

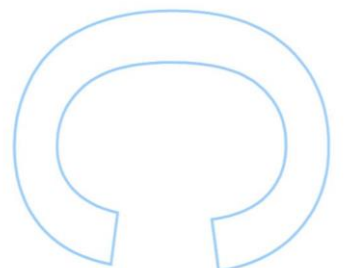
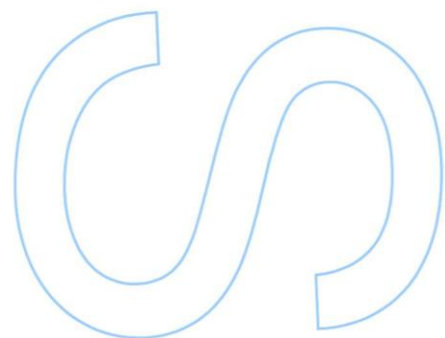
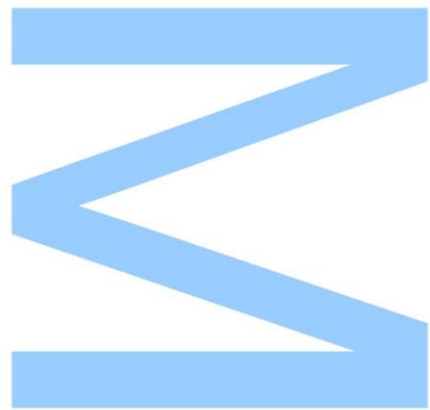


Relatório de Estágio: o Laboratório de Reprodução Humana Assistida

Ana Margarida dos Santos Silva
Mestrado em Biologia Celular e Molecular
Departamento de Biologia
2014

Orientador

Vasco Martins de Almeida, Professor Auxiliar,
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

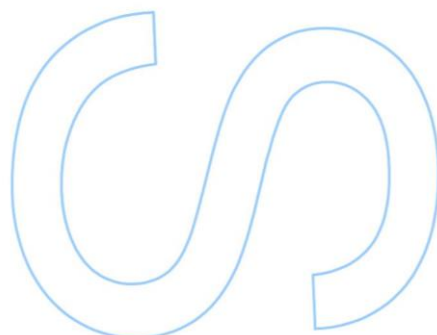
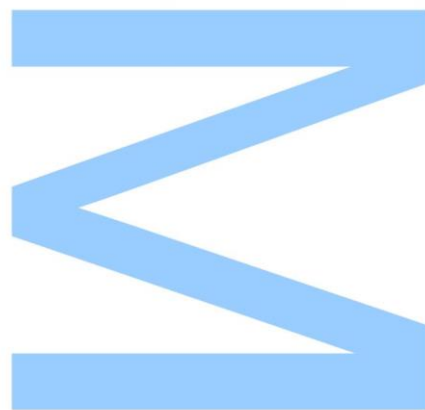




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Em primeiro lugar gostava de agradecer ao Professor Vasco Almeida pela oportunidade de estagiar no Centro de Estudos de Infertilidade e Esterilidade e pela disponibilidade de orientar este estágio;

Agradeço também à equipa do CEIE, ao Doutor Jorge Braga e ao Doutor Joaquim Gonçalves pela oportunidade e simpatia, assim como à Cristina pela boa disposição e carinho demonstrados;

Um especial agradecimento à Dra. Isabel Damião, por todos os conhecimentos partilhados, pela companhia e pela disponibilidade ao longo destes 10 meses.

Resumo

A infertilidade é definida pela ausência de concepção ao fim de 12 meses de relações sexuais regulares e desprotegidas. É considerada uma doença e afeta um número significativo de casais em todo o mundo. O método principal de tratamento é a reprodução humana assistida, na qual estão incluídas as técnicas de inseminação intrauterina, fertilização *in vitro* e microinjeção intracitoplasmática de espermatozoides, entre outras. Estas envolvem procedimentos protocolados e bem estabelecidos, cujo objetivo final é o nascimento de um recém-nascido saudável.

As causas de infertilidade podem ser de origem não patológica (como a idade materna avançada ou a frequência das relações sexuais), patológica (fatores masculinos, femininos ou infertilidade inexplicada) ou relacionadas com o estilo de vida.

A avaliação do casal infértil passa pelo conhecimento da sua história reprodutiva (individual e conjunta), da sua sexualidade e de possíveis fatores de risco. Depois de diagnosticado o fator de infertilidade, o médico recomenda a técnica de reprodução humana assistida mais adequada. Qualquer ciclo de tratamento envolve a estimulação ovárica e o tratamento da amostra seminal. Técnicas mais complexas, como a fertilização *in vitro* e a microinjeção intracitoplasmática de espermatozoides compreendem a punção folicular, a fertilização dos ovócitos fora do útero, a cultura de embriões e a sua transferência.

A transferência de embriões é o último passo de um ciclo de tratamento. É escolhido o melhor embrião para transferir e os restantes de boa qualidade, quando aplicável, são vitrificados. Mais tarde, esses embriões criopreservados poderão ser transferidos num novo ciclo.

Em casos de risco de transmissão de uma doença hereditária de origem genética ou cromossómica, é aconselhada a realização do diagnóstico genético pré-implantação. Este consiste na biópsia de um ou dois blastómeros de embriões com 8 a 12 células e posterior análise genética através de técnicas de FISH ou PCR. Apenas os embriões que não possuam a anomalia são considerados para transferir.

Poderão também comparecer na consulta de reprodução humana assistida casais que não possuam gâmetas de qualidade ou que não produzam gâmetas de todo. Estes poderão recorrer a tratamentos com doação de gâmetas masculinos ou femininos. Também pacientes infetados com doenças crónicas virais têm a possibilidade de recorrer às técnicas de reprodução humana assistida para realizarem o seu desejo de terem um filho biológico sem infetarem o parceiro.

A área da reprodução humana assistida está em constante evolução, tentando oferecer os tratamentos mais adequados e com as melhores taxas de sucesso possível aos casais que tanto anseiam por um recém-nascido. A meta é, e sempre será, o nascimento e o desenvolvimento de uma criança saudável.

Palavras-chave: infertilidade; reprodução humana assistida; FIV; ICSI; gâmetas masculinos e femininos; embriões; criopreservação; DGPI; doação de gâmetas

Abstract

The definition of infertility is the absence of conception after 12 months of regular and unprotected intercourse. It is considered a disease and it affects a significant number of couples around the world. The most appropriate treatment is to apply assisted human reproduction techniques, which include intrauterine insemination, *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection. These procedures comprise complex and well-established protocols whose ultimate goal is the delivery of a healthy baby.

The reasons for an infertility scenario can be of non-pathological origin (advanced maternal age or intercourse frequency), pathological origin (female or male factors and unexplained infertility) or life style related.

To evaluate the infertile couple, the doctor needs to know about their reproductive history (individual and combined), their sexuality and possible risk factors. After the determination of the infertility cause, the doctor indicates the best option available. Every single treatment cycle consists of an ovarian stimulation and the semen processing. *In vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection, which are more complex, includes oocyte retrieval, oocyte insemination outside the uterus, embryo culture and its transfer.

The embryo transfer is the last step on a treatment cycle. The best embryo is selected for transfer and if there are good morphology embryos remaining, they are vitrified. These embryos can be transferred to the uterus after thawed in a new cycle of treatment.

In situations of risk of transmitting an inherited disease of genetic or chromosomal origin, the couple is advised to do the preimplantation genetic diagnosis. It involves the removal of one or two blastomeres from embryos with 8 or 12 cells and subsequent genetic analysis by PCR or FISH techniques. Only the embryos that were negative for the inherited disease are considered for transfer.

Couples that have bad quality gametes or do not produce them at all may attend in the human assisted reproduction centre. They are recommended to enter on a treatment cycle with female or male donor gametes. Also viral chronic disease infected couples have the possibility to perform assisted reproduction techniques to accomplish their wish of having their own child without infecting the partner.

The field of human assisted reproduction is in permanent evolution, trying to offer the most suitable treatments and the best possible results to whom wishing so much an infant. The ultimate aim will always be the birth and development of a healthy child.

Keywords: infertility; human assisted reproduction; IVF; ICSI; male and female gametes; embryos; cryopreservation; preimplantation genetic diagnosis; gamete donation

Índice

Agradecimentos	3
Resumo	4
Abstract	6
Lista de abreviaturas.....	11
Lista de figuras	14
Lista de tabelas.....	19
Lista de gráficos	21
Lista de Esquemas	22
1. A infertilidade	23
1.1. Definições	23
1.2. Prevalência	23
1.3. Tratamento.....	24
1.4. Primeira consulta de RHA	26
1.5. Fatores de infertilidade	26
1.5.1. Fatores não patológicos	26
1.5.2. Fatores patológicos	28
1.5.3. Estilos de vida.....	32
2. O laboratório de andrologia.....	34
2.1. Espermograma (análise citobioquímica do sémen).....	34
2.1.1. Recolha da amostra	34
2.1.2. Análise da amostra.....	36
2.1.2.1. Parâmetros macroscópicos	36
2.1.2.2. Parâmetros microscópicos.....	36
2.1.3. Valores de referência e terminologia	48
2.1.4. Software CASA.....	49
2.2. Métodos de recolha de espermatozoides para utilização em técnicas de RHA	50

2.2.1.	Biópsia testicular	52
2.3.	<i>Preparação da amostra de sémen para técnicas de RHA</i>	53
2.4.	<i>A inseminação intrauterina</i>	55
3.	O laboratório de embriologia.....	56
3.1.	<i>A estimulação ovárica e a punção folicular</i>	56
3.2.	<i>Avaliação da maturidade ovocitária</i>	59
3.3.	<i>A fertilização in vitro</i>	59
3.4.	<i>A microinjeção intracitoplasmática de espermatozoides</i>	61
3.5.	<i>Avaliação da maturidade e da qualidade ovocitária</i>	65
3.5.1.	Anomalias extracitoplasmáticas	67
3.5.2.	Anomalias intracitoplasmáticas	67
3.5.3.	Anomalias de número, forma e tamanho	68
3.5.4.	Partenogénese	68
3.6.	<i>Avaliação da fertilização e do desenvolvimento embrionário</i>	69
3.7.	<i>Transferência de embriões</i>	76
3.7.1.	Eclosão assistida	77
3.7.2.	Quando realizar a transferência embrionária?	78
3.7.3.	Como escolher o melhor embrião?	80
3.7.4.	As gravidezes múltiplas. Como evitar?	81
3.7.4.1.	Os números europeus referentes a 2009	82
3.7.4.2.	Riscos associados.....	83
3.7.4.3.	Custos associados	84
3.7.4.4.	Como diminuir o número das gestações múltiplas.....	85
4.	Diagnóstico genético pré-implantação	88
5.	Criopreservação de embriões	91
6.	Criopreservação de gâmetas masculinos e femininos	92
7.	Doação de gâmetas masculinos e femininos	94
8.	Doenças crónicas virais	96
8.1.	<i>A síndrome da imunodeficiência adquirida</i>	96

8.2. Vírus da hepatite C	97
Notas finais	98
Referências bibliográficas.....	99
Anexos.....	115
Apêndice.....	116

Lista de abreviaturas

°C – grau Celsius

µL – microlitros

µm – micrómetros

ADN – ácido desoxirribonucleico

AREL – Agregados de retículo endoplasmático liso tubular

ASRM – American Society of Reproductive Medicine

CASA – Computer Assisted Sperm Analysis

CC – citrato de clomifeno

CCCO – complexo cumulus-corona-ovócito

CEIE – Centro de Estudos de Infertilidade e Esterilidade

CNPMA – Conselho Nacional de Procriação Medicamente Assistida

CO₂ – dióxido de carbono

CPN – corpos precursores dos nucléolos

DCV – doenças crónicas virais

DGPI – diagnóstico genético pré-implantação

DPC – discinesia primária ciliar

EA – eclosão assistida

Eeva – early embryo viability assessment

eSET – transferência de um único embrião (elective single embryo transfer)

ESHRE – European Society of Human Reproduction and Embryology

Ez – espermatozoides

FISH – hibridização *in situ* com sondas fluorescentes

FIV – fertilização *in vitro*

FSH – hormona folículo-estimulante

GnRH – fator libertador das gonadotrofinas

GP – glóbulo polar

hCG – gonadotrofina coriônica humana

HFEA – Human Fertilization and Embryology Authority

HMG – gonadotropina humana menopausal

HOS – teste de hipoosmolaridade

ICSI – microinjecção intracitoplasmática de espermatozoides

IUI – inseminação intrauterina

IMSI – injeção intracitoplasmática de espermatozoides em elevada ampliação

LED – light emitting diode

LH – hormona lúteo-estimulante

LR – limite de referência

MCI – massa celular interna

MESA – aspiração de espermatozoides do epidídimo por microcirurgia

MI – metafase I

MII – metafase II

min – minutos

mL – mililitro

mm – milímetro

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

NaHCO₃ – bicarbonato de sódio

Nº – número

O₂ – oxigénio

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – reação em cadeia da polimerase

PESA – aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo

PL – progressivos lentos

PN – pronúcleo

PR – progressivos rápidos

RHA – reprodução humana assistida

rpm – rotações por minuto

SHO – síndrome de hiperestimulação ovárica

SIDA – síndrome da imunodeficiência adquirida

SOP – síndrome do ovário poliquístico

TESA – aspiração de espermatozoides do testículo

TESE – biópsia testicular

UCIN – unidade de cuidados intensivos neonatais

VG – vesícula germinativa

VHB – vírus da hepatite B

VHC – vírus da hepatite C

VIH – vírus da imunodeficiência humana

Lista de figuras

Figura 1 – Amostra ainda não liquefeita visualizada ao microscópio ótico.

Figura 2 – Amostra liquefeita visualizada ao microscópio ótico.

Figura 3 – Realização do esfregaço da preparação de eosina Y com espermatozoides para visualização ao microscópio.

Figura 4 – Esfregaço pronto para ser visualizado ao microscópio.

Figura 5 – Visualização do esfregaço para avaliar a vitalidade de uma amostra seminal. É possível observar espermatozoides vivos (a verde, rodeados por um círculo) e mortos (vermelhos, delimitados por um quadrado).

Figura 6 – Esquematização de espermatozoides submetidos ao HOS, apresentando diferentes tipos de alterações na cauda. **A** – espermatozoide sem alterações na cauda; **B-E** – espermatozoides com alterações na cauda. As áreas a cinzento são indicadoras de turgescência. Imagens obtidas de World Health Organization (2010).

Figura 7 – Visualização de espermatozoides após incubação com a solução hipoosmótica. Espermatozoides com a cauda enrolada (possuem a membrana intacta) estão rodeados por um círculo azul; espermatozoides com a cauda não enrolada (possuem algum defeito na sua membrana) estão delimitados por um quadrado vermelho.

Figura 8 – Câmara de Neubauer improved (Marienfeld®, Alemanha).

Figura 9 – Área de contagem central da câmara de Neubauer improved. É constituída por 25 quadrados, cada um subdividido em 16.

