides que, no meio de viscosidade aumentada pelo PVP, exibissem a melhor morfologia e motilidade. Os espermatozoides selecionados foram então transferidos para a segunda gota com PVP, e imobilizados através da compressão da cauda com a agulha de microinjeção e movimento da agulha no sentido transversal à cauda para provocar a rotura da membrana do espermatozoide <sup>17</sup>. Aspirou-se um dos espermatozoides selecionados e imobilizados, e afastou-se a agulha da placa.

Focou-se o primeiro oócito a microinjetar e, com o auxílio da microagulha de suporte (agulha “*holding*”) – de maior diâmetro e extremidade distal arredondada – provocou-se a rotação do oócito até situar o GPI no eixo perpendicular ao das microagulhas, e com a agulha “*holding*” aspirou-se levemente o oócito para o fixar. Focou-se novamente a agulha de microinjeção, na gota do primeiro oócito a microinjetar, posicionou-se o espermatozoide na extremidade da agulha, aproximou-se a agulha de microinjeção do oócito, para reajustar a posição da agulha de microinjeção para que microinjetasse perpendicularmente ao GPI, e na profundidade média do oócito. Perfuraram-se então a ZP e a membrana do oócito, aspirou-se uma pequena porção de citoplasma para envolver o espermatozoide <sup>18</sup>, e expulsou-se

16 – Micromanipulação refere-se a tecnologia que diminui em escala a amplitude de movimentos do operador, e, em PMA, permite procedimentos de manipulação de gâmetas e embriões.

17– A imobilização da cauda do espermatozoide e rotura da membrana permite impedir alterações no citoesqueleto do oócito e despoletar os eventos de ativação do oócito.

18 – A aspiração do ooplasma visa a indução da ativação do oócito que pode ficaria comprometida na ausência dos eventos de fusão de membranas aquando da fertilização (Palermo *et al.*, 2012).

novamente o citoplasma aspirado, depositando também o espermatozoide no interior do oócito. Afastou-se lentamente a agulha de microinjeção, libertou-se o oócito da agulha “*holding*”, e repetiu-se o processo em todos os oócitos a microinjetar.

Sobre a bancada aquecida da câmara de fluxo laminar, lavaram-se e transferiram-se os oócitos microinjetados para meio adequado aos primeiros dias do desenvolvimento embrionário, e guardaram-se as placas na estufa a 37°C, com 5% O<sub>2</sub> e 6% CO<sub>2</sub>.

### 4.3. Monitorização da fertilização e do desenvolvimento embrionário

#### 4.3.1. Avaliação da fertilização

Cerca de 16-18 horas após contacto com os gâmetas masculinos, observaram-se os oócitos sob ampliação de 400x, ao microscópio ótico invertido, e anotou-se o número de pronúcleos ou glóbulos polares identificados em cada um.

Sob ampliação da lupa, na câmara de fluxo laminar, procedeu-se então à separação dos oócitos fecundados (com 2 PN) dos não fecundados, sem PN identificáveis, ou com número anómalo de PN – potencialmente aplicável em oócitos fertilizados por FIV (4.1. *Fertilização in vitro (FIV)*) –, descartando os últimos, e deixando em cultura os restantes, em meio apropriado ao desenvolvimento de embriões em fase de clivagem.

#### 4.3.2. Avaliação do estado de desenvolvimento embrionário

A observação do material biológico no microscópio ótico invertido foi repetida diariamente até ao dia da transferência (4.4. *Transferência de embriões*) ou criopreservação (5.2. *Vitrificação de oócitos e embriões*), e foram anotados o número de blastómeros, ou estágio do desenvolvimento, e classificação de cada embrião, com base nos critérios sumariados nas tabelas 9, 10 e 11.

#### 4.3.3. Monitorização contínua com recurso a *time-lapse imaging*

No seguimento de ciclos de fertilização *in vitro* por ICSI, ou após desnudação dos pré-zigotos em ciclos de FIV, transferiu-se o material biológico para placas de cultura de 9 ou 16 poços, específicas do sistema de monitorização por *time-lapse imaging PrimoVision®* (Figura 5). As placas foram de seguida adequadamente posicionadas no suporte do microscópio digital invertido *PrimoVision EVO*, incorporado no interior da estufa, e mantidas em cultura a 37°C com 5% O<sub>2</sub> e 6% CO<sub>2</sub>.

Com recurso ao *software* de análise de imagem *Primo Vision Capture & Analyzer*, introduziram-se as informações pertinentes sobre o ciclo, selecionaram-se as opções pretendidas de contraste, luminosidade, e intervalo temporal entre fotográficas, e identificaram-se os poços com material biológico a monitorizar.

**Tabela 9** – Quadro de classificações de qualidade embrionária dos dias 2 e 3 do desenvolvimento in vitro, com base em critérios morfológicos (Balaban *et al.*, 2011). PF – Pós-fertilização (hora 0). Qualidade embrionária decrescente de A para D.