Figura 10 – Quadrado central da área de contagem, onde é possível ver a subdivisão em 16 quadrados.

Figura 11 – Espermatozoide normal.

Figura 12 – Métodos de recolha de espermatozoides para aplicação em técnicas de RHA. TESA – aspiração de espermatozoides do testículo; MESA – aspiração de espermatozoides do epidídimo por microcirurgia; PESA – aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo. Adaptado de Bourne *et al.* (2009).

Figura 13 – Visualização do conteúdo dos túbulos seminíferos após TESE, onde são visíveis glóbulos vermelhos (círculos) e alguns espermatozoides (setas). A fotografia é propriedade do Centro de Estudos de Infertilidade e Esterilidade (CEIE) e foi reproduzida com permissão.

Figura 14 – Amostra seminal após centrifugação, sendo visíveis os diferentes constituintes separados.

Figura 15 – Amostra preparada para o *swim-up*, onde é visível o *pellet*.

Figura 16 – Amostra em incubação na estufa durante o *swim-up*.

Figura 17 – Punção folicular.

Figura 18 – Vista ecográfica de um ovário com vários folículos prontos a serem aspirados. Cada formação preta é um folículo (circundado a azul).

Figura 19 – Ovócito imaturo com as células da corona e do cumulus compactas e contraídas. Imagem retirada de Rienzi *et al.* (2012).

Figura 20 – Células do cumulus e da corona bem expandidas, denunciando um ovócito maduro. A fotografia é propriedade do CEIE e foi reproduzida com permissão.

Figura 21 – Ovócito no dia seguinte à realização da FIV, onde é possível ver que as células da corona e do cumulus já se encontram desprendidas do ovócito, por ação de enzimas libertadas pelos espermatozoides. A fotografia é propriedade do CEIE e foi reproduzida com permissão.

Figura 22 – Microscópio invertido para micromanipulação de gâmetas e embriões. Este equipamento é propriedade do CEIE e foi reproduzido com permissão.

Figura 23 – Micropipetas de vidro montadas no microscópio invertido. Estas são utilizadas na micromanipulação de gâmetas e embriões. Este equipamento é propriedade do CEIE e foi reproduzido com permissão.

Figura 24 – Micromanipuladores do microscópio invertido, através dos quais é possível movimentar as micropipetas e aspirar ou rejeitar meio de cultura. Este equipamento é propriedade do CEIE e foi reproduzido com permissão.

Figura 25 – Estereomicroscópio. Este equipamento é propriedade do CEIE e foi reproduzido com permissão.

Figura 26 – Bancada aquecida (zona mais clara) junto ao estereomicroscópio, com controlo da atmosfera (comandos de controlo da temperatura, luz e ventilação no plano mais próximo da imagem). Este equipamento é propriedade do CEIE e foi reproduzido com permissão.

Figura 27 – Espermatozoides móveis no meio ICSI™ (Vitrolife, Suécia; meio viscoso que não permite uma motilidade tão acelerada) a serem selecionados morfológicamente e aspirados para a pipeta de ICSI.

Figura 28 – Após a seleção dos melhores espermatozoides, é necessário proceder ao esmagamento da cauda (com a pipeta de ICSI), de modo a facilitar a sua manipulação e a descondensação do núcleo e, também, para que não altere a estrutura do ovócito após a introdução no citoplasma (Palermo *et al.*, 1996).

Figura 29 – Microinjeção do ovócito. Este está a ser segurado pela pipeta holding e a pipeta ICSI, com o espermatozoide no seu interior, encontra-se prestes a perfurar o ovócito.

Figura 30 – Microinjeção do ovócito, onde a pipeta de ICSI já está dentro deste. É necessário ocorrer aspiração de algum citoplasma para envolver o espermatozoide e para garantir que a membrana citoplasmática do ovócito foi rompida (Zulategui *et al.*, 2008).

Figura 31 – Ovócito em VG (seta indica a vesícula germinativa). Imagem retirada de Rienzi *et al.* (2012).

Figura 32 – Ovócito em MI, pela ausência de VG e do primeiro GP. Imagem retirada de Rienzi *et al.* (2012).

Figura 33 – Ovócito em MII, pela ausência de VG e pela presença do primeiro GP no espaço perivitelino. Imagem retirada de Rienzi *et al.* (2012).

Figura 34 – Ovócito atrésico, apresentando um citoplasma escuro e retraído.

Figura 35 – ovócito com zona pelúcida muito espessa e densa.

Figura 36 – Ovócito com espaço perivitelino aumentado. Imagem retirada de Rienzi *et al.* (2012).

Figura 37 – Ovócito com o primeiro GP muito grande. Imagem retirada de Rienzi *et al.* (2012).

Figura 38 – Ovócito com o citoplasma homogéneo, como é esperado. Imagem retirada de Rienzi *et al.* (2012).

Figura 39 – Ovócito com o citoplasma ligeiramente mais granuloso do que o expectável. Imagem retirada de Rienzi *et al.* (2012).

Figura 40 – Ovócito com um corpo refrátil de grandes dimensões. Imagem retirada de Rienzi *et al.* (2012).

Figura 41 – Ovócito com AREL. Imagem retirada de Rienzi *et al.* (2012).

Figura 42 – Ovócito vacuolado. Imagem retirada de Rienzi *et al.* (2012).

Figura 43 – Ovócito normal (esquerda) ao lado de um ovócito gigante (direita). Imagem retirada de Rienzi *et al.* (2012).

Figura 44 – Partenogénese de ovócito. A fotografia é propriedade do CEIE e foi reproduzida com permissão.

Figura 45 – Pré-zigoto com 2 PN (assinalados pelas setas) e 2 GP (circundados). A fotografia é propriedade do CEIE e foi reproduzida com permissão.

Figura 46 – Pré-zigoto com halo, região cortical inferior, facilmente distinguível da granulosidade do resto do citoplasma (assinalado pela seta). A fotografia é propriedade do CEIE e foi reproduzida com permissão.

Figura 47 – Pré-zigoto após ICSI com 1 PN e 2 GP. Imagem retirada de Papale *et al.* (2012).

Figura 48 – Pré-zigoto com 3 PN (assinalados pelas setas) e 2 GP (circundados). A fotografia é propriedade do CEIE e foi reproduzida com permissão.

Figura 49 – Embrião com 6 células resultante de um pré-zigoto com 3 PN. A fotografia é propriedade do CEIE e foi reproduzida com permissão.

Figura 50 – Embrião durante a sua primeira mitose, prestes a dividir-se em duas células. A fotografia é propriedade do CEIE e foi reproduzida com permissão.

Figura 51 – Embrião com duas células. A fotografia é propriedade do CEIE e foi reproduzida com permissão.

Figura 52 – Embrião ideal de segundo dia com 4 células. A fotografia é propriedade do CEIE e foi reproduzida com permissão.

Figura 53 – Embrião ideal de terceiro dia com 8 células. A fotografia é propriedade do CEIE e foi reproduzida com permissão.

Figura 54 – Embrião com 4 ou 5 células e elevada percentagem de fragmentação. A fotografia é propriedade do CEIE e foi reproduzida com permissão.

Figura 55 – Embrião com 8 células e baixa percentagem de fragmentação. A fotografia é propriedade do CEIE e foi reproduzida com permissão.

Figura 56 – Embrião em fase de mórula, ideal de quarto dia. A fotografia é propriedade do CEIE e foi reproduzida com permissão.

Figura 57 – Blastocisto bem expandido, com a MCI proeminente e a trofoectoderme bem definida. A fotografia é propriedade do CEIE e foi reproduzida com permissão.

Figura 58 – Transferência de embriões. **A** – aspiração dos embriões da placa de cultura para o cateter de transferência; **B** - cateter inserido no útero; **C** – visualização ecográfica do cateter (circundado a azul); **D** – deposição dos embriões no útero, durante a qual é visível uma pequena gota brilhante na ponta do cateter, através do controlo ecográfico.

Lista de tabelas

Tabela 1 – Contagem do número de espermatozoides de acordo com as 4 categorias de motilidade de uma amostra de sémen. Ez – espermatozoides.

Tabela 2 – De acordo com o número de espermatozoides estimado por campo de visão numa ampliação de 400x, realiza-se a diluição da amostra para carregar a câmara de contagem. Adaptado de NAFA & ESHRE-SIGA (2002).

Tabela 3 – Relação entre o número de espermatozoides contados no primeiro quadrado da área de contagem e o número consequente de quadrados a considerar. Adaptado de NAFA & ESHRE-SIGA (2002).

Tabela 4 – Tabela dos fatores de conversão a utilizar consoante o número de quadrados que foram contabilizados e a diluição realizada. Adaptado de NAFA & ESHRE-SIGA (2002).

Tabela 5 – Ilustrações de espermatozoides anómalos e normais, de acordo com cada grupo de anomalia. Adaptado de World Health Organization (2010) e de Silverberg & Turner (2009).

Tabela 6 – Limites de referência para o espermograma. PR – progressivos rápidos; PL – progressivos lentos. Adaptado World Health Organization (2010).

Tabela 7 – Terminologia comumente utilizada para diagnosticar os pacientes subférteis ou inférteis. Ez – espermatozoides; LR – limite de referência. Adaptado de Jeyendran (2003) e de World Health Organization (2010).

Tabela 8 – Classificação da anovulação em vários grupos. ↓ - concentração baixa; → - concentração normal; ↑ - concentração elevada. Adaptado de Sampaio *et al.* (2012).

Tabela 9 – Classificação dos PN dos pré-zigotos de acordo com os consensos de Istambul. Adaptado de Alpha Scientists in Reproductive Medicine & ESHRE Special Interest Group of Embryology (2011).

Tabela 10 – Comparação entre os custos dos diferentes tipos de partos e internamentos. O custo foi calculado pela média de diferentes dias de internamento, por recém-nascido. O preço (em dólares) corresponde aos procedimentos associados,

assim como aos custos dos cuidados. * Parto múltiplo corresponde ao nascimento de 3 ou mais recém-nascidos. Adaptado de Medical Advisory Secretariat (2006).

Tabela 11 – Comparação entre os diferentes tipos de biópsia que se pode realizar durante o DGPI. Adaptado de Harton *et al.*, (2011).

Lista de gráficos

Gráfico 1 – Percentagem de nascimentos resultantes de técnicas de RHA relativamente aos nascimentos nacionais de vários países europeus. Adaptado de Ferraretti et al. (2013).

Gráfico 2 – Variação da fertilidade feminina em função da idade. A fertilidade feminina é aqui definida pela taxa de partos por ano por cada 1000 mulheres sexualmente ativas e que não usam métodos contraceptivos. É notável o declínio que ocorre com o avançar da idade, especialmente após os 35 anos. Adaptado de Sobral et al. (2012).

Gráfico 3 – Principais causas de infertilidade que afetam os casais. Adaptado de Bayer et al. (2002).

Gráfico 4 – Prevalência das causas de infertilidade masculina. Adaptado de Poongothai et al. (2009).

Gráfico 5 – Número de embriões transferidos em ciclos de FIV e ICSI entre 2007 e 2009. Adaptado de Ferraretti et al. (2013).

Gráfico 6 – Partos gemelares ou triplos após ciclos de FIV e ICSI entre 2007 e 2009 na Europa. Adaptado de Ferraretti et al. (2013).

Gráfico 7 – Duração da gestação consoante o tipo de parto. Dados referentes ao ano de 2009. Adaptado de Ferraretti et al. (2013).

Lista de Esquemas

Esquema 1 – Aglutinação e outro tipo de células que poderão estar presentes numa amostra seminal, visíveis ao microscópio ótico. Adaptado de Jeyendran (2003) e de Menkveld *et al.* (2001).

Esquema 2 – Métodos cirúrgicos de obtenção de espermatozoides diretamente do epidídimo ou do testículo. Adaptado de Mansour (1998) e Esteves & Varghese (2012).

Esquema 3 – Sistema de classificação de embriões em fase de clivagem (desde a fertilização até ao 3º dia) definido pelos consensos de Istambul (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

Esquema 4 – Sistema de classificação de embriões ao quarto dia de desenvolvimento definido pelos consensos de Istambul (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

Esquema 5 – Sistema de classificação de embriões ao quinto dia de desenvolvimento definido pelos consensos de Istambul (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

1. A infertilidade

1.1. Definições

A fertilidade é definida pela capacidade de dar à luz um recém-nascido vivo (Brugo-Olmedo *et al.*, 2001). Já a fecundabilidade é a taxa de concepção de uma população num determinado período de tempo. Esta, num casal saudável e em idade reprodutora, ronda os 20% em cada período fértil, sendo cumulativa ao longo dos meses (Brugo-Olmedo *et al.*, 2001). Deste modo, é esperado que ao fim de um ano cerca de 86 a 94% dos casais consigam alcançar uma gravidez (Bayer *et al.*, 2002). Só ao fim de 12 meses de relações sexuais regulares e desprotegidas sem que o casal conceba, é considerada a existência de uma doença denominada infertilidade (The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2008). Contudo, é recomendável recorrer a ajuda médica antes desse tempo quando o elemento feminino do casal tenha mais de 35 anos (The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2008) (quanto mais cedo for realizado um tratamento, maiores são as probabilidades de sucesso) ou na presença de fatores de risco, como o estilo de vida.

Para além da infertilidade, existe outro conceito que é necessário diferenciar. A esterilidade é definida, de acordo com Brinsden *et al.* (1998), pela “inabilidade de ocorrer uma gravidez devido à ausência ou perda da função das gónadas ou de outros órgãos genitais”. Ou seja, enquanto pacientes inférteis poderão ter filhos biológicos recorrendo a tratamentos de reprodução humana assistida (RHA), os pacientes estéreis não o conseguem. Poderão ter um filho, mas apenas recorrendo a gametas de dador.

A infertilidade pode ser classificada como primária, caso nenhum membro do casal tenha alguma vez alcançado uma gravidez, ou secundária, o que pressupõe que um dos parceiros já tenha concebido, mesmo que tenha sido uma gravidez ectópica ou que tenha resultado num aborto espontâneo (Mascarenhas *et al.*, 2012).

1.2. Prevalência

A prevalência a nível mundial da infertilidade carece de consenso, sendo publicada uma grande variedade de valores e conceitos, entre as quais:

- 60 a 80 milhões de casais sofrem de infertilidade todos os anos (Poongothai *et al.*, 2009);
- Em 2010 foi estimado que cerca de 48,5 milhões de casais em todo o mundo eram inférteis (Mascarenhas *et al.*, 2012);
- 8 a 16% dos casais em idade reprodutiva são afetados pela infertilidade (Medical Advisory Secretariat, 2006);
- Cerca de 1 em cada 5 a 1 em cada 6 casais em idade reprodutiva são afetados pela infertilidade (Brugo-Olmedo *et al.*, 2001);
- 1 em cada 7 casais dos países industrializados são afetados pela infertilidade (Templeton, 2000).

A investigação sobre a prevalência da infertilidade é influenciada pela metodologia de avaliação, pelo critério empregue para determinar o diagnóstico e pelas distintas definições e terminologias usadas pelos vários autores (Silva-Carvalho and Santos, 2009). Em Portugal, a prevalência da infertilidade ao longo da vida estima-se ser entre 9 e 10%, não se verificando diferenças regionais (Silva-Carvalho and Santos, 2009). O mesmo estudo afirma também que cerca de 266.088 a 292.996 mulheres (membros de casais) experienciam a infertilidade ao longo da vida e que 116.630 a 121.059 se encontram em idade reprodutora.

1.3. Tratamento

Segundo Allen *et al.* (2006), as técnicas de RHA são o método de eleição para o tratamento da infertilidade e compreendem a manipulação dos gâmetas masculinos e/ou femininos fora do corpo humano. Dessas técnicas fazem parte a inseminação intrauterina (IIU), a fertilização *in vitro* (FIV), a microinjeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), a transferência de embriões a fresco ou criopreservados, a criopreservação de embriões e gâmetas e os ciclos de tratamento com gâmetas de dadores. Em Portugal, a IIU e a FIV foram introduzidas em 1985 e a ICSI em 1994 (Teles, 2011).

No gráfico 1 é possível verificar a contribuição das técnicas de RHA para a taxa de natalidade em vários países europeus. Contudo, nem todos os tratamentos de RHA são sinónimos de uma gravidez bem-sucedida. Na Europa no ano de 2009, a taxa de gravidez clínica por transferência foi de 32,9% em ciclo de FIV e de 32,0% em ciclos de ICSI (Ferraretti *et al.*, 2013).

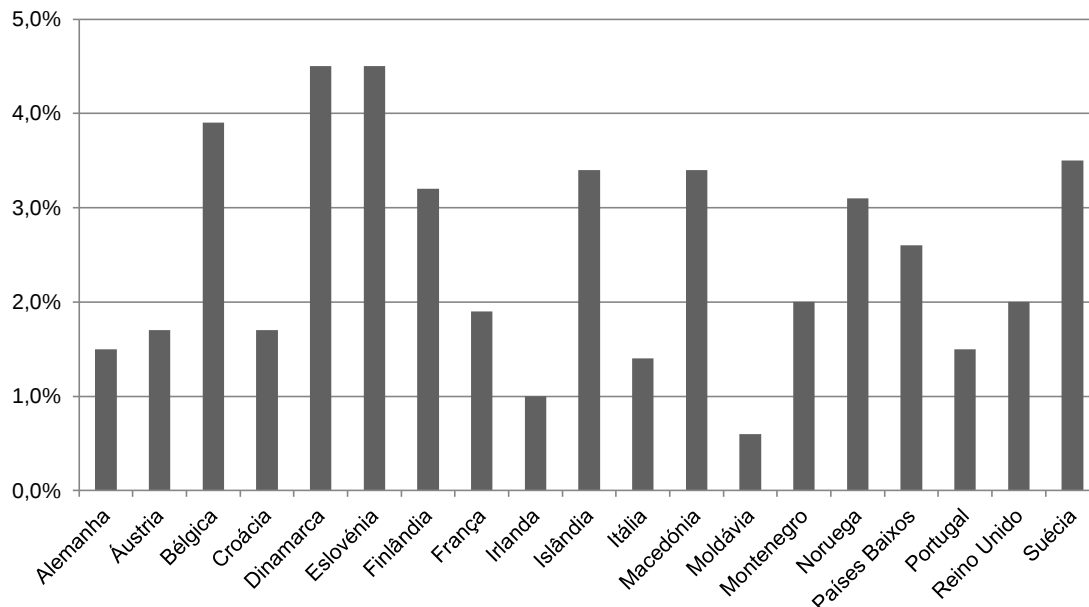


Gráfico 1 – Percentagem de nascimentos resultantes de técnicas de RHA relativamente aos nascimentos nacionais de vários países europeus. Adaptado de Ferraretti *et al.* (2013).

Para além do facto do casal precisar de admitir que poderá necessitar de ajuda para conceber, ao realizar o tratamento não é garantido o seu sucesso. Existem também um sem número de situações e informações a que o casal está exposto e que precisam de ser bem geridas entre ambos, de modo a causar o mínimo de *stress* possível. A causa de infertilidade diagnosticada (ou a sua ausência), as injeções hormonais diárias que a paciente tem de administrar (têm de ser tomadas sempre à mesma hora, o que pode causar transtornos no seu dia-a-dia), as análises sanguíneas que o casal tem de realizar, as monitorizações ultrassonográficas ao longo da estimulação ovárica (a ansiedade de saber se está a fazer a medicação corretamente e que se está a desenvolver um número de folículos adequado, para sentir que está no caminho correto para que o tratamento seja bem sucedido), a recolha da amostra de sêmen (o desejo que o paciente tem em realizar uma boa colheita para que tenha cumprido o seu papel no tratamento da melhor forma), o momento em que o casal toma conhecimento dos resultados da fecundação, a marcação ou não do dia da transferência do embrião, a espera até obter o resultado do teste de gravidez... Todas estas situações podem levar ao aumento do *stress* no casal e a nível individual (Eugster and Vingerhoets, 1999; Schmidt, 2006). Uma das provações mais relevantes que o casal infértil enfrenta durante um tratamento é aprender a lidar com a infertilidade em relação a eles próprios, ao parceiro e às diferentes esferas sociais que ocupam (Schmidt, 2006).

1.4. Primeira consulta de RHA

Durante a avaliação inicial do casal é importante conhecer a história reprodutiva de ambos (existência de descendentes ou de infertilidade anterior, possíveis tratamentos prévios, a duração da sua infertilidade atual), a sua sexualidade (frequência das relações sexuais, métodos contraceptivos utilizados anteriormente, uso de lubrificantes) e também fatores de risco que estejam relacionados com as suas atividades profissionais e de lazer. É igualmente relevante a obtenção de quaisquer outras informações médicas prévias.

1.5. Fatores de infertilidade

Existem diversos fatores que podem contribuir para uma situação de infertilidade. Estes são divididos em fatores não patológicos, patológicos (femininos, masculinos e inexplicados) e relacionados com o estilo de vida.

1.5.1. Fatores não patológicos

1.5.1.1. Idade materna e paterna

O pico da fertilidade feminina ocorre por volta dos 25 anos, sendo que a partir dos 32 começa a haver um declínio, que se torna mais acentuado depois dos 37 anos (The Committee on Gynecologic Practice of the American College of Obstetricians and Gynecologists and Medicine, 2008). A diminuição da qualidade ovocitária (Bayer *et al.*, 2002) e a degradação da função uterina (Soares *et al.*, 2005) são as principais causas desta conhecida diminuição da fertilidade. A perda da função ovocitária surge devido ao esgotamento dos folículos, período fisiológico conhecido como menopausa, pois cada mulher nasce com um número finito destas estruturas. Antes de atingir esta fase, a diminuição da qualidade ovocitária está relacionada com o aumento da probabilidade de ocorrerem erros mitóticos e meióticos impedindo a fecundação ou o correto desenvolvimento embrionário (Bayer *et al.*, 2002).

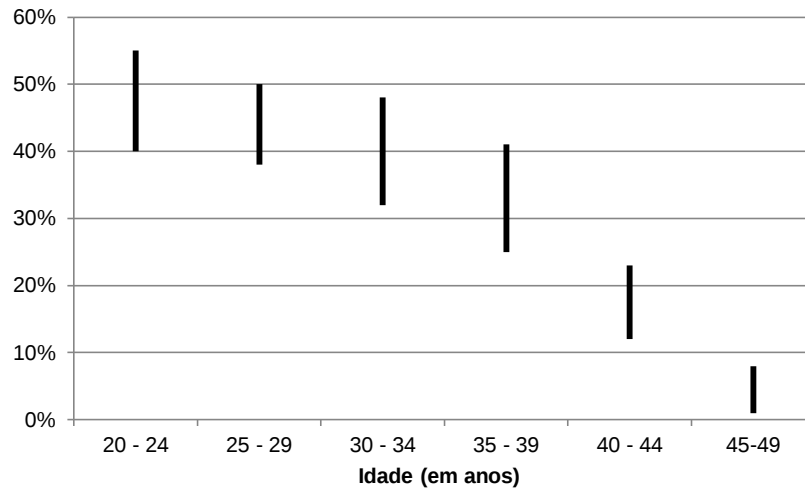


Gráfico 2 – Variação da fertilidade feminina em função da idade. A fertilidade feminina é aqui definida pela taxa de partos por ano por cada 1000 mulheres sexualmente ativas e que não usam métodos contraceptivos. É notável o declínio que ocorre com o avançar da idade, especialmente após os 35 anos. Adaptado de Sobral et al. (2012).

Ao contrário do que se pensava anteriormente, o homem também atinge um pico de fertilidade, com um decréscimo posterior muito menos acentuado, em comparação com a mulher (Bayer *et al.*, 2002). A idade a partir da qual começa a ocorrer essa diminuição não é consensual (Sobral et al., 2012). Contudo, uma redução da frequência das relações sexuais (devido ao decréscimo da libido e à ocorrência de disfunção erétil) e uma diminuição da qualidade do sêmen poderão ser as principais causas (Kühnert and Nieschlag, 2004). A idade masculina afeta também a integridade do ADN dos espermatozoides, uma vez que alterações cromossómicas são mais frequentes nos gâmetas de pacientes mais velhos (Kühnert and Nieschlag, 2004).

1.5.1.2. Frequência das relações sexuais

A probabilidade de um casal conseguir uma gravidez está diretamente relacionada com a frequência com que praticam o ato sexual. O período fértil é definido entre dois a três dias antes da data provável de ovulação, uma vez que a capacidade fertilizante do espermatozoide no aparelho genital feminino é de cerca de 48 horas, e até um dia depois, uma vez que o ovócito permanece viável durante 24 horas, aproximadamente. Assim, é aconselhável que o casal tenha relações duas vezes por semana com intervalos regulares ou duas vezes por mês, desde que ocorram durante o período fértil.

1.5.2. Fatores patológicos

Dentro deste grupo é possível destacar as causas que dizem respeito ao homem e à mulher, assim como a infertilidade inexplicada. No gráfico 3 está representada a prevalência dos principais fatores de infertilidade que afetam os casais.

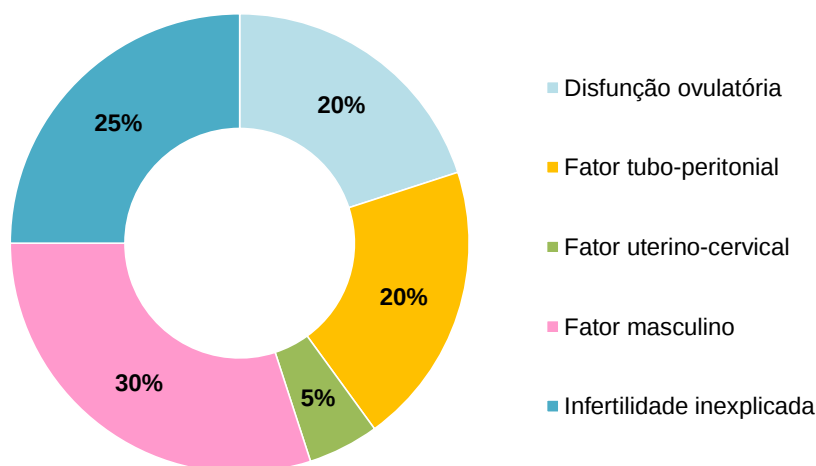


Gráfico 3 – Principais causas de infertilidade que afetam os casais. Adaptado de Bayer *et al.* (2002).

1.5.2.1. Masculinos

Os fatores masculinos são responsáveis por cerca de 50% das causas de infertilidade de um casal, sendo que 30% são exclusivamente masculinas e o restante diz respeito a causas de ambos os membros do casal (Poongothai *et al.*, 2009). Estão incluídos fatores genéticos (que podem explicar quadros de azoospermia ou de oligozoospermia), alterações hormonais, disfunções erécteis, antecedentes cirúrgicos (como hérnias inguinais ou intervenções no escroto), varicocelo, fatores imunológicos (Poongothai *et al.*, 2009), antecedentes de lesão testicular, reações alérgicas sistémicas, ejaculação retrógrada e agenesia dos canais deferentes.

O varicocelo, causa mais comum de infertilidade masculina, deve-se à dilatação de pelo menos uma das veias espermáticas (frequentemente a do lado esquerdo, por razões anatómicas) devido ao refluxo de sangue da veia renal na veia espermática, por insuficiência valvular. Como consequência da acumulação de sangue venoso nos testículos, ocorre um aumento de substâncias nocivas nesta zona, assim como da temperatura, provocando uma diminuição na produção de espermatozoides. Esta patologia tem um ótimo prognóstico, sendo que a taxa de recuperação após cirurgia é

entre 80 e 95%. Cerca de 50% dos pacientes operados devido a infertilidade conseguem ter um filho após um ano¹.

Existem também outros fatores como o criptorquidismo (condição na qual um ou ambos os testículos não desceram para o escroto (Paulozzi, 1999)), a obstrução de canais deferentes, a insuficiência testicular (quando os testículos não produzem espermatozoides ou hormonas masculinas²) ou alterações nos parâmetros seminais. A distribuição da prevalência destes fatores pode ser vista no gráfico 4.

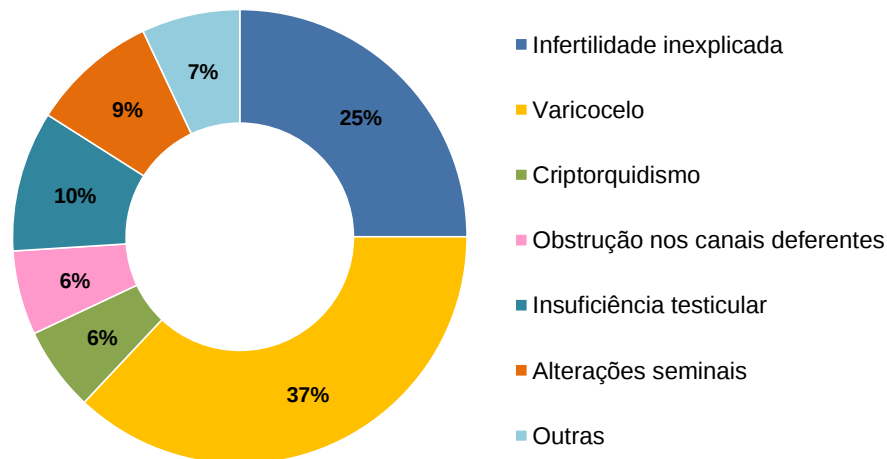


Gráfico 4 – Prevalência das causas de infertilidade masculina. Adaptado de Poongothai *et al.* (2009).