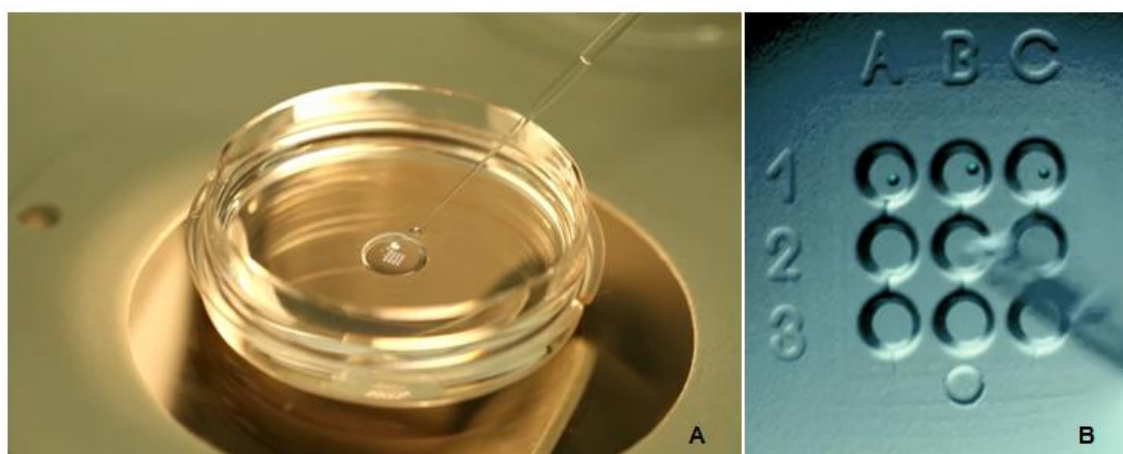
DIA	CLASSIFICAÇÃO	DESCRIÇÃO
2 (44 h PF)	A	1) Embrião com 4 blastómeros proporcionais, fragmentação <10%, sem multinucleação nem vacúolos, e com ZP normal
	B	1) Embrião com 2 ou 5 blastómeros proporcionais, sem multinucleação nem vacúolos, fragmentação <26%, e ZP normal
		2) Embrião com 4 blastómeros proporcionais, 11-25% fragmentação, sem multinucleação nem vacúolos, ZP normal
	C	1) Embrião com 2-6 blastómeros não proporcionais, sem multinucleação e com poucos vacúolos, 26-35% fragmentação, e ZP anormal
2) Embrião com 1 blastómero grande e 2 pequenos, sem multinucleação e com poucos vacúolos, fragmentação <35% e ZP anormal		
3 (68h PF)	D	1) Embrião com 1 ou mais de 6 blastómeros, com multinucleação e múltiplos vacúolos, fragmentação >35%, e ZP anormal
		2) Embrião com 3 blastómeros proporcionais, com multinucleação e múltiplos vacúolos, fragmentação >35% e ZP anormal
	A	1) Embrião com 7-8 blastómeros proporcionais (que resultem de um embrião de dia 2 com 4 blastómeros), sem multinucleação nem vacúolos, fragmentação <10% e ZP normal
		1) Embrião com 7-8 blastómeros proporcionais (que resulte de um embrião de dia 2 com 4 blastómeros), sem multinucleação nem vacúolos, 11-25% fragmentação e ZP normal
B	2) Embrião com 9 blastómeros proporcionais, (que resulte de um embrião de dia 2 com 4 blastómeros), sem multinucleação nem vacúolos, fragmentação <26% e ZP normal	
	1) Embrião com 7 blastómeros não proporcionais (que resulte de um embrião de dia 2 com 2, 4 ou 6 blastómeros), sem multinucleação e com poucos vacúolos, 26-35% fragmentação e ZP anormal	
C	2) Embrião com 8 blastómeros não proporcionais (que resulte de um embrião de dia 2 com 6 blastómeros), sem multinucleação e com poucos vacúolos, fragmentação <35% e ZP anormal	
	3) Embrião com 6 blastómeros não proporcionais (que resulte de um embrião de dia 2 com 2 ou 4 blastómeros), sem multinucleação e com poucos vacúolos, fragmentação <35% e ZP anormal	
D	4) Embrião com 6 blastómeros não proporcionais (que resulte de um embrião de dia 2 com 1 blastómero grande e 2 pequenos), sem multinucleação e com poucos vacúolos, fragmentação <35% e ZP anormal	
	1) Embriões resultantes do desenvolvimento de embriões de dia 2 com 1 ou +6 blastómeros	
	2) Embriões com menos de 6 blastómeros, com multinucleação e múltiplos vacúolos, fragmentação >35% e ZP anormal	

**Tabela 10** – Quadro de classificações de qualidade embrionária do dia 4 do desenvolvimento in vitro, com base em critérios morfológicos (Balaban *et al.*, 2011). PF – Pós-fertilização (hora 0). Qualidade embrionária decrescente de 1 para 3.

DIA	CLASSIFICAÇÃO	DESCRIÇÃO
4 (92h PF)	1	Embrião que tenha realizado a 4ª divisão mitótica (≈16 blastómeros) e apresente evidências de compactação envolvendo, virtualmente, a totalidade do volume embrionário
	2	Embrião que tenha realizado a 4ª divisão mitótica (≈16 blastómeros) e apresente evidências de compactação envolvendo a maioria do volume embrionário
	3	Embrião que apresente compactação em menos de metade do volume embrionário, restando dois ou três blastómeros destacáveis

**Tabela 11** – Quadro de classificações de blastocistos ao dia 5 do desenvolvimento in vitro, com base em critérios morfológicos (Balaban *et al.*, 2011). PF – Pós-fertilização (hora 0). Qualidade decrescente de 1 para 3, relativamente à classificação da MCI e TF. Desenvolvimento do blastocisto crescente de 1 para 4. Blastocistos mais desenvolvidos e com melhor classificação da MCI e TF apresentam globalmente a melhor qualidade.

DIA	CLASSIFICAÇÃO	DESCRIÇÃO	
5 (116H PF)	Estádio de desenvolvimento	1	Inicial
		2	Blastocisto
		3	Blastocisto expandido
		4	Blastocisto em eclosão
	MCI	1	MCI proeminente, facilmente identificável com muitas células compactas
		2	MCI facilmente identificável com muitas células frouxamente agrupadas
		3	MCI dificilmente identificável e com poucas células
	TF	1	Epitélio coeso formado por muitas células
		2	Epitélio formado por poucas células
		3	TF com muito poucas células



**Figura 5** – Placa de cultura de embriões para monitorização contínua com recurso a *time-lapse imaging*. A – fotografia da placa com extremidade de uma micropipeta de desnudação a servir de escala; B – fotografia de detalhe dos poços da placa de cultura sob ampliação de lupa. Fotografias retiradas da página *online* da empresa Vitrolife.

O desenvolvimento embrionário foi observado diariamente, nos horários mais convenientes atendendo ao trabalho laboratorial programado para o dia, e as substituições do meio de cultura decorreram nos momentos previstos – sob ampliação da lupa, na câmara de fluxo laminar, e sem retirar os embriões da placa, aspirou-se o meio a substituir, e adicionou-se o volume adequado do meio de cultura seguinte.

No dia da transferência (4.4. *Transferência de embriões*) ou criopreservação (5.2. *Vitrificação de oócitos e embriões*), procedeu-se à revisão do registo fotográfico contínuo de cada poço monitorizado, e identificaram-se os embriões de acordo com as respetivas finalidades – transferência, criopreservação ou destruição – atendendo aos parâmetros de avaliação estática e cinética do desenvolvimento embrionário.

#### 4.4. *Transferência de embriões*

As transferências de embriões no CEIE decorreram entre o terceiro e o quinto dia do desenvolvimento embrionário – considerando dia zero o dia da fertilização *in vitro* –, ou no seguimento da monitorização do ciclo uterino – transferências de embriões criopreservados de ciclos anteriores ou de doação de oócitos.

Cerca de 15 minutos a anteceder a transferência intra-uterina de embriões, procedeu-se à emissão de feixes laser, sob ampliação do microscópio invertido, para diminuição da espessura de uma região da ZP dos embriões selecionados – em blastocistos, a emissão de laser foi direcionada à ZP diametralmente oposta à MCI – e transferiram-se os embriões para o meio de transferência com ácido hialurónico.

No momento da transferência, com o auxílio de uma seringa acoplada ao cateter previamente aquecido na estufa a 37°C, e após aspiração e rejeição de meio para lavagem do interior do cateter com meio apropriado, aspiraram-se porções intercaladas de meio de transferência, ar, meio com os embriões, ar e novamente meio. O cateter carregado com os embriões foi então entregue na sala de transferência e o ginecologista, com recurso a ultrassonografia, procedeu à deposição dos embriões na cavidade uterina.

## 5. CRIOPRESERVAÇÃO DE GÂMETAS E EMBRIÕES

### 5.1. *Criopreservação de espermatozoides*

Após a preparação da amostra (3. *Processamento de gâmetas masculinos*), dependendo da turbidez do meio de migração positiva dos espermatozoides, aspirou-

se o sobrenadante até ao sedimento e transferiu-se para um novo tubo estéril, ou ressuspendeu-se o sedimento no sobrenadante, e adicionou-se igual volume de crioprotetor com glicerol – mantido à temperatura ambiente com uma antecedência mínima de 2 horas –, gota a gota e com homogeneização contínua.

Após 10 minutos, repetiu-se a homogeneização da amostra diluída em crioprotetor, e procedeu-se ao carregamento das palhetas de criopreservação, devidamente identificadas, com um volume aproximado de 0,5 mL, conservando uma porção de palheta com ar para permitir a expansão da amostra durante a congelação, e selaram-se as extremidades com o selador térmico.

As palhetas foram então mantidas na horizontal por 30 minutos, em vapor de azoto, sobre um suporte parcialmente imerso em azoto líquido. Terminado este período transferiram-se as palhetas para as localizações previamente definidas nos contentores de armazenamento em azoto líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ .

#### 5.1.1. ***Descongelação de gâmetas masculinos criopreservados***

Retiraram-se as palhetas do contentor de armazenamento e, após 5 minutos à temperatura ambiente, procedeu-se ao protocolo de preparação dos gâmetas (4.1.2. *Processamento de gâmetas masculinos criopreservados*).

## 5.2 *Vitrificação de oócitos e embriões*

A vitrificação de oócitos, e de embriões em clivagem ou blastocisto<sup>19</sup>, foi realizada conforme os protocolos disponibilizados pelos fornecedores dos meios, e compreendeu transferências sucessivas para meios com concentração progressivamente superior de crioprotetores, e adequados ao estágio de desenvolvimento do material a preservar.

Após o período estipulado no meio mais concentrado, os oócitos ou embriões foram aspirados com um volume mínimo do meio, e transferidos para um orifício na extremidade de uma palheta de vitrificação, que era imediatamente introduzida no interior do tubo que com a palheta compunha o sistema fechado de vitrificação, e que até então foi mantido na vertical com a extremidade aberta voltada para cima, e parcialmente imerso em azoto líquido.

Após selar a extremidade aberta do tubo, com recurso a um selador térmico, as palhetas foram guardadas nas localizações predefinidas nos contentores de armazenamento em azoto líquido.

---

19 – Os embriões em blastocisto foram submetidos ao protocolo de vitrificação após colapso induzido por emissões de laser controladas, sobre a ZP e uma região da TF diametralmente opostas à MCI.

## **Capítulo III.**

### Exposição e discussão de resultados

## 1. LABORATÓRIO DE ANDROLOGIA

### 1.1. *Estudo dos parâmetros espermáticos*

O contacto inicial com os protocolos estabelecidos no Centro de Estudos de Infertilidade e Esterilidade, para avaliação de amostras seminais, decorreu com recurso a amostras remanescentes de espermogramas concluídos no próprio dia.

Após demonstração de autonomia no período de trabalho laboratorial supervisionado, a receção de amostras e análise de todos os parâmetros, macroscópicos e microscópicos, de avaliação espermática, à exceção da morfologia, decorreram com regularidade. A avaliação da morfologia espermática para apresentação no relatório do espermograma – e sendo um parâmetro passível de apreciação posterior ao dia da colheita da amostra – foi sempre da responsabilidade dos biólogos residentes.

A análise de um total de amostras superior a 50 permitiu adquirir e consolidar competência no estudo autónomo dos parâmetros espermáticos de avaliação imediata (Tabelas 12 e 13), e na preparação de lâminas para avaliação ou consulta subseqüentes, ou noutros centros, da vitalidade – por coloração com eosina-nigrosina – e da morfologia.

A observação de esfregaços corados de espermogramas concluídos, embora não tendo sido suficiente para assegurar proficiência, permitiu praticar a avaliação da morfologia espermática e acentuar a percepção de diversidade intra- e inter-amostras.

### 1.2. *Processamento de gâmetas masculinos*

No decurso de ciclos de IIU, FIV, ICSI, criopreservação, ou doação de gâmetas, decorridos no Centro de Estudos de Infertilidade e Esterilidade, ao longo do período de estágio, foram preparadas mais de 60 amostras frescas obtidas por ejaculação, e pelo menos 6 amostras criopreservadas (Tabelas 12 e 13), segundo os protocolos e finalidades específicas.

Aquando do caso único de biópsia testicular, e após observar os biólogos residentes, foi possível auxiliar na maceração do tecido e pesquisa de gâmetas ao microscópio ótico invertido, sob ampliação de 200x ou 400x, para posterior processamento e criopreservação da amostra.