1.5.2.2. Femininos

1.5.2.2.1. Disfunções ovulatórias

Dentro deste grupo estão incluídas a Síndrome do Ovário Poliquístico³ (SOP), a falência ovárica prematura, a hiperprolactinemia, a amenorreia hipotalâmica, as patologias da tiroide e da suprarrenal e as falhas na fase lútea. A avaliação de qualquer uma destas disfunções envolve o doseamento da hormona folículo-estimulante (FSH) ao segundo ou terceiro dia do ciclo menstrual (Abdalla and Thum, 2004), assim como da hormona lúteo-estimulante (LH) e da prolactina. Se forem detetados níveis elevados de FSH, poderá ser uma indicação de falência ovárica; se os níveis de FSH estiverem normais, mas a LH apresentar concentrações elevadas,

¹ Informação obtida do site <http://www.spandrologia.pt/?pid=37>, acedido a 08/07/2014.

² Informação obtida do site <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/medlineplus.html>, acedido a 31/08/2014.

³ A SOP é definida como uma “disfunção ovárica caracterizada por hiperandrogenismo e ovários de ecomorfologia poliquística” (Soares *et al.*, 2012).

pode significar um diagnóstico da SOP. Caso a paciente tenha níveis elevados de prolactina, podemos estar perante um cenário de hipeprolactinemia.

1.5.2.2.2. Fator tubar

Este está associado a fatores de risco como anterior gravidez ectópica, rutura do apêndice, uso prévio do dispositivo intrauterino (método contraceptivo) ou inflamação pélvica anterior. Contudo, muitas pacientes que apresentam fator tubar não possuem qualquer condição de risco (Bayer and Alper, 2007). De modo a avaliar a permeabilidade tubar é realizada uma histerossalpingografia logo após a menstruação. Esta técnica permite observar possíveis obstruções nas trompas que impeçam a passagem dos espermatozoides até ao ovócito e acredita-se que pode também ter um efeito terapêutico (a entrada de uma solução nas trompas pode destruir adesões tubares, dissolver agregados de muco ou até promover o funcionamento dos cílios intratubários) (Bayer and Alper, 2007). Quando a impermeabilidade das trompas não pode ser ultrapassada, o tratamento mais indicado é a realização de uma FIV ou de uma ICSI.

1.5.2.2.3. Fator cervical

O canal cervical permite o acesso dos espermatozoides ao útero e, consequentemente, às trompas de Falópio, onde poderá estar o ovócito, pronto a ser fecundado. As características hormonodependentes do muco cervical afetam a passagem dos gametas masculinos, consoante a fase do ciclo ovário. A produção de um muco cervical aquoso acontece no período pré-ovulatório, favorecendo o acesso dos espermatozoides ao útero (Bayer and Alper, 2007). Problemas na penetração dos espermatozoides no muco cervical podem dever-se a falhas durante o coito, à produção inadequada de muco e com características adversas à passagem dos espermatozoides ou a um sêmen de baixa qualidade. Para determinar a existência deste fator é realizado o teste pós-coital, que avalia as características do muco e o número de espermatozoides que o atravessam (Bayer and Alper, 2007). Esta causa de infertilidade pode facilmente ser ultrapassada com uma inseminação intrauterina.

1.5.2.2.4. Fator uterino

Uma das patologias mais graves associadas à infertilidade é a endometriose. Esta é definida pela presença de tecido endometrial fora do útero, o que provoca uma reação inflamatória crónica (Kennedy *et al.*, 2005). Nem todas as mulheres que sofrem de endometriose demonstram sintomas, como dor pélvica ou infertilidade (Meuleman *et al.*, 2009), levando à falta de exatidão quanto à sua prevalência e ao seu diagnóstico tardio (Dunselman *et al.*, 2014). No entanto é estimado que 2 a 10% das mulheres em idade reprodutiva (Dunselman *et al.*, 2014) e até 50% das mulheres inférteis (Meuleman *et al.*, 2009) sofram de endometriose. Dunselman *et al.* (2014) recomendam que o diagnóstico desta doença deva ser considerado em pacientes que possuam indícios como: dismenorreia (cólicas dolorosas menstruais), dor pélvica não cíclica, dispareunia profunda (dor durante o ato sexual), infertilidade e fadiga na presença de qualquer um dos sintomas anteriormente referidos; e em mulheres em idade reprodutiva com sintomas cíclicos não ginecológicos como: disquézia (dor ao evacuar durante a menstruação), disúria (dificuldade em urinar durante o período menstrual), hematúria (presença anormal de eritrócitos na urina), hemorragia retal e dor nos ombros⁴. O método de referência para o diagnóstico desta doença é a realização de uma laparoscopia⁵ e posterior análise histológica das amostras colhidas (glândulas endométricas e/ou células do estroma) (Dunselman *et al.*, 2014). De modo a aliviar os sintomas de endometriose associados à dor, os médicos são aconselhados a fazer prescrições hormonais (contracetivos hormonais, progestagénios, antiprogestagénios ou agonistas do fator libertador das gonadotrofinas (GnRH)) (Dunselman *et al.*, 2014). Outra opção passa pela excisão das lesões por laparoscopia, aquando da identificação da doença (Dunselman *et al.*, 2014). Em mulheres com endometriose moderada a severa, este último tratamento referido é recomendado para aumentar as taxas de sucesso em posteriores tratamentos de RHA (Dunselman *et al.*, 2014). Mulheres com este tipo de patologia possuem maior risco de parto prematuro, independentemente do recurso a técnicas de RHA para engravidar (Stephansson *et al.*, 2009). De acordo com o mesmo estudo, estas pacientes foram mais frequentemente afetadas por pré-eclampsia⁶ ou hemorragia durante o trabalho

⁴ Significados obtidos através do site <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/mplusdictionary.html>, acedido a 29/08/2014.

⁵ A laparoscopia é uma intervenção cirúrgica pouco invasiva, durante a qual é inserido um instrumento de fibra ótica pela parede abdominal, permitindo a visualização dos órgãos e a realização de cirurgias de pequena escala (<http://www.oxforddictionaries.com/definition/english/laparoscopy>, acedido a 08/07/2014).

⁶ Condição séria que se desenvolve perto do fim da gravidez e que é caracterizada pelo aumento da pressão sanguínea, aumento de peso excessivo, edema generalizado, proteinúria, dor de cabeça grave e alterações na visão. Significado obtido do site <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/mplusdictionary.html>, acedido a 29/08/2014.

de parto. Adicionalmente, o número de cesarianas efetuadas a pacientes com endometriose foi quase o dobro em comparação com mulheres sem esta patologia.

1.5.2.3. Infertilidade inexplicada

Quando o homem apresenta um espermograma com valores normais, assim como um exame físico sem anomalias, e a mulher não aparenta sofrer de qualquer doença que afete a sua fertilidade, considera-se que o casal apresenta uma infertilidade inexplicada. Esta pode dever-se a alterações no equilíbrio endocrinológico, variações imunológicas e na fisiologia reprodutiva ou a modificações genéticas (Ray *et al.*, 2012).

1.5.3. Estilos de vida

Cada vez mais diversos e com maior peso na saúde humana, o estilo de vida de cada pessoa pode levar a alterações que influenciem a sua fertilidade, mesmo que de uma forma pouco acentuada, tais como:

- **Contraceção usada anteriormente** – o tipo de método utilizado e a sua duração interferem com o tempo necessário para atingir uma gravidez, após a sua descontinuação (Hassan and Killick, 2004);
- **Obesidade** – esta condição leva a alterações hormonais e metabólicas, tanto em homens como em mulheres. São aconselháveis perdas de peso para índices de massa corporal apropriados, de forma a maximizar o sucesso dos ciclos de tratamento e a menorizar os seus riscos (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2013);
- **Tabaco** – para além dos efeitos adversos que o tabaco pode ter no desenvolvimento embrionário e fetal, este provoca diversas alterações na função ovárica, como diminuição dos níveis de hormonas esteroides ou alteração de proteínas necessárias para a produção de gonadotrofinas. Segundo Bayer *et al.* (2002) existe também uma relação com o fenómeno de falência ovárica prematura, sendo que mulheres fumadoras atingem a menopausa entre 1 a 2 anos mais cedo. Está igualmente comprovada a ocorrência de alterações nas trompas e no útero, levando a uma maior incidência de abortamentos e gravidez ectópica (Soares *et al.*, 2007; Waylen *et al.*, 2009). Quanto aos homens, o tabaco leva a uma diminuição em todos os parâmetros espermáticos, nomeadamente no volume do ejaculado e na concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides (Bayer *et al.*, 2002; Ramlau-Hansen *et al.*, 2007). É também conhecido um aumento do *stress* oxidativo

testicular, provocado pelos compostos do tabaco, levando ao aparecimento de lesões que afetam a qualidade de espermatozoides e que não são visíveis ao microscópio (Meseguer *et al.*, 2008);

- **Álcool** – este está relacionado com alterações dos níveis de estrogénios e progesterona, disfunções da fase lútea e alterações na implantação e desenvolvimento embrionário (Sobral *et al.*, 2012). No que ao homem diz respeito, esta substância pode causar atrofia testicular, impotência, redução da libido e diminuição da qualidade espermática. São também conhecidos efeitos teratogénicos (Sobral *et al.*, 2012);

- **Cafeína** – aumenta o risco de subfertilidade (ovulação e função do corpo lúteo), quando consumida em doses elevadas (> 500 mg/dia). Está associada a fator tubário, endometriose, abortamento espontâneo e morte fetal *in útero* (Sobral *et al.*, 2012). Quanto aos seus efeitos no homem, ainda existe bastante controvérsia (Jensen *et al.*, 2010);

- **Drogas e estupefacientes** – a cannabis pode levar a alterações da ovulação e causar efeitos adversos nos níveis de testosterona e na motilidade dos espermatozoides, apesar de não afetar a espermatogénese (Sobral *et al.*, 2012). A cocaína está associada a infertilidade por fator tubar e leva à diminuição da concentração os espermatozoides em consumidores crónicos (Sobral *et al.*, 2012);

- **Poluentes ambientais** – são exemplos os pesticidas, os metais pesados, o monóxido de carbono, os ftalatos (presentes em cosméticos, perfumes, lubrificantes) e os bisfenóis (incluídos nos plásticos). Estes estão associados a alterações na espermatogénese e nos níveis hormonais (Sobral *et al.*, 2012);

- **Temperatura escrotal** – várias situações podem levar ao aumento da temperatura na região dos testículos, o que pode provocar uma diminuição acentuada da espermatogénese. Estão em risco os profissionais da metalurgia e panificação, condutores frequentes, usuários assíduos de sauna (Garolla *et al.*, 2013a) ou banho turco e homens que tenham o hábito de utilizar o computador portátil sobre as pernas (Sharpe, 2010);

- **Doenças sexualmente transmissíveis** – as doenças de origem bacteriana causam infeções que podem ocorrer nos órgãos reprodutores masculinos e femininos ou na região pélvica (Sobral *et al.*, 2012). Já o vírus da imunodeficiência humana (VIH) leva a uma diminuição da fecundidade e da fertilidade, assim como a complicações durante a gravidez (Sobral *et al.*, 2012);

- **Stress** – uma vez que a situação de infertilidade causa desconforto no casal, esta pode levar a sentimentos de culpa, frustração e ansiedade, entre outros.

2. O laboratório de andrologia

2.1. Espermograma (análise citobioquímica do sémen)

Os espermatozoides são produzidos nos testículos e expulsos do organismo através do pénis, pela uretra, juntamente com os fluídos produzidos pelas glândulas sexuais anexas. Estas incluem as vesículas seminais, a próstata e as glândulas bulbouretrais (ou de Cowper), cujas secreções constituem aproximadamente 90% do volume seminal (World Health Organization, 2010). As primeiras frações de esperma ejaculadas são extremamente ricas em espermatozoides e, portanto, é importante que não ocorra a sua perda durante a recolha da amostra (Björndahl and Kvist, 2003). Após a ejaculação, o sémen apresenta-se como um coágulo, devido à presença de proteínas provenientes da próstata e do fibrinogénio produzido pelas vesículas seminais. Este será desfeito ao fim de algum tempo, por ação de outro tipo de proteases prostáticas, sendo que o espermograma só poderá começar a ser realizado após a amostra estar liquefeita (já não se apresenta como um coágulo, mas sim como uma mistura homogénea). Os resultados obtidos após a análise citobioquímica do esperma dependem de vários fatores (World Health Organization, 2010), tais como:

- Colheita completa da amostra;
- Atividade das glândulas anexas;
- Tempo decorrido desde a última ejaculação;
- Duração do período de abstinência anterior à última ejaculação;
- Tamanho dos testículos.

Todos estes fatores, em conjunto com o estilo de vida e os antecedentes médicos, são responsáveis pela variabilidade intra e interindividual conhecida nas amostras de sémen (Keel, 2006). Indivíduos podem apresentar concentrações de espermatozoides, a variar de pouquíssimos milhões/mL até quase 250 milhões/mL, por amostra realizada (World Health Organization, 2010).

2.1.1. Recolha da amostra

A recolha da amostra de sémen é idealmente realizada por masturbação, sendo o ejaculado albergado num frasco esterilizado e próprio para o efeito, preferencialmente nas instalações do laboratório. Assim evita-se possíveis contaminações, perdas e variações de temperatura (Jeyendran, 2003). Em casos excecionais, a colheita pode

ser efetuada em casa, com a condição de que deverá ser entregue no laboratório, no máximo, uma hora após a ejaculação (Jeyendran, 2003). O transporte deve ser realizado com a preocupação de manter o frasco de colheita a uma temperatura o mais próxima possível da temperatura média corporal (aproximadamente 35°C) (World Health Organization, 2010), sendo aconselhado que se realize junto ao corpo. Todas estas instruções são dadas ao paciente por escrito, na forma de um consentimento informado.

O período de abstinência sexual aconselhável para a realização de um espermograma, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (World Health Organization, 2010), é de 2 a 7 dias. Um período de tempo mais curto pode afetar negativamente o volume da amostra e a concentração de espermatozoides, contudo pode potenciar a motilidade (Silverberg and Turner, 2009). Um intervalo de tempo mais prolongado poderá ter um efeito adverso na motilidade (Silverberg and Turner, 2009). Após a recolha da amostra, esta é colocada numa estufa a aproximadamente 35°C, durante cerca de 30 minutos, tempo ao fim do qual já deverá estar liquefeita (figura 2). Caso este processo ainda não esteja finalizado (figura 1), a incubação prolonga-se no máximo até aos 60 minutos. Se ao fim desse tempo a amostra não ficar completamente liquefeita é realizada uma anotação. Quando a liquefação não ocorre naturalmente, é possível recorrer a métodos enzimáticos ou mecânicos (sendo preferível os mecânicos, pois os outros podem interferir com as características seminais (Jeyendran, 2003)) para a provocar, uma vez que alíquotas retiradas de uma amostra não liquefeita poderão não ser representativas (Silverberg and Turner, 2009).