Os protocolos de preparação de gâmetas de amostras obtidas por ejaculação ou criopreservadas, para PMA ou criopreservação, foram executados com autonomia, e conseqüentes fertilizações, e gravidezes clinicamente comprovadas, permitiram demonstrar que as amostras foram adequadamente processadas.

### 1.3. Criopreservação de espermatozoides

O protocolo de criopreservação de gâmetas masculinos foi desempenhado no contexto de doações para o banco de dadores, preservação da fertilidade e impossibilidade de comparência do membro masculino do casal na data prevista de realização do ciclo de tratamento de PMA.

À semelhança do ocorrido com as restantes técnicas do laboratório de andrologia, a criopreservação de gâmetas masculinos foi desempenhada após demonstração de autonomia no trabalho laboratorial, num número de amostras superior a 11.

A posterior descongelação e constatação de taxas normais de recuperação das amostras, no contexto de ciclos de inseminação artificial ou de fertilização *in vitro*, permitiu comprovar a aquisição de competência no protocolo (Tabelas 12 e 13).

## 2. LABORATÓRIO DE EMBRIOLOGIA

### 2.1. Fertilização *in vitro* (FIV)

O protocolo de FIV não foi executado na íntegra, em nenhum momento do período do estágio. No entanto, prepararam-se placas e meios necessários à FIV, e, após assistir aos procedimentos, foi possível contactar com etapas isoladas do protocolo, sem substituir a sua execução pelos biólogos residentes.

Ao longo do período do estágio foi possível replicar a avaliação da concentração de espermatozoides progressivos nas amostras processadas – obtendo valores semelhantes aos estimados pelos biólogos residentes –, testar e demonstrar capacidade de localização dos oócitos ou pré-zigotos nas placas de fertilização, e praticar a desnudação do material biológico em oócitos ou embriões degenerados.

Não tendo sido desenvolvida autonomia na execução do protocolo, apreenderam-se, ainda assim, as etapas essenciais do trabalho laboratorial envolvido na FIV.

### 2.2. Microinjeção intracitoplasmática de um espermatozoide (ICSI)

Após assistir à desnudação de oócitos e treinar o procedimento de manipulação de material biológico degenerado com pipetas de desnudação, foi possível, num ciclo de indução da ovulação de que resultou um número particularmente alto de oócitos, proceder à desnudação de um oócito a ser posteriormente fertilizado por ICSI.

O oócito foi microinjetado, juntamente com os restantes oócitos desnudados, por um dos biólogos residentes e na transferência para a placa de cultura foi separado dos restantes para permitir a sua distinção. À semelhança de outros oócitos microinjetados de igual modo, o oócito foi fertilizado com normalidade, pelo que permitiu a comprovação da adequação da sua manipulação.

O contacto prático com o protocolo de microinjeção decorreu em duas oportunidades temporalmente distadas, no microscópio provido de micromanipuladores, previamente preparado com as agulhas de microinjeção e usado por um dos biólogos residentes num ciclo de ICSI. Estas ocasiões permitiram praticar as etapas de aspiração e imobilização de espermatozoides selecionados para microinjeção, e de rotação e suporte de oócitos degenerados com a microagulha “*holding*”. Numa das ocasiões foi ainda possível simular a microinjeção de um espermatozoide, previamente selecionado e imobilizado, num oócito degenerado, após estabilização do GP na posição correspondente às 6h do relógio, e posicionamento relativo da agulha de microinjeção que permitisse a penetração à profundidade adequada.

O manuseamento do microscópio equipado permitiu constatar a delicadeza de movimentos permitidos com o auxílio dos micromanipuladores, e apreender os procedimentos ao microscópio inerentes à ICSI. No entanto, as sessões de contacto com o microscópio equipado de micromanipuladores foram insuficientes para a aquisição de autonomia no protocolo de ICSI e, fundamentalmente, na preparação dos micromanipuladores e posicionamento das microagulhas nos respetivos suportes, imprescindíveis ao procedimento.

### **2.3. Avaliação da fertilização e do desenvolvimento embrionário**

A avaliação da fertilização e do desenvolvimento embrionário foram sempre responsabilidade dos biólogos residentes. No entanto, durante o período de estágio foi possível assistir à observação e avaliação dos embriões, sobretudo com recurso à tecnologia de *time-lapse imaging*.

A monitorização contínua do desenvolvimento embrionário permitiu identificar evidências de multinucleação em blastómeros, proceder à seleção de embriões para transferência atendendo características cinéticas e morfológicas preditivas da competência para implantação, e, sobretudo, consciencializar a ocorrência de alterações frequentes no padrão de divisão embrionária, responsáveis por alterações na expressão da qualidade embrionária, em avaliações temporalmente espaçadas.

## 2.4. *Transferência de embriões*

As transferências de embriões no centro foram sempre da responsabilidade dos biólogos residentes. O contacto com o protocolo de preparação dos cateteres decorreu da observação e posterior replicação da técnica, com material biológico degenerado ou supranumerário mas não criopreservável.

Apesar de não ter sido efetivamente executada nenhuma transferência de embriões, foi demonstrada a capacidade de carregar os cateteres de transferência com um ou dois embriões, e segundo o esquema e volumes de meio e ar recomendados.

## 2.5. *Vitrificação de oócitos e embriões*

O contacto com os protocolos de vitrificação de oócitos e embriões ocorreu no seguimento de ciclos de fertilização *in vitro* que originaram oócitos ou embriões supranumerários com qualidade para transferência. Depois de estudada e observada a execução dos protocolos, e com recurso a oócitos ou embriões degenerados ou supranumerários de má qualidade, destinados a destruição, foi possível ensaiar as etapas de transferência do material biológico para as palhetas de vitrificação, com uma quantidade mínima de meio.

Não tendo sido executada nenhuma vitrificação efetiva, não foi possível avaliar senão a adequação de movimento e celeridade da técnica, pelo que não foi desenvolvida capacidade de trabalho autónomo na vitrificação de material biológico.

**Tabela 12** – Quadro sumário dos protocolos e competências desenvolvidas durante o período de estágio: ✓ - protocolo executado autonomamente; — - protocolo executado sob supervisão ou sem aquisição de autonomia.

AUTONOMIA NA EXECUÇÃO DO PROTOCOLO		
<b>1. LABORATÓRIO DE ANDROLOGIA</b>		
1.1. <i>Estudo dos parâmetros espermáticos</i>		
Avaliação macroscópica	Liquefação	✓
	Volume	✓
	Viscosidade	✓
	pH	✓
	Cor	✓
	Cheiro	✓
	Avaliação microscópica	Motilidade
Vitalidade		✓
Hipoosmolaridade		✓
Concentração e número de espermatozoides		✓
Morfologia		-
1.2. <i>Processamento de gâmetas masculinos</i>		
Processamento de amostras obtidas por ejaculação	✓	
Processamento de gâmetas masculinos criopreservados	✓	
Processamento de fragmentos testiculares obtidos por biópsia	-	
1.3. <i>Criopreservação de espermatozoides</i>	✓	
<b>2. LABORATÓRIO DE EMBRIOLOGIA</b>		
2.1. <i>Fertilização in vitro (FIV)</i>	-	
2.2. <i>Microinjeção intracitoplasmática de um espermatozoide (ICSI)</i>	-	
2.3. <i>Avaliação da fertilização e do desenvolvimento embrionário</i>	-	
2.4. <i>Transferência de embriões</i>	-	
2.5. <i>Vitrificação de oócitos e embriões</i>	-	

**Tabela 13** – Quadro sumário dos procedimentos realizados autonomamente ao longo do período de estágio. (a) – Exceto avaliação morfológica de espermatozoides.

PROTOCOLO	NÚMERO DE PROCEDIMENTOS
Estudo dos parâmetros espermáticos (a)	50+
Processamento de amostras obtidas por ejaculação	60+
Processamento de gâmetas masculinos criopreservados	5+
Criopreservação de espermatozoides	11+

## **Capítulo IV.**

### **Conclusões e Considerações**

A reprodução humana é um fenómeno complexo que envolve múltiplos eventos passíveis de falha, que tornam facilmente compreensível que a infertilidade conjugal seja uma realidade tão frequente. Conhecer e compreender princípios básicos de biologia celular, molecular, e de genética, além dos processos biológicos envolvidos na reprodução, e a anatomia e fisiologia normais das estruturas reprodutoras, gâmetas e embriões, constituem condições fundamentais à identificação de fatores de infertilidade, e ao planeamento de estratégias terapêuticas, e metodologias laboratoriais, que permitam colmatar os processos que estejam comprometidos *in vivo*.

A aplicação da genómica, proteómica e transcriptómica, essencialmente na investigação de elementos de um casal com infertilidade inexplicada, poderá fornecer respostas sobre as moléculas ou interações em falha, e possibilitar o desenvolvimento de abordagens direcionadas e individualizadas. No entanto, a PMA surge como uma opção viável para colmatar situações de infertilidade ou de risco de transmissão de doenças graves, de base genética ou vírica, à descendência.

Ao longo dos meses compreendidos entre setembro de 2012 e julho de 2013, foi possível o contacto diário com as rotinas dos laboratórios de andrologia e embriologia do Centro de Estudos de Infertilidade e Esterilidade (CEIE).

Após um período inicial de trabalho laboratorial supervisionado, e de observação dos procedimentos realizados pelos biólogos residentes, foi demonstrada a capacidade de trabalho autónomo no laboratório de andrologia. A receção e análise, processamento, ou criopreservação, das amostras seminais de indivíduos que recorreram ao CEIE – no contexto de espermogramas, dádivas para o banco de gâmetas de dador, criopreservação de gâmetas masculinos, inseminações artificiais, ou fertilizações *in vitro* – foram então executados, de maneira autónoma e segundo os protocolos estabelecidos.

Foi demonstrada autonomia e competência no estudo de parâmetros espermáticos de avaliação imediata, preparação de lâminas fixadas de avaliação da vitalidade e morfologia, processamento de amostras obtidas por ejaculação, criopreservação de espermatozoides e processamento de amostras criopreservadas.

No total, mais de 50 amostras foram avaliados segundo parâmetros macroscópicos e microscópicos (com exceção da morfologia espermática, cuja avaliação foi sempre da responsabilidade de um dos biólogos residentes), 60 amostras obtidas por ejaculação foram preparadas para criopreservação, IA, FIV ou ICSI, 6 amostras de gâmetas masculinos criopreservados foram preparadas para PMA, e 11 amostras seminais foram criopreservadas.

O contacto com os procedimentos do laboratório de embriologia permitiu desenvolver habilidade na manipulação de gâmetas e embriões com recurso a pipetas

de desnudação, e na preparação de cateteres com embriões para transferência, não tendo sido, no entanto, suficiente para a aquisição de autonomia ou proficiência para a responsabilização sobre rotinas de embriologia.

Sumariamente, o estágio decorrido no CEIE permitiu a aquisição de competências técnicas inerentes ao trabalho laboratorial de andrologia, de um centro em que se processem protocolos de PMA, e que podem ser de utilidade em laboratórios de investigação em áreas que contemplem a manipulação de gâmetas ou embriões, e a apreensão de protocolos e técnicas inerentes a laboratórios de embriologia.