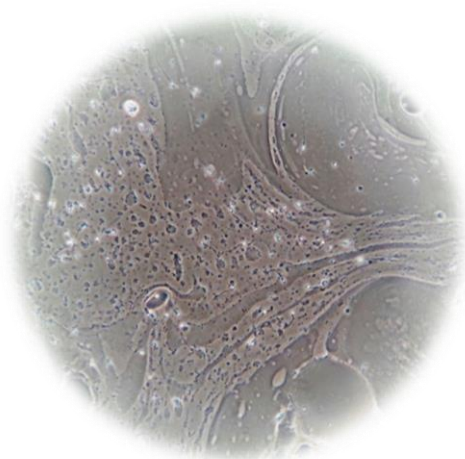


Figura 1 – Amostra ainda não liquefeita visualizada ao microscópio ótico.

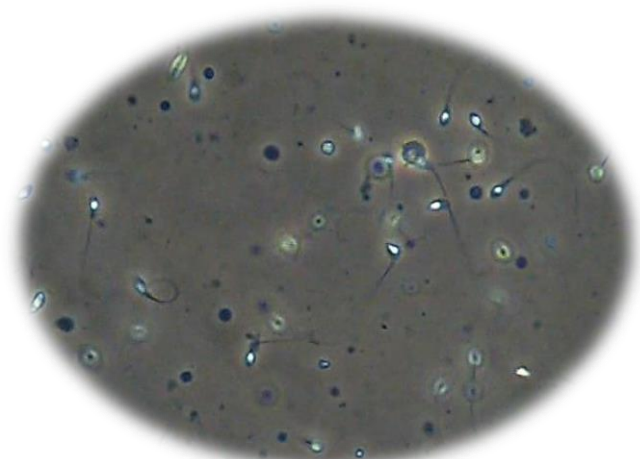


Figura 2 – Amostra liquefeita visualizada ao microscópio ótico.

2.1.2. Análise da amostra

Esta pode ser dividida em duas partes: microscópica e macroscópica.

2.1.2.1. Parâmetros macroscópicos

No que diz respeito às características macroscópicas, é medido o volume e o pH (através de uma fita indicadora) e são avaliadas a cor, o cheiro, a viscosidade e a liquefação completa ao fim de 60 minutos. A viscosidade difere da liquefação, na medida em que uma amostra viscosa é homogénea, ao contrário de uma por liquefazer. Após aspirar a amostra para uma pipeta, verifica-se a sua viscosidade: se cair gota a gota, apresenta uma viscosidade normal; se ocorrer formação de um filamento entre o frasco e a pipeta, considera-se que tem viscosidade aumentada. Existem amostras que apresentam uns pequenos coágulos gelatinosos, que não se liquefazem e cujo significado biológico é ainda desconhecido (Jeyendran, 2003). O único destes parâmetros com valor clínico mais relevante é o volume, pois quando é muito reduzido (menos de 0,5 mL) poderá significar que não é depositada uma quantidade suficiente de sémen para cobrir todo o colo do útero (Jeyendran, 2003). Por outro lado, um volume acima do limite de referência poderá levar à diluição dos espermatozoides e consequente perda após a liquefação do sémen no trato feminino.

2.1.2.2. Parâmetros microscópicos

2.1.2.2.1. Motilidade

A motilidade é uma das características mais importantes dos espermatozoides, pois permite prever a sua capacidade de atravessar o longo caminho do trato feminino, de encontrar o ovócito e de fecundá-lo (Silverberg and Turner, 2009). Este deve ser o primeiro parâmetro a ser analisado, de modo a serem evitadas variações de temperatura e pH ou a desidratação da amostra, que afetam negativamente a motilidade espermática (World Health Organization, 2010). Esta característica deve também ser avaliada sempre numa nova alíquota, de modo a evitar que a luz do microscópio influencie a motilidade (Silverberg and Turner, 2009). Apenas são contados espermatozoides intactos (com cauda e cabeça), evitando-se as bordas da lamela (5 mm) e as proximidades de bolhas de ar (World Health Organization, 2010).

São contabilizados espermatozoides imóveis (que não apresentam qualquer tipo de movimento), móveis *in situ* (apresentam motilidade, mas não progressiva) e progressivos lentos e rápidos (apresentam motilidade com progressão, mais lenta ou mais rápida), com a ajuda de um contador manual de células. Anteriormente à mais recente edição da OMS (5ª edição) eram consideradas as quatro categorias suprarreferidas. Contudo, devido à dificuldade em distinguir os progressivos lentos dos rápidos, a 5ª edição da OMS (World Health Organization, 2010) apenas engloba 3 grupos: espermatozoides imóveis, móveis *in situ* e progressivos. Apesar de ser uma classificação mais simplista e fácil de implementar, pode ser redutora do potencial dos gametas, pois há diferença entre um espermatozoide que se mova de forma lenta e sem direção e um que se desloque rapidamente e com uma trajetória bem definida. De modo a proceder ao resto da análise da amostra, é necessário obter duas contagens concordantes para a categoria mais representativa. Para tal é fundamental que a diferença entre essas duas contagens não seja significativa, de acordo com a tabela de NAFA and ESHRE-SIGA (2002) no anexo A. Como exemplo, foram realizadas as seguintes contagens para uma amostra:

	Ez imóveis	Ez móveis <i>in situ</i>	Ez progressivos lentos	Ez progressivos rápidos
Contagem 1	10%	8%	60%	22%
Contagem 2	22%	11%	48%	19%
Contagem 3	12%	7%	63%	18%

Tabela 1 – Contagem do número de espermatozoides de acordo com as 4 categorias de motilidade de uma amostra de sémen. Ez – espermatozoides.

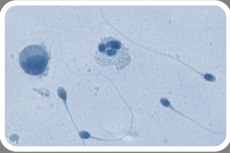
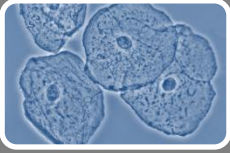
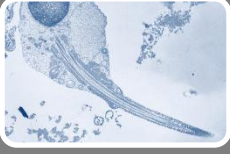
Para saber quais as contagens concordantes é necessário calcular a média das percentagens para a categoria mais representativa (neste caso, os espermatozoides progressivos lentos). Para as contagens 1 e 2 a média é de 54%, para as contagens 2 e 3 é de 55,5% e para as contagens 1 e 3 é de 61,5%. Consultando a tabela (anexo A), verifica-se a diferença máxima que pode ocorrer entre duas contagens concordantes. Neste exemplo, as contagens concordantes são a 1 e a 3. A diferença entre ambas é de 3, que é menor que a diferença máxima admitida, que é 9.

A motilidade pode ser influenciada por diversos fatores, entre os quais (Silverberg and Turner, 2009):

- A idade do paciente e o seu estado de saúde;
- O período de abstinência;
- A exposição do paciente a influências externas, como calor ou toxinas;

- O método utilizado para recolha da amostra;
- O tempo e a adequação do manuseamento da amostra desde a recolha até à sua análise.

Durante a avaliação da motilidade, verifica-se a existência de aglutinação e de outro tipo de células na amostra (esquema 1).

	Aglutinação espermatozoides móveis aderentes uns aos outros. Possível indicação da presença de anticorpos dos espermatozoides
	Leucócitos possíveis indicadores da existência de uma infeção nas glândulas anexas. Como são produtores de espécies reativas de oxigénio, estes produtos podem interferir com a motilidade e o potencial de fertilização dos espermatozoides
	Eritrócitos possíveis indicadores de patologia no trato reprodutivo, mas sem prejuízo para o potencial de fertilização dos espermatozoides
	Células epiteliais quando em número elevado, é possível que o método de recolha da amostra tenha sido outro que não a masturbação (estimulação oral ou coito interrompido), podendo comprometer a quantidade e qualidade espermática
	Microrganismos indicadores da existência de uma infeção no trato reprodutivo. É de maior preocupação se estes organismos estiverem presentes em amostras que serão utilizadas em tratamentos de RHA
	Células da linha germinativa indicadores de problemas durante a espermatogénese. Caso se registre um número elevado e poucos espermatozoides, poderá ser considerada a realização de uma biópsia testicular (TESE)

Esquema 1 – Aglutinação e outro tipo de células que poderão estar presentes numa amostra seminal, visíveis ao microscópio ótico⁷. Adaptado de Jeyendran (2003) e de Menkveld *et al.* (2001).

⁷ Referências das imagens obtidas: aglutinação (World Health Organization, 2010); leucócitos (<http://www.maledoc.com/blog/tag/semen-analysis/>, acedido no dia 01/07/2014); eritrócitos (Esteves and Varghese, 2012); células epiteliais (<http://cellfunctioning.wikispaces.com/Epithelial+cells>, acedido no dia 6/07/2014); espermatozoide com bactérias na cabeça, peça intermédia e cauda (<http://www.fertilitysolution.com/Infertility/Male-Infertility/>, acedido no dia 6/07/2014); espermatozoide imaturo (<http://medicine.utah.edu/surgery/andrology/gallery.php>, acedido no dia 6/07/2014).

2.1.2.2.2. Vitalidade

A vitalidade espermática parte do princípio que apenas as células mortas permitem a entrada de um corante vital, pois possuem a sua membrana danificada (Silverberg and Turner, 2009). O corante mais utilizado é a eosina Y, que apresenta uma cor avermelhada. Este é adicionado a uma alíquota da amostra na proporção de 1:1 e ao fim de, aproximadamente, 5 minutos é realizado um esfregaço (figura 3 e 4) para visualização da preparação ao microscópio em campo claro. Os espermatozoides mortos apresentam a cabeça corada de vermelho e os vivos ostentam as cabeças verdes/esbranquiçadas, uma vez que impediram a entrada da eosina Y (figura 5). Segundo a OMS (World Health Organization, 2010), os espermatozoides com a cabeça vermelho mais claro são classificados como vivos, mas segundo a NAFA & ESHRE-SIGA (2002) estas células são classificadas como mortas. O que se aplica na prática está de acordo com a última referência, uma vez que, mesmo entrando pouco corante (daí um vermelho mais claro/cor de rosa), significa que a membrana do espermatozoide já não está intacta, por isso é contabilizado como morto.

Este parâmetro deve estar de acordo com a motilidade, pois a percentagem de espermatozoides mortos não pode exceder a percentagem de imóveis, uma vez que a presença de movimento é um indicador da vitalidade dos gametas. Por outro lado, é comum o número de células vivas exceder o número de espermatozoides móveis (*in situ* e progressivos) (World Health Organization, 2010), pois os gametas podem estar vivos, mas possuírem anomalias que os impeçam de se moverem. Assim, a análise da vitalidade é decisiva para determinar a percentagem de espermatozoides imóveis que estão vivos e que poderão ser utilizados num futuro ciclo de ICSI. Contudo, espermatozoides que tenham estado em contacto com a eosina Y não poderão ser utilizados para técnicas de RHA, uma vez que este corante tem efeitos tóxicos (Silverberg and Turner, 2009).

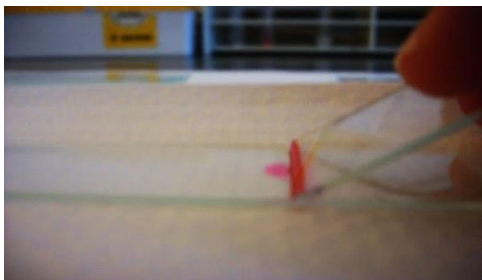


Figura 3 – Realização do esfregaço da preparação de eosina Y com espermatozoides para visualização ao microscópio.



Figura 4 – Esfregaço pronto para ser visualizado ao microscópio.

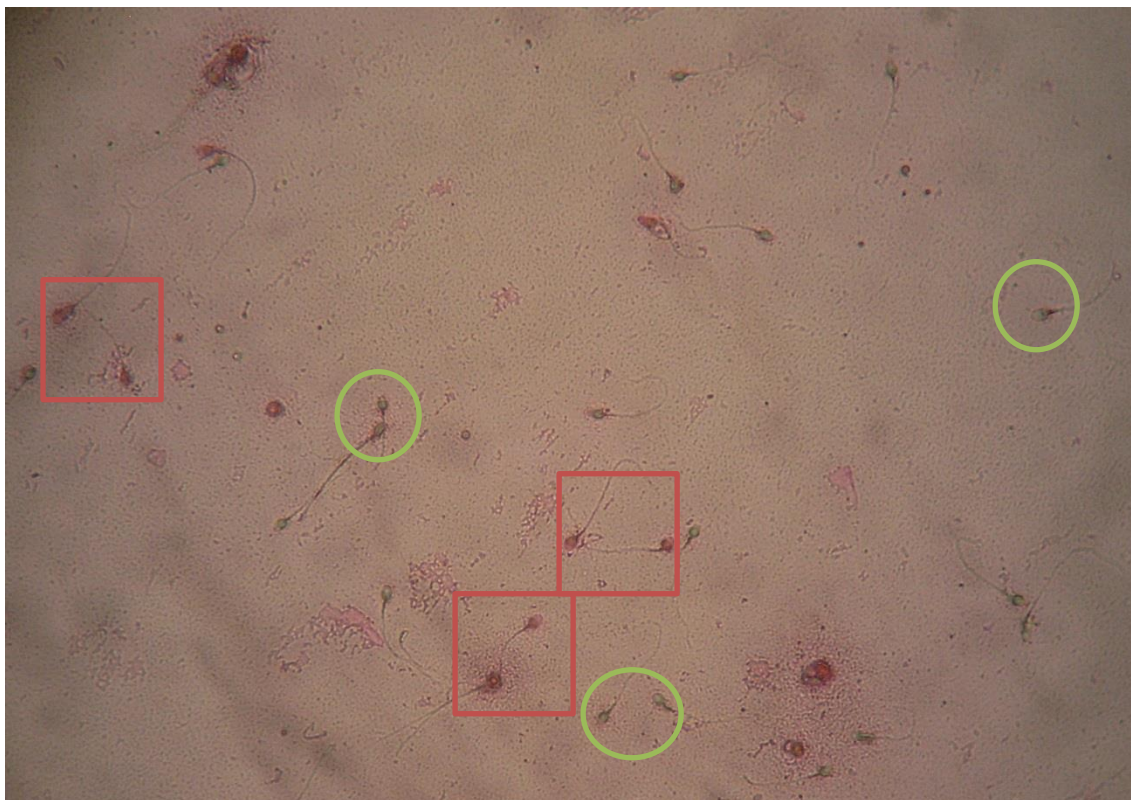


Figura 5 – Visualização do esfregaço para avaliar a vitalidade de uma amostra seminal. É possível observar espermatozoides vivos (a verde, rodeados por um círculo) e mortos (vermelhos, delimitados por um quadrado).

2.1.2.2.3. Hipoosmolaridade

O teste de hipoosmolaridade (HOS) baseia-se, igualmente, na integridade da membrana celular, característica definida pela capacidade desta em manter o equilíbrio entre o espermatozoide e o meio envolvente. Caso um espermatozoide se encontre funcional, este irá reagir à solução hipoosmótica aumentando de volume, uma vez que permite a entrada de água, levando ao enrolamento da cauda. Deste modo, as células reprodutoras que apresentarem alterações na cauda possuem membranas intactas. Já as que apresentam caudas lineares ou inalteradas deverão possuir alguma anomalia (World Health Organization, 2010) (figura 6 e 7).