## Referências bibliográficas

- Abdelhamid A.M.S. (2013). The success rate of pregnancy in IUI cycles following endometrial sampling. A randomized controlled study: Endometrial sampling and pregnancy rates. *Archives Of Gynecology And Obstetrics*; **288**: 673-678.
- Agboghoroma C.O. e Giwa-Osagie O.F. (2012). Management of infertility in HIV infected couples: a review. *African Journal Of Reproductive Health*; **16**: 13-20.
- Allahbadia G.N. e Merchant R. (2012). Intrauterine Insemination. Em: *Practical Manual of In Vitro Fertilization – Advanced Methods and Novel Devices*. Springer New York. 281-282.
- Bahat A., Caplan S.R. e Eisenbach M. (2012). Thermotaxis of human sperm cells in extraordinarily shallow temperature gradients over a wide range. *PLoS ONE*, **7**: e41915.
- Balaban B., Brison D., Calderón G., Catt J., Conaghan J., Cowan L., Ebner T., Gardner D., Hardarson T., Lundin K., Magli C., Mortimer D., Mortimer S., Munné S., Royere D., Scott L., Smits J., Thornhill A., van Blerkom J. e Van den Abbeel E. [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*, **26**: 1270-1283.
- Belil I. e Veiga A. (2012). Assisted Hatching in IVF. Em: *Practical Manual of In Vitro Fertilization – Advanced Methods and Novel Devices*. Springer New York. 445-451.
- Benkalifa M., Demiroglu A., Sari T., Balashova E., Tsouroupani M., Giakoumakis Y. e Gurgan T. (2011). Autologous embryo–cumulus cells co-culture and blastocyst transfer in repeated implantation failures: a collaborative prospective randomized study. *Zygote*, **20**:173-180.
- Chamayou S., Patrizio P., Storaci G., Tomaselli V., Alecci C., Ragolia C., Crescenzo C. e Guglielmino A. (2013). The use of morphokinetic parameters to select all embryos with full capacity to implant. *Journal Of Assisted Reproduction And Genetics*, **30**: 703-710.
- Cihangir N., Görkemli H., Özdemir S., Aktan M. e Duman S. (2010). Influence of cumulus cell coculture and cumulus-aided embryo transfer on embryonic

- development and pregnancy rates. *Journal Of The Turkish German Gynecological Association*, **11**:121-126.
- Cooper T.G., Brazil C., Swan S.H. e Overstreet J.W. (2007). Ejaculate volume is seriously underestimated when semen is pipetted or decanted into cylinders from the collection vessel. *Journal Of Andrology*, **28**: 1-4.
- Cruz M., Gadea B., Garrido N., Pedersen K.S., Martínez M., Pérez-Cano I., Muñoz M. e 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**: 569-573.
- Cruz M., Garrido N., Herrero J., Pérez-Cano I., Muñoz M. e Meseguer M. (2012). Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reproductive Biomedicine Online*, **25**: 371-381.
- De Geyter C., Sterthaus O., Miny P., Wenzel F., Lapaire O., De Geyter M. e Sartorius G. (2013). First successful pregnancy in Switzerland after prospective sex determination of the embryo through the separation of X-chromosome bearing spermatozoa. *Swiss Medical Weekly*, doi: 10.4414/smw.2013.13718.
- De Lamirande E., San Gabriel M.C. e Zini A. (2012). Human sperm chromatin undergoes physiological remodeling during in vitro capacitation and acrosome reaction. *Journal Of Andrology*, **33**: 1025-1035.
- Delaroche L., Yazbeck C., Gout C., Kahn V., Oger P. e Rougier N. (2013). Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) after repeated IVF or ICSI failures: a prospective comparative study. *European Journal Of Obstetrics & Gynecology And Reproductive Biology*, **167**: 76-80.
- Druart X. (2012). Sperm interaction with the female reproductive tract. *Reproduction in domestic animals*, **47**: 348-352.
- Edgar D.H. e Gook D.A. (2012). A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. *Human Reproduction Update*, **18**: 536-554.
- Emami N., Deperthes D., Malm J. e Diamandis P. (2008). Major role of human KLK14 in seminal clot liquefaction. *The Journal Of Biological Chemistry*, **283**: 19561-19569.
- Eskenazi B., Wyrobek A.J., Slotter E., Kidd S.A., Moore L., Young S. e Moore D. (2003). The association of age and semen quality in healthy men. *Human Reproduction*, **18**: 447-454.

- Esteves S.C., Miyaoka R. e Agarwal A. (2011). An update on the clinical assessment of the infertile male. *Clinics*, **66**: 691-700.
- Evans J.P. (2012). Sperm-egg interaction. *Annual Review of Physiology*, **74**: 477-502.
- Flori F., Ermini L., La Sala G.B., Nicoli A., Capone A., Focarelli R., Rosati F. e Giovampaola C.D. (2008). *The GPI-anchored CD52 antigen of the sperm surface interacts with semenogelin and participates in clot formation and liquefaction of human semen. Molecular Reproduction And Development*, **75**: 326-335.
- Gadella B.M. e Evans J.P. (2011). Membrane fusions during mammalian fertilization. *Advances In Experimental Medicine And Biology*, **713**: 65-80.
- Garner D.L. (2009). Hoechst 33342: The dye that enabled differentiation of living X- and Y-chromosome bearing mammalian sperm. *Theriogenology*, **71**: 11-21.
- Garolla A., Torino M., Sartini B., Cosci I., Patassini C., Carraro U. e Foresta C. (2013). Seminal and molecular evidence that sauna exposure affects human spermatogenesis. *Human Reproduction*, **28**: 877-885.
- Gaur D.S., Talekar M.S. e Pathak V. (2010). Alcohol intake and cigarette smoking: Impact of two major lifestyle factors on male fertility. *Indian Journal Of Pathology & Microbiology*, **53**: 35-40.
- Gibreel A., Badawy A., El-Refai W. e El-Adawi N. (2013). Endometrial scratching to improve pregnancy rate in couples with unexplained subfertility: A randomized controlled trial. *The Journal Of Obstetrics And Gynaecology Research*, **39**: 680-684.
- González C., Boada M., Devesa M. e Veiga A. (2012). Concise review: fertility preservation: an update. *Stem Cells Translational Medicine*, **1**: 668-672.
- Granot I., Gnainsky Y. e Dekel N. (2012). Endometrial inflammation and effect on implantation improvement and pregnancy outcome. *Reproduction*, **144**: 661-668.
- Gremeau A.S., Andreadis N., Fatum M., Craig J., Turner K., McVeigh E. e Child T. (2012). In vitro maturation or in vitro fertilization for women with polycystic ovaries? A case-control study of 194 treatment cycles. *Fertility And Sterility*. **98**: 355-360.
- Grimbizis G.F., Gordts S., Di Spiezio Sardo A., Brucker S., De Angelis C., Gergolet M., Li T.C., Tanos V., Brölmann H., Gianaroli L. e Campo R. (2013). The ESHRE/ESGE consensus on the classification of female genital tract congenital anomalies. *Human Reproduction*, **28**: 2032-2044.
- Grynberg M., Hachem H.E., de Bantel A., Benard J., le Parco S. e Fanchin R. (2013). In vitro maturation of oocytes: uncommon indications. *Fertility And Sterility*, **99**: 1182-1188.