Para realizar este teste é adicionada a uma alíquota da amostra, na razão de 1:9, a solução hipoosmótica, que é composta por citrato de sódio e frutose, seguindo-se um período de incubação de 30 minutos a 37°C, pois só ao fim deste tempo é que todas as formas dos flagelos se encontram estáveis (World Health Organization, 2010). Os espermatozoides são depois observados ao microscópio de contraste de fase. Este parâmetro tem uma enorme importância nos casos em que antes da realização de uma ICSI todos os espermatozoides se encontram imóveis. Com o HOS é possível

selecionar apenas as células vivas e a sua utilização direta num ciclo de tratamento (Silverberg and Turner, 2009), ao contrário dos espermatozoides submetidos ao teste de vitalidade.

Na maioria dos casos, o valor do HOS corresponde ao do teste de vitalidade. Mas em alguns espermogramas, ocorre uma diferença significativa entre estes dois parâmetros, sendo o resultado do HOS bastante inferior. Nestes casos, os espermatozoides apesar de vivos, poderão possuir deficiências na cauda e, consequentemente, apresentarem uma cauda intacta. Assim, o valor do HOS corresponde frequentemente à percentagem de espermatozoides que apresentam movimento progressivo.

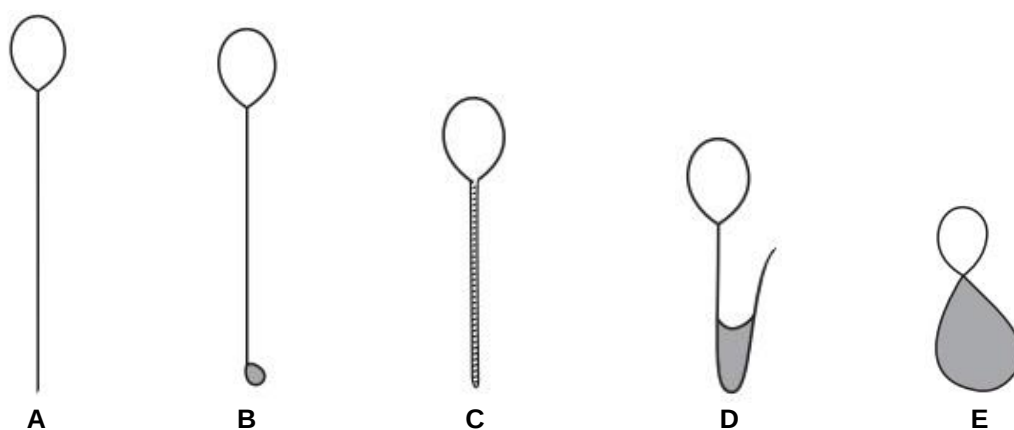


Figura 6 – Esquematização de espermatozoides submetidos ao HOS, apresentando diferentes tipos de alterações na cauda. **A** – espermatozoide sem alterações na cauda; **B-E** – espermatozoides com alterações na cauda. As áreas a cinzento são indicadoras de turgescência. Imagens obtidas de World Health Organization (2010).

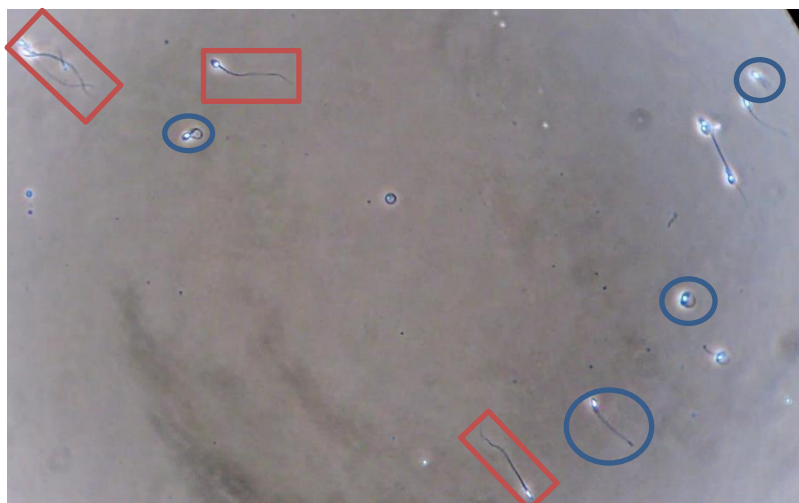


Figura 7 – Visualização de espermatozoides após incubação com a solução hipoosmótica. Espermatozoides com a cauda enrolada (possuem a membrana intacta) estão rodeados por um círculo azul; espermatozoides com a cauda não enrolada (possuem algum defeito na sua membrana) estão delimitados por um quadrado vermelho.

2.1.2.2.4. Concentração

A concentração de uma amostra seminal é definida pelo número de espermatozoides por unidade de volume. Outro parâmetro relacionado com a concentração, mas distinto desta, é o número total de espermatozoides, determinado pela totalidade dos gâmetas presentes no ejaculado (obtém-se multiplicando a concentração pelo volume de amostra). De modo a determinar a concentração com rigor é utilizada uma câmara de contagem, sendo a mais utilizada a câmara de Neubauer improved (World Health Organization, 2010) (figura 8), e uma pipeta de deslocamento positivo. Este tipo de pipeta permite a medição de um volume exato, ao contrário do que é possível com as pipetas vulgarmente utilizadas, minimizando-se assim erros de pipetagem (NAFA and ESHRE-SIGA, 2002). Desta forma assegura-se que o volume da alíquota retirada da amostra seja exato.



Figura 8 – Câmara de Neubauer improved (Marienfeld®, Alemanha).

Antes de carregar a câmara com a amostra, é efetuada uma diluição, consoante o número de espermatozoides observados ao microscópio ótico (tabela 2). Esta consiste na adição de um fixador (solução de NaHCO_3 e formaldeído) a uma alíquota da amostra. Os fatores de diluição são muito importantes para uma simples e correta determinação da concentração, pois evita-se que ocorra sobreposição de espermatozoides na área de contagem (World Health Organization, 2010).

Nº de espermatozoides por campo de visão (x400)	Diluição	Amostra (μL)	Fixador (μL)
<15	1:5	100	400
15 - 40	1:10	50	450
40 - 200	1:20	50	950
>200	1:50	50	2450

Tabela 2 – De acordo com o número de espermatozoides estimado por campo de visão numa ampliação de 400x, realiza-se a diluição da amostra para carregar a câmara de contagem. Adaptado de NAFA & ESHRE-SIGA (2002).

Os espermatozoides devem ser visualizados num microscópio ótico de contraste de fase, na grelha do meio da área de contagem, que está subdividida em 25 quadrados

(figura 9 e 10). A quantidade de quadrados a considerar depende do número de espermatozoides contabilizados no primeiro quadrado, de acordo com a tabela 3. Para que a contagem seja precisa é importante que, no mínimo, sejam contabilizados 200 espermatozoides (World Health Organization, 2010) e que sejam realizadas duas contagens de alíquotas diferentes.

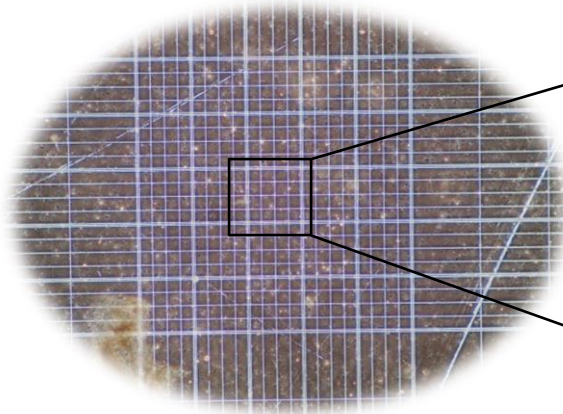


Figura 9 – Área de contagem central da câmara de Neubauer improved. É constituída por 25 quadrados, cada um subdividido em 16.

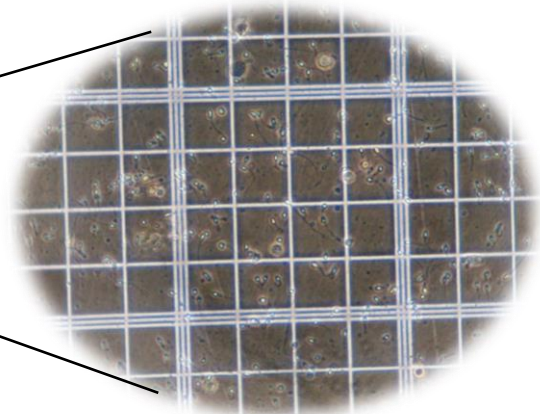


Figura 10 – Quadrado central da área de contagem, onde é possível ver a subdivisão em 16 quadrados.

Número de espermatozoides no 1º quadrado	Número de quadrados a contar
<10	25
10-40	10
>40	5

Tabela 3 – Relação entre o número de espermatozoides contados no primeiro quadrado da área de contagem e o número consequente de quadrados a considerar. Adaptado de NAFA & ESHRE-SIGA (2002).

Para determinar a concentração espermática é necessário ter em conta vários fatores, como o número de espermatozoides contabilizados, o número de quadrados contados, o fator de diluição utilizado e a profundidade e volume da câmara de contagem. Assim, a concentração é calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Concentração} = (25 \text{ quadrados} \div \text{número de quadrados contados}) \times \text{fator de diluição} \times \text{profundidade da câmara} \times \text{volume da câmara} \times \text{número de espermatozoides contabilizados}$$

Uma vez que a área e a profundidade da câmara são constantes, foram estimados fatores de conversão consoante o número de quadrados contados, de acordo com a diluição utilizada (tabela 4). Portanto, a concentração é calculada dividindo o número

total de espermatozoides obtidos em duas contagens pelo fator adequado, tendo em conta o número de quadrados contados.

Fatores de conversão			
Diluição utilizada	Número de quadrados contabilizados		
	5	10	25
1:2	100	40	20
1:5	40	16	8
1:10	20	8	4
1:20	10	4	2
1:50	4	1,6	0,8

Tabela 4 – Tabela dos fatores de conversão a utilizar consoante o número de quadrados que foram contabilizados e a diluição realizada. Adaptado de NAFA & ESHRE-SIGA (2002).

Em casos de suspeita de azoospermia (ausência de espermatozoides no ejaculado), apenas se determinam os parâmetros macroscópicos e se realiza o esfregaço para a morfologia. Este diagnóstico só pode ser de facto assumido após centrifugação da amostra e posterior análise meticulosa do *pellet* ao microscópio, confirmando-se a ausência de espermatozoides (Jeyendran, 2003). Contudo, mesmo após o diagnóstico de azoospermia, este não é 100% fiável, devido à conhecida variabilidade intraespecífica das amostras de sémen. Após a confirmação de ausência de espermatozoides, há a necessidade de perceber a sua origem. A azoospermia pode ser secretora (quando existe um problema durante a espermatogénese) ou obstrutiva (os espermatozoides são produzidos normalmente, mas não são expelidos pela uretra devido a uma obstrução nos canais deferentes). Em ambos os casos, é frequente a realização de uma TESE para confirmação do diagnóstico e, se possível, para se obterem espermatozoides de quantidade e qualidade suficientes para o seu uso em ciclos posteriores de ICSI (Salom, 2004).

2.1.2.2.5. Morfologia

Este parâmetro é examinado após a realização de um esfregaço da amostra a fresco, que posteriormente é fixado e corado. A fixação consiste na imersão da lâmina com o esfregaço em metanol e a coloração é efetuada através dos corantes de Papanicolau e de Shorr, que permitem a distinção dos diferentes constituintes do espermatozoide (cabeça, peça intermédia, cauda e, se presente, citoplasma residual), assim como de outro tipo de células (células da linha germinativa ou leucócitos) (NAFA and ESHRE-SIGA, 2002). A presença destas últimas, apesar de não ser um parâmetro da

morfologia do espermatozoide, deve ser anotada. A lâmina corada é depois visualizada ao microscópio ótico de campo claro, numa ampliação de 1000x e com óleo de imersão. Deverão ser observados, no mínimo, 200 espermatozoides e efetuadas duas contagens.

As anomalias dividem-se em quatro categorias: anomalias na cabeça, na peça intermédia, na cauda e presença de restos citoplasmáticos. Deve ser calculada a percentagem de espermatozoides normais, assim como a percentagem de cada tipo de anomalia. O **índice de teratozoospermia** refere-se à média do número de defeitos por espermatozoide anormal. É calculado através da divisão do número total de anomalias contadas (total dos 4 grupos de anomalias que se consideram) pela percentagem de espermatozoides anormais.

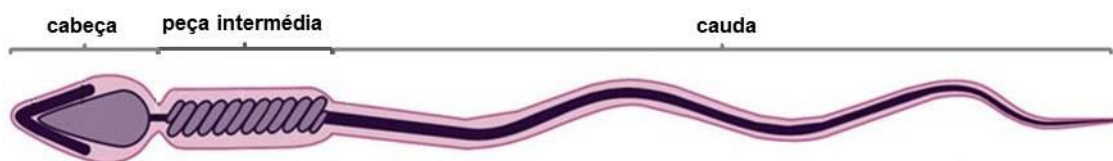


Figura 11 – Espermatozoide normal⁸.

Um espermatozoide considerado normal apresenta a seguinte forma (figura 11):

- **Cabeça** – apresenta uma forma oval e sem imperfeições. Deve ser visível o acrossoma bem definido, ocupando entre 40 a 70% da área da cabeça (Menkveld *et al.*, 2001). Preferencialmente, não devem ser visíveis vacúolos e, quando presentes, não devem ser mais de dois pequenos vacúolos na região do acrossoma (World Health Organization, 2010);
- **Peça intermédia** – é ligeiramente mais grossa que a cauda, regular e deve ter comprimento semelhante à cabeça, ligando-se axialmente a esta (World Health Organization, 2010). Caso sejam visíveis restos citoplasmáticos, estes só são classificados como anormais caso excedam um terço do tamanho da cabeça (Mortimer and Menkveld, 2001);
- **Cauda** – é única e não deve apresentar danos (enrolamento, dobras ou ruturas) (Silverberg and Turner, 2009). É ligeiramente mais fina que a peça intermédia e no fim do seu comprimento, em média 45 µm (World Health Organization, 2010), apresenta-se ainda mais fina.

Uma espermatogénese anormal ou algumas patologias do epidídimo estão frequentemente associadas com uma maior proporção de espermatozoides anormais

⁸ Imagem obtida do site http://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=File:Mouse-spermatozoa_EM_and_diagram.jpg, acedido no dia 09/07/2014.

(World Health Organization, 2010). Atualmente, a morfologia dos espermatozoides é avaliada segundo os critérios da World Health Organization (2010), exemplificados na tabela 5.

Espermatozoide normal			
Anomalias na cabeça	Pequeno acrossoma		
	Sem acrossoma		
	Grande acrossoma		
	Afunilada		
	Piriforme		
	Amorfa		

	Vacuolizada		
Anomalias na peça intermédia	Peça grossa		
	Peça fina		
	Peça assimétrica		
	Dobrada		
Anomalias na cauda	Pequena		
	Curvada		
	Enrolada		
Restos citoplasmáticos			

Tabela 5 – Ilustrações de espermatozoides anómalos e normais, de acordo com cada grupo de anomalia. Adaptado de World Health Organization (2010) e de Silverberg & Turner (2009).

A morfologia dos espermatozoides está relacionada com o seu potencial de fertilização (World Health Organization, 2010), não sendo no entanto uma verdade absoluta em relação à fecundidade masculina. Juntamente com a motilidade e a vitalidade formam um diagnóstico mais fiável (Mortimer and Menkveld, 2001). Sabe-se que espermatozoides anormais têm tendência para apresentar problemas de motilidade, devido a cabeças anormais (influenciam o equilíbrio hidrodinâmico), anomalias na cauda (diminuem ou impossibilitam a motilidade) ou ineficiência na produção de energia (Katz *et al.*, 1982). Para além dos associados problemas de progressão, os espermatozoides anormais apresentam também dificuldades na ligação à zona pelúcida (Franken *et al.*, 1989). Uma boa morfologia também não é significado lógico de uma gravidez. Num exemplo dado por Mortimer & Menkveld (2001), um homem com a síndrome de Kartagener⁹, embora produza espermatozoides morfologicamente normais, estes não serão funcionais e, conseqüentemente, as probabilidades desse paciente atingir uma gravidez de forma natural são muito baixas, pois os seus espermatozoides não terão movimento.

2.1.3. Valores de referência e terminologia

A World Health Organization (2010) lançou os limites de referência para a classificação de uma amostra seminal como normal, que estão apresentados na tabela 6.

Limites mínimos de referência para as características seminais	
Liquefação (aos 60 minutos)	Completa
Aparência	Homogénea, cinzenta, opalescente
Volume seminal (mL)	1,5 (1,4 – 1,7)
Viscosidade	Cai da pipeta em pequenas gotas
Número total de espermatozoides (10 ⁶ por ejaculado)	39 (33 – 46)
Concentração de espermatozoides (10 ⁶ por mL)	15 (12 – 16)
Motilidade total (PR + PL, %)	40 (38 – 42)
Motilidade progressiva (PR, %)	32 (31 – 34)
Vitalidade (espermatozoides vivos, %)	58 (55 – 63)
Morfologia (formas normais, %)	4 (3,0 – 4,0)
pH	≥7,2
Leucócitos (10 ⁶ por mL)	<1,0

Tabela 6 – Limites de referência para o espermograma. PR – progressivos rápidos; PL – progressivos lentos. Adaptado World Health Organization (2010).

⁹ A síndrome de Kartagener, atualmente designada por discinesia primária ciliar (DPC), é uma doença genética associada à ultraestrutura e função deficientes dos cílios e à doença crónica do ouvido médio, peito e pulmões (Noone *et al.*, 2004). A situação de *situs inversus* (ocorre durante o desenvolvimento fetal, levando à formação de certos órgãos, ou todos, no seu lugar simétrico) ocorre de forma aleatória em cerca de 50% dos pacientes de DPC (Noone *et al.*, 2004).

Existe também uma terminologia específica para classificar os vários diagnósticos após o resultado do espermograma:

Terminologia¹⁰	Diagnóstico
Aspermia	Ausência de ejaculado
Astenozoospermia	Número de ez progressivos abaixo do LR
Azoospermia	Ausência de ez no ejaculado
Criptozoospermia	Ausência de ez no ejaculado a fresco, mas observados após centrifugação, ou seja, em número muito reduzido
Hiperspermia	>6 mL de ejaculado
Hipospermia	Volume do ejaculado <0,5 mL
Necrozoospermia	Elevada percentagem de ez mortos
Normozoospermia	Ejaculado com valores de motilidade, concentração e morfologia acima dos LR
Oligozoospermia	Concentração de ez abaixo do LR
Polizoospermia	>250 milhões de ez por mL
Teratozoospermia	Percentagem de ez morfologicamente normais abaixo do LR

Tabela 7 – Terminologia comumente utilizada para diagnosticar os pacientes subférteis ou inférteis. Ez – espermatozoides; LR – limite de referência. Adaptado de Jeyendran (2003) e de World Health Organization (2010).

2.1.4. Software CASA

Com vista a uma maior precisão na avaliação de amostras de sémen, foi criado um programa informático denominado CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), que tem como objetivo padronizar a análise e torná-la reproduzível para a concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides (Silverberg and Turner, 2009). Apresenta duas vantagens principais, em relação aos métodos manuais: elevada precisão e fornecimento de dados quantitativos sobre os parâmetros cinéticos dos gâmetas (World Health Organization, 2010). Contudo, esta técnica requer o uso de equipamento especializado, sendo esta uma das razões pela qual este sistema ainda não se encontra implementado como rotina num laboratório de RHA, para além das questões que têm sido levantadas relativamente à sua validade e reprodutibilidade (Silverberg and Turner, 2009).

¹⁰ O sufixo “zoospermia” refere-se a características dos espermatozoides e o “spermia” refere-se ao ejaculado (World Health Organization, 2010).

2.2. Métodos de recolha de espermatozoides para utilização em técnicas de RHA

O método de eleição para a recolha da amostra seminal é a masturbação. Em situações especiais, devido a crenças religiosas, questões pessoais ou problemas psicológicos, poderá não ser possível a obtenção de uma amostra por esse processo. Nesses casos poderão ser utilizados preservativos de silástico sem espermicidas, especificamente fornecidos pelo laboratório, que funcionam como depósito de recolha de sémen durante o ato sexual (Gerris, 1999). Já o coito interrompido nunca deverá ser utilizado como método de colheita, uma vez que pode ocorrer perda das primeiras gotas de sémen (que são ricas em espermatozoides) e, também, contaminação bacteriológica (World Health Organization, 2010). Em casos de suspeita de ejaculação retrógrada (o sémen não é expelido pela uretra, alojando-se na bexiga) é possível proceder-se à centrifugação de urina após masturbação, confirmando-se assim o diagnóstico (Rowland *et al.*, 2010). Esta patologia pode ser congénita ou adquirida, como por exemplo em homens diabéticos (Gerris, 1999), e poderá estar associada a hipospermia ou ausência de ejaculado (Barazani *et al.*, 2012). Existem também outros dois métodos, a vibroejaculação e a eletroejaculação. O primeiro consiste na deposição de um vibrador na glândula do pénis durante alguns minutos ou até a ejaculação ocorrer (Barazani *et al.*, 2012). É o método aconselhado para pacientes que tenham lesões na medula espinal (mas que mantenham a habilidade de desencadear uma ereção), com diferentes taxas de sucesso consoante a lesão (Barazani *et al.*, 2012). Já a eletroejaculação é uma alternativa à vibroejaculação, com indicações médicas similares, mas principalmente para indivíduos que perderam a capacidade de ter uma ereção. Neste caso, é colocada uma sonda elétrica no reto, ligada a uma fonte de energia, que irá exercer estímulos principalmente na próstata, provocando a ejaculação. Este procedimento envolve anestesia geral (Barazani *et al.*, 2012).

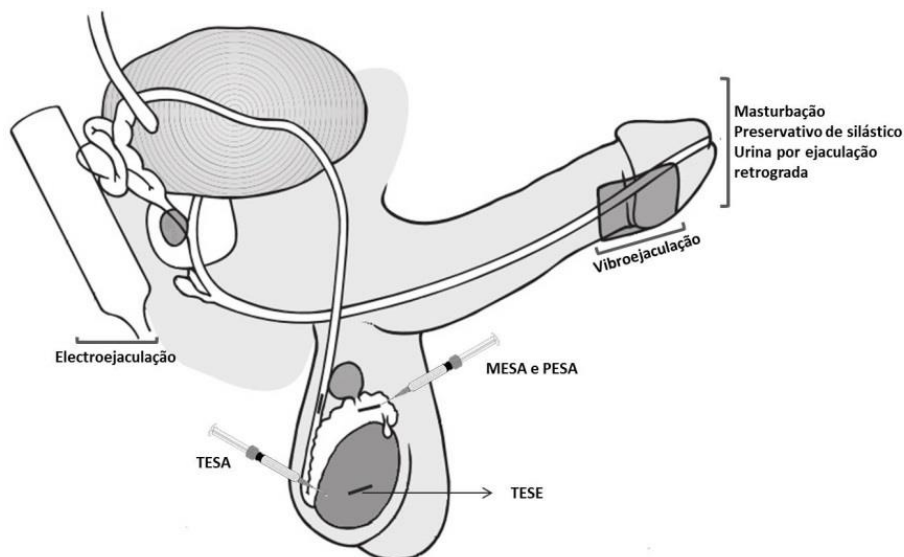


Figura 12 – Métodos de recolha de espermatozoides para aplicação em técnicas de RHA. TESA – aspiração de espermatozoides do testículo; MESA – aspiração de espermatozoides do epidídimo por microcirurgia; PESA – aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo. Adaptado de Bourne *et al.* (2009).

Os métodos cirúrgicos, como a TESE são também uma opção para a obtenção de espermatozoides, especialmente indicado para pacientes com azoospermia.

MESA Aspiração de Espermatozoides do epidídimo por microcirurgia	• azoospermia obstrutiva; • boas taxas de fertilização e gravidez; • demorado, oneroso, exige anestesia geral e com elevada morbilidade.
PESA Aspiração Percutânea de Espermatozoides	• azoospermia obstrutiva; • mais simples que a MESA e apenas anestesia local; • elevado risco de hematoma e dificuldade em controlar o volume de espermatozoides aspirado.
TESA Aspiração de Espermatozoides do testículo	• azoospermia obstrutiva e secretora; • simples e rápido; • difícil controlar número de células aspiradas e possível dano causado nos espermatozoides devido à pressão negativa exercida.
TESE Biópsia testicular	• azoospermia obstrutiva e secretora; • requer anestesia local; • simples e rápido; • método mais utilizado atualmente.

Esquema 2 – Métodos cirúrgicos de obtenção de espermatozoides diretamente do epidídimo ou do testículo. Adaptado de Mansour (1998) e Esteves & Varghese (2012).

A MESA foi o primeiro método utilizado para a obtenção cirúrgica de espermatozoides diretamente do epidídimo, que acabou por ser substituída pela PESA (Mansour, 1998). Contudo, estes dois métodos apenas dão resposta a casos de azoospermia obstrutiva. Assim, foi desenvolvida a TESA e a TESE, recolhendo-se espermatozoides diretamente do testículo.

2.2.1. Biópsia testicular

Hoje em dia, a técnica mais utilizada para obtenção de espermatozoides em pacientes diagnosticados com azoospermia é a TESE. Durante o procedimento, realizado por um médico da especialidade, são retirados fragmentos testiculares, sob o efeito de anestesia local. Estes são levados para o laboratório, onde são macerados. Assim, possíveis espermatozoides que estejam presentes nos túbulos seminíferos são libertados para o meio de cultura. A amostra é depois analisada ao microscópio invertido, procedendo-se a uma procura exaustiva de espermatozoides (figura 13). Independentemente de serem encontrados gâmetas nas alíquotas observadas ao microscópio, realiza-se uma centrifugação de todo o meio resultante do procedimento. No caso de serem encontrados espermatozoides, o ideal seria a punção folicular ser realizada no próprio dia, inseminando-se os ovócitos com espermatozoides a fresco. Mas tal não é possível, pois caso não sejam encontrados espermatozoides após a TESE, haveria desperdício dos ovócitos puncionados. Logo, a criopreservação da polpa testicular é o procedimento a seguir. Estes espermatozoides poderão ser empregues em futuros ciclos de tratamento, com taxas aceitáveis de sucesso (Salom, 2004).

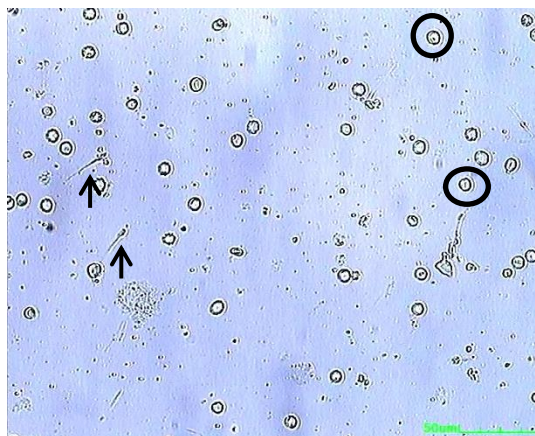


Figura 13 – Visualização do conteúdo dos túbulos seminíferos após TESE, onde são visíveis glóbulos vermelhos (círculos) e alguns espermatozoides (setas). A fotografia é propriedade do Centro de Estudos de Infertilidade e Esterilidade (CEIE) e foi reproduzida com permissão.

2.3. Preparação da amostra de sémen para técnicas de RHA

O processamento da amostra para utilização num tratamento de infertilidade é muito importante, pois permite a separação funcional e morfológica dos espermatozoides, para além da sua separação do resto do conteúdo do plasma seminal. Quando as barreiras naturais são ultrapassadas, alguns componentes do plasma seminal tornam-se um obstáculo para que a fecundação aconteça (World Health Organization, 2010). É, portanto, importante que o processamento comece, no máximo, uma hora após a ejaculação. Segundo Henkel & Schill (2003), a técnica ideal de separação da amostra seminal deve possuir as seguintes características:

- Ser rápida, simples e rentável;
- Isolar o maior número possível de espermatozoides móveis;
- Não causar danos nos espermatozoides selecionados;
- Excluir espermatozoides mortos e outras células (leucócitos ou bactérias);
- Eliminar substâncias tóxicas ou bioativas (fatores de descapacitação ou espécies reativas de oxigénio);
- Permitir o processamento de amostras de volume elevado.

Contudo, não é fácil preencher todos estes requisitos e acaba por ser necessário utilizar mais do que uma técnica de modo a obter um número satisfatório de espermatozoides funcionalmente competentes (Henkel and Schill, 2003).

Após a recolha da amostra é necessário aguardar até a liquefação estar completa. De seguida é realizada uma breve avaliação, de modo a verificar se os parâmetros de motilidade e concentração estão de acordo com anteriores espermogramas (podendo ocorrer alteração da técnica a utilizar, por exemplo uma FIV passar a ser ICSI devido a uma menor qualidade espermática no dia do tratamento). É também através desta rápida análise que se decide o volume de cada gradiente a utilizar (em casos de número muito reduzido de espermatozoides, utiliza-se um volume inferior dos gradientes, para aproveitar o maior número possível de espermatozoides) e as condições de centrifugação (por exemplo, amostras com viscosidade elevada podem ser centrifugadas durante um período mais longo) (World Health Organization, 2010).

O processamento dos gametas masculinos inclui a passagem da amostra por uma coluna de gradientes de densidade descontínuos (constituídos por partículas de sílica, revestidas por silano), separando as células pela sua densidade. Este é o método que melhor permite a seleção de espermatozoides de boa qualidade (World Health Organization, 2010). Ao contrário dos gradientes utilizados nos laboratórios de RHA até há uns anos (cujo seu uso é agora proibido, pois poderiam ter efeitos prejudiciais

nas membranas dos espermatozoides), estes são ajustados para a osmolaridade, têm baixa toxicidade e são aprovados para o uso em humanos *in vivo* (Henkel and Schill, 2003).

Os gradientes são preparados em duas concentrações diferentes, 40% e 80% (o gradiente de maior densidade é colocado sob o de menor densidade e a amostra sobre ambos), de modo a separar os espermatozoides dos outros constituintes da amostra seminal. Esta separação é conseguida através de uma centrifugação (25 minutos, 1200 rpm, 35°C). Após este passo, na maioria dos casos, é bem visível um *pellet*¹¹ (composto por espermatozoides móveis) e o sobrenadante é formado por duas fases (os detritos celulares e os espermatozoides imóveis ficam aprisionados entre os gradientes e o plasma seminal encontra-se no topo da coluna) (World Health Organization, 2010) (figura 14). Retira-se o sobrenadante, tendo o cuidado de não perturbar o *pellet* e procede-se à sua lavagem com meio de cultura, através de uma nova centrifugação, nas mesmas condições do passo anterior, mas por apenas 10 minutos. A lavagem tem o propósito de remover qualquer partícula (como por exemplo a sílica) prejudicial aos espermatozoides. Terminada a centrifugação, o sobrenadante

é novamente descartado, com muito cuidado e procede-se a um tipo de seleção que se denomina de “*swim-up*”. De forma gradual e sobre o *pellet*, adiciona-se um meio ótimo para a motilidade dos espermatozoides (figura 15). A quantidade a acrescentar depende da quantidade e da qualidade do *pellet*, assim como da técnica de RHA que irá ser realizada, sendo normalmente 0,5 mL. Por fim, o tubo é colocado numa estufa em condições ótimas, num ângulo de 45° (o que vai permitir uma maior área de contacto entre

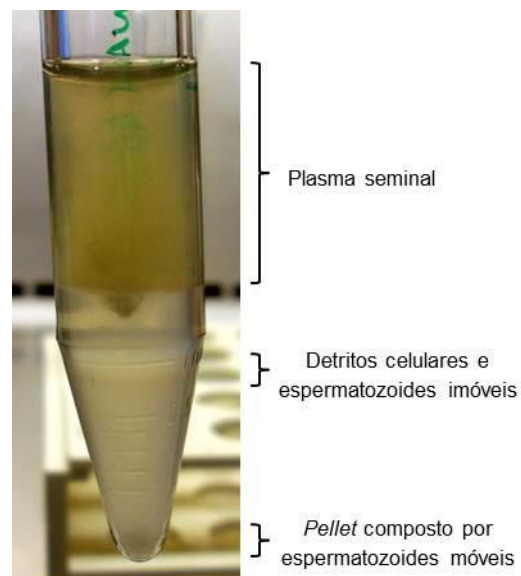


Figura 14 – Amostra seminal após centrifugação, sendo visíveis os diferentes constituintes separados.

o meio e os espermatozoides) e com a tampa entreaberta, para possibilitar a troca de gases (figura 16). A incubação tem uma duração mínima de 30 minutos, não devendo ultrapassar as 2 horas, pois leva a um aumento dos danos no ADN (Nabi *et al.*, 2014). Durante o *swim-up*, os espermatozoides mais rápidos irão deslocar-se para o topo da coluna de meio (World Health Organization, 2010), sendo depois aspirado apenas o sobrenadante para inseminação dos ovócitos. Esta técnica apresenta resultados muito

¹¹ Quando não é possível observar-se o *pellet* ou este é muito reduzido, opta-se por descartar apenas o gradiente de menor densidade, ou seja, aquele que está mais a cima na coluna de meio.

bons, no que diz respeito à obtenção de espermatozoides móveis e morfologicamente normais, contudo depende das características iniciais da amostra (Henkel and Schill, 2003).

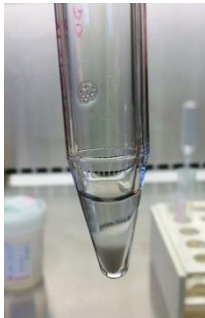


Figura 15 – Amostra preparada para o *swim-up*, onde é visível o *pellet*.

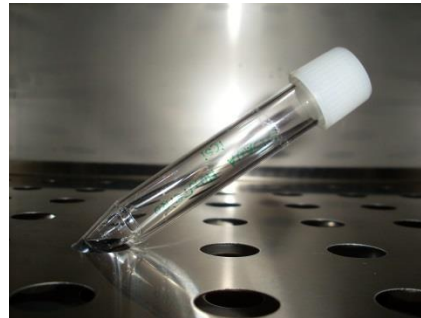


Figura 16 – Amostra em incubação na estufa durante o *swim-up*.

2.4. A inseminação intrauterina

O objetivo desta técnica passa por depositar o maior número possível de espermatozoides normais e com motilidade rápida, o mais próximo dos ovócitos. É a técnica mais simples e com menos custos. Pode ser realizada durante um ciclo natural ou com recurso à indução da ovulação (pretende-se a maturação de apenas um ou dois folículos) através de medicação hormonal (Bayer, 2007). Durante todo o protocolo de estimulação são realizadas várias monitorizações, de modo a controlar rigorosamente o número de folículos que se desenvolve (Bayer, 2007). No dia previsto para que a ovulação ocorra, a amostra de sêmen é recolhida e tratada no laboratório, de modo a remover prostaglandinas e possíveis microrganismos e a potenciar a qualidade da amostra (Bayer, 2007), através das técnicas de separação por densidade de gradientes e de *swim-up* (como descrito anteriormente). O sobrenadante é aspirado para uma seringa e será depositado no útero, através de um cateter, no caso da realização de uma IIU (a mais utilizada hoje em dia). Existe também a possibilidade dos espermatozoides serem depositados na vagina, no canal cervical ou nas trompas. Esta técnica é utilizada em casos de fatores masculinos (disfunção ejaculatória (Bayer, 2007)) ou femininos (muco cervical hostil) ligeiros, em casos de infertilidade inexplicada (Torgal *et al.*, 2012) e em casais serodiscordantes (Savasi *et al.*, 2013a). A IIU pode ser homóloga (os gametas masculinos pertencem ao marido da paciente) ou, em casos de azoospermia, pode recorrer-se ao uso de esperma de dador, passando a designar-se por IIU-heteróloga. O sucesso desta técnica está relacionado com a idade do casal, com os parâmetros espermáticos da amostra inseminada, com o tipo de estimulação realizada (Bayer, 2007) e com a causa de infertilidade e a sua duração.

3. O laboratório de embriologia

3.1. A estimulação ovárica e a punção folicular

Os gametas femininos, os ovócitos, são produzidos nos ovários. No início de cada período fértil, vários folículos são recrutados e vão-se desenvolvendo por ação da FSH. Um desses folículos irá evoluir mais rapidamente, significando um maior número de células da granulosa e, conseqüentemente, de recetores para a FSH. Quando os níveis de FSH começam a diminuir, por ação do *feedback* negativo exercido pelos estrogénios (produzidos pelas células da granulosa), o folículo dominante será o único que continuará a sua maturação, pois possui recetores suficientes. Como a produção de estrogénios aumenta cada vez mais (devido à proliferação das células da granulosa do folículo dominante), estes passam a exercer um *feedback* positivo na hipófise anterior, ocorrendo um pico das gonadotrofinas, com mais ênfase da LH. Deste modo, a LH vai estimular a maturação final do ovócito e a sua libertação para a trompa, ou seja, a ovulação. O complexo cumulus-corona-ovócito (CCCO) permanece na trompa até ser fecundado.

A indução da poliovulação é indicada para pacientes que sofram de anovulação (ausência de ovulação) ou disovulação (insuficiência do corpo amarelo) (Sampaio et al., 2012). Segundo a OMS, a anovulação pode ser classificada de acordo com os seguintes grupos:

Grupo	Diagnóstico	Perfis hormonais
I	Hipogonadismo hipogonadotrófico	↓gonadotrofinas; ↓estrogénios
II	Disfunção hipotálamo-hipofisária	→gonadotrofinas; →estrogénios
III	Falência ovárica	↑gonadotrofinas; ↓estrogénios
V e VI	Hiperprolactinemia	com ou sem prolactinoma ¹²
VII	Amenorreia com tumor hipotálamo hipofisário	→prolactina

Tabela 8 – Classificação da anovulação em vários grupos. ↓ - concentração baixa; → - concentração normal; ↑ - concentração elevada. Adaptado de Sampaio et al. (2012).

A aplicação de um protocolo de estimulação com vista à indução da poliovulação é realizada por um médico da especialidade, tendo em conta a causa de infertilidade e o historial de cada casal. A poliovulação é definida como “a estimulação do desenvolvimento de vários folículos e a conseqüente libertação dos CCCO” (Oskowitz,

¹² Prolactinoma é um tumor hipofisário predominantemente benigno (Laway and Mir, 2013).

2007). Ao longo de todo o processo são administrados fármacos que visam o recrutamento e o desenvolvimento dos folículos. Os fármacos mais utilizados são:

- **Citrato de clomifeno (CC)** – é um análogo do estrogénio, que estimula a função ovulatória. O seu mecanismo de ação consiste na redução do feedback negativo exercido pelos estrogénios, uma vez que o CC vai ligar-se aos recetores destes esteroides no hipotálamo (Shoham and Howles, 2009). Assim ocorre um aumento da produção de GnRH, que por sua vez leva a uma maior libertação de FSH e LH, que irão estimular o desenvolvimento folicular. Os resultados deste tipo de terapêutica apontam para que a ovulação seja induzida com sucesso em 70 a 92% das mulheres anovulatórias. No entanto as taxas de gravidez não são tão otimistas (Shoham and Howles, 2009);

- **Gonadotrofinas exógenas** – indicadas para pacientes do grupo I (tabela 8) e para mulheres com SOP resistente ao CC (Sampaio et al., 2012). Estão disponíveis a HMG (extrato purificado de urina humana pós menopausa, que contém FSH e LH); a FSH isolada (recombinante e altamente purificada) e a LH isolada (Alper, 2007);

- **Protocolo com agonista da GnRH** – leva à diminuição da produção de LH e FSH endógenas pela hipófise e impede o surgimento do pico de LH, caso a sua administração seja prolongada (Alper, 2007). É considerado um protocolo longo, pois a supressão da atividade da hipófise é gradual;

- **Protocolo com antagonista da GnRH** – leva à supressão instantânea da produção de FSH e de LH (Alper, 2007). É administrado em conjunto com gonadotrofinas, sendo a sua principal vantagem a supressão do pico de LH. Atua de forma muito mais rápida do que os agonistas (Alper, 2007), sendo considerado um protocolo curto;

- **Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG)** – tem função semelhante à LH (Bayer et al., 2007).

Ao longo do protocolo de estimulação ovárica são realizadas várias avaliações ultrassonográficas dos ovários, permitindo ao médico controlar o desenvolvimento folicular e ir adaptando a medicação consoante a resposta ovárica da paciente. Quando os folículos se encontram no seu estado de desenvolvimento mais avançado (possuem um diâmetro entre 16 a 18mm), é administrada a hCG (Sampaio et al., 2012) e a punção folicular é marcada para aproximadamente 36 horas após a injeção (Alper, 2007). Esta medicação tem função semelhante ao pico de LH nos ciclos naturais, ou seja, vai promover a maturação final dos folículos e a sua rutura (Alper, 2007). Contudo, a ovulação não chega a ocorrer naturalmente, pois a punção folicular é marcada para algumas horas antes (Alper, 2007). A resposta de cada paciente ao protocolo que lhe foi proposto é difícil de prever, dependendo de mulher para mulher.

As pacientes que apresentam uma resposta insuficiente fazem parte do grupo das más respondedoras¹³, sendo o protocolo adaptado a cada caso ainda durante o tratamento ou nos seguintes. Já aquelas que têm uma resposta exagerada (desenvolvimento de um número elevado de folículos) correm o risco de sofrer da Síndrome de Hiperestimulação Ovária (SHO)¹⁴. Esta é desencadeada pela injeção de hCG e está relacionada com um conjunto de mediadores de permeabilidade capilar dependentes desta hormona (Soares et al., 2012).

Durante a punção folicular, realizada por via vaginal, sob efeito de anestesia geral e com controlo ecográfico, é aspirado todo o conteúdo dos folículos maduros (Alper, 2007) (figura 17 e 18). Quando o procedimento termina, a paciente fica em recobro durante algum tempo, ao fim do qual tem alta e pode fazer a sua vida de forma normal, evitando grandes esforços nas horas seguintes.

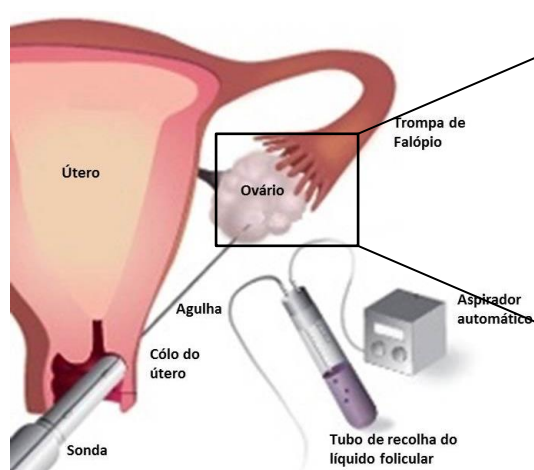


Figura 17 – Punção folicular¹⁵.

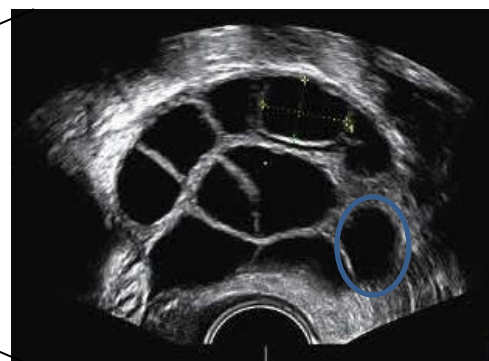


Figura 18 – Vista ecográfica de um ovário com vários folículos prontos a serem aspirados. Cada formação preta é um folículo (circundado a azul)¹⁶.

Já no laboratório, durante a pesquisa dos CCCO no líquido folicular, é realizada uma avaliação inicial da maturação ovocitária, baseada na expansão das células do cumulus e da corona (figura