- Hardarson T., Landuyt L.V. e Jones G. (2012). The blastocyst. *Human Reproduction*, **27**: i72-i91.
- Henkel R. (2012). Sperm preparation: state-of-the-art—physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. *Asian Journal Of Andrology*, **14**: 260-269.
- Hlinka D., Kařatová B., Uhrinová I., Dolinská S., Rutarová J., Rezáčová J., Lazarovská S. e Dudáš M. (2012). Time-lapse cleavage rating predicts human embryo viability. *Physiological Research*, **61**: 513-525.
- Jequier A.M. (2011a). Anatomy and physiology of the male reproductive tract. Em: *Male Infertility: A Clinical Guide*. 2ª edição. Cambridge University Press, Cambridge. 7-28.
- Jequier A.M. (2011b). Sources of semen and basic biochemistry of seminal fluid. Em: *Male Infertility: A Clinical Guide*. 2ª edição. Cambridge University Press, Cambridge. 29-34.
- Jeyendran R.S., Van der Ven H.H., Perez-Pelaez M., Crabo B.G. e Zaneveld L.J. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal Of Reproduction And Fertility*, **70**: 219-228.
- Kalmbach K.H., Antunes D.M.F., Dracxler R.C., Knier T.W., Seth-Smith M.L., Wang F., Liu L. e Keefe D.L. (2013). Telomeres and human reproduction. *Fertility And Sterility*. **99**: 23-29.
- Kashir J., Jones C., Child T., Williams S.A. e Coward K. (2012). Viability assessment for artificial gametes: the need for biomarkers of functional competency. *Biology Of Reproduction*; **87**: 114-125.
- Kierszenbaum A.L. (2000). Fusion of membranes during the acrosome reaction: a tale of two SNAREs. *Molecular Reproduction And Development*, **57**: 309-310.
- Kvist U. e Björndahl L. (eds.). (2002). *Manual on basic semen analysis – ESHRE monographs*. Oxford University Press, Oxford.
- Lane M. e Gardner D.K. (2007). Embryo culture medium: which is the best? *Best Practice & Research Clinical Obstetrics And Gynaecology*, **21**: 83-100.
- Levitas E., Lunenfeld E., Weisz N., Friger M. e Har-Vardi I. (2013). Seasonal variations of human sperm cells among 6455 semen samples: a plausible explanation of a seasonal birth pattern. *American Journal Of Obstetrics & Gynecology*, 1e1-1e6.

- Liu J., Phy J. e Yeomans E. (2012). Theoretic considerations regarding slow cooling and vitrification during cryopreservation. *Theriogenology*, **78**: 1641-1652.
- Lwaleed B.A., Goyal A., Delves G., Gossai S., Greenfield R.S. e Cooper A.J. (2007). Seminal factor VII and factor VIIa: supporting evidence for the presence of an active tissue factor-dependent coagulation pathway in human semen. *International Journal Of Andrology*, **30**: 543-549.
- Marci R., Murisier F., Lo Monte G., Soave I., Chanson A., Urner F. e Germond M. (2013). Clinical outcome after IMSI procedure in an unselected infertile population: a pilot study. *Reproductive Health*, **10**:16.
- Mascarenhas M.N., Flaxman S.R., Boerma T., Vanderpoel S. e Stevens G.A. (2012). National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Medicine*, **9**: e1001356.
- Mendelbaum J. (2000). Oocytes. *Human Reproduction*, **15**: 11-18.
- Miyazaki S. (2006). Thirty years of calcium signals at fertilization. *Seminars In Cell & Developmental Biology*, 233-243.
- Montag M., Köster M., Strowitzki T. e Toth B. (2013). Polar body biopsy. *Fertility And Sterility*, **100**: 603-607.
- Montjean D., Belloc S., Benkhalifa M., Dalleac A. e Ménézo Y. (2012). Sperm vacuoles are linked to capacitation and acrosomal status. *Human Reproduction*, **27**: 2927-2932.
- Mukaida T. e Oka C. (2012). Vitrification of oocytes, embryos and blastocysts. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics And Gynaecology*, **26**: 789-803.
- Nakagawa K., Takahashi C., Nishi Y., Jyuen H., Sugiyama R., Kuribayashi Y. e Sugiyama R. (2012). Hyaluronan-enriched transfer medium improves outcome in patients with multiple embryo transfer failures. *Journal Of Assisted Reproduction And Genetics*, **29**: 679-685.
- Nastri C.O., Ferriani R.A., Raine-Fenning N. e Martins W.P. (2013). Endometrial injury performed in the non-transfer cycle and assisted reproduction outcomes: a randomized controlled trial. doi: 10.1002/uog.12539
- Ng K.K., Donat R., Chan L., Lalak A., Di Pierro I. e Handelsman D.J. (2004). Sperm output at older men. *Human Reproduction*, **19**: 1811-1815.
- Nicoli A., Capodanno F., Rondini I., Valli B., Villani M.T., Morini D., De Pascalis L., Palomba S. e La Sala G.B. (2013). Pronuclear morphology evaluation in in vitro

- fertilization (IVF) / intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycles: a retrospective clinical review. *Journal Of Ovarian Research*, doi: 10.1186/1757-2215-6-1.
- Nomikos M., Swann K. e Lai F.A. (2011). Starting a new life: sperm PLC-zeta mobilites the Ca<sup>2+</sup> signal that induces egg activation and embryo development: an essencial phospholipase C with implications for male infertility. *Bioessays*, **34**: 126-134.
- Palermo G.D., Neri Q.V., Monahan D., Takeuchi T., Schlegel P.N. e Rosenwaks Z. (2012). Intracytoplasmic Sperm Injection. Em: *Practical Manual of In Vitro Fertilization – Advanced Methods and Novel Devices*. Springer, New York. 307-308.
- Papale L., Fiorentino A., Montag M. e Tomasi G. (2012). The zygote. *Human Reproduction*, **27**: 122-149.
- Parikh F.R., Nadkarni S.G., Naik N.J., Naik D.J. e Uttamchandani S.A. (2006). Cumulus coculture and cumulus-aided embryo transfer increases pregnancy rates in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertility And Sterility*, **86**: 839-847.
- Parikh F.R., Naik N.J., Naik D.J. e Kulkarni D. (2012). Cumulus-Aided Embryo Transfer. Em: *Practical Manual of In Vitro Fertilization – Advanced Methods and Novel Devices*. Springer, New York. 575-576.
- Pearlman A., Loke J., Le Caignec C., White S., Chin L., Friedman A., Warr N., Willan J., Brauer D., Farmer C., Brooks E., Oddoux C., Riley B., Shajahan S., Camerino G., Homfray T., Crosby A.H., Couper J., David A., Greenfield A., Sinclair A. e Ostrer H. (2010). Mutations in MAP3K1 cause 46,XY disorders of sex development and implicate a common signal transduction pathway in human testis determination. *American Journal Of Human Genetics*, doi: 10.1016/j.ajhg.2010.11.003.
- Potdar N., Gelbaya T. e Nardo L.G. (2012). Endometrial injury to overcome recurrent embryo implantation failure: a systematic review and meta-analysis. *Reproductive Biomedicine Online*, **25**: 561-571.
- Pound N., Javed M.H., Ruberto C., Shaikh M.A. e Del Valle A.P. (2002). Duration of sexual arousal predicts semen parameters for masturbatory ejaculates. *Physiology and Behaviour*, **76**: 685-689.
- Prados F.J., Debrock S., Lemmen J.G. e Agerholm I. (2012). The cleavage stage embryo. *Human Reproduction*, **27**: i50-i71.
- Priehl G., van der Ven H. e Krebs D. (2000). Artificial Intrauterine Insemination: Noninvasive Management of Subfertile Couples. Em: *Manual on Assisted Reproduction*. 2ª edição. Rabe T., Diedrich K. e Strowitzki T. (eds.). Springer, Berlim. 601-656.

- Rienzi L., Balaban B., Ebner T. e Mandelbaum J. (2012). The oocyte. *Human Reproduction*, **27**: i2-i21.
- Roca J., Martinez-Alborcia M.J., Gil M.A., Parrilla I. e Martinez E.A. (2013). Dead spermatozoa in raw semen samples impair in vitro fertilization outcomes of frozen-thawed spermatozoa. *Fertility And Sterility*, doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.05.020.
- Salamonsen L.A., Shuster S. e Stern R. (2001). Distribution of hyaluronan in human endometrium across the menstrual cycle – Implications for implantation and menstruation. *Cell And Tissue Research*, **306**: 335-340.
- Sathananthan A.H. (2013). Ultrastructure of human gametes, fertilization and embryos in assisted reproduction: a personal survey. *Micron*, **44**: 1-20.
- Sato T., Katagiri K., Gohbara A., Inoue K., Ogonuki N., Ogura A., Kubota Y. e Ogawa T. (2011). In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature*, **471**: 504-507.
- Scott L. (2003). Pronuclear scoring as a predictor of embryo development. *Reproductive Biomedicine Online*, **6**: 201-214.
- Scott L., Alvero R., Leondires M. e Miller B. (2000). The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Human Reproduction*, **15**: 2394-2403.
- Seandel M. e Rafii S. (2011). Reproductive biology: In vitro sperm maturation. *Nature*, **471**: 453-455.
- Sekido R. e Lovell-Badge R. (2008). Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature*, **453**: 930-934.
- Setti A.S., Braga D.P.A.F., Iaconelli A.Jr., Aoki T. e Borges E.Jr. (2013). Twelve years of MSOME and IMSI: a review. *Reproductive Biomedicine Online*, doi: 10.1016/j.rbmo.2013.06.011.
- Shalet S.M. (2009). Normal testicular function and spermatogenesis. *Pediatric Blood And Cancer*, **53**: 285-288.
- Signorelli J., Diaz E.S. e Morales P. (2012). Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation. *Cell And Tissue Research*; **349**: 765-782.
- Suarez S.S. e Pacey A.A. (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Human Reproduction Update*; **12**: 23-37.
- Sun F., Bahat A., Gakamsky A., Girsh E., Katz N., Giojalas L.C., Tur-Kaspa I. e Eisenbach M. (2005). Human sperm chemotaxis: both the oocyte and its

- surrounding cumulus cells secrete sperm chemoattractants. *Human Reproduction*, **20**: 761-767
- Terada Y., Schatten G., Hasegawa H. e Yaegashi N. (2010). Essential roles of the sperm centrosome in human fertilization: developing the therapy for fertilization failure due to sperm centrosomal dysfunction. *The Tohoku Journal Of Experimental Medicine*, **220**: 247-258.
- Upadhyay R.D., Kumar A.V., Ganeshan M. e Balasinor N.H. (2012). Tubulobulbar complex: cytoskeletal remodeling to release spermatozoa. *Reproductive Biology And Endocrinology*, doi:10.1186/1477-7827-10-27.
- Uyar A., Torrealday S. e Seli E. (2013). Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertility And Sterility*, **99**: 979-997.
- Valojerdi M.R., Karimian L., Yazdi P.E., Gilani M.A., Madani T. e Baghestani A.R. (2006). Efficacy of a human embryo transfer medium: a prospective, randomized clinical trial study. *Journal Of Assisted Reproduction And Genetics*, **23**: 207-212.
- WHO. (2010). *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*. 5ª edição. WHO Press, Geneva.
- Wilding M., Coppola G., di Matteo L., Palagiano A., Fusco E. e Dale B. (2011). Intracytoplasmic injection of morphologically selected spermatozoa (IMSI) improves outcome after assisted reproduction by deselecting physiologically poor quality spermatozoa. *Journal Of Assisted Reproduction And Genetics*, **28**: 253-262.
- Wolpert L., Beddington R., Jessel T., Lawrence P., Meyerowitz E. e Smith J (eds). (2007). Development of germ cells. Em: *Principles of development*. 2ª edição. Oxford University Press, Oxford. 422-431.
- Yoshida M. e Yoshida K. (2011). Sperm chemotaxis and regulation of flagellar movement by  $Ca^{2+}$ . *Molecular Human Reproduction*; **17**: 457-465.
- Zegers-Hochschild F., Adamson G.D., de Mouzon J., Ishihara O., Mansour R., Nygren K., Sullivan E. e van der Poel S. (2009). The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Human Reproduction*, **24**: 2683-2687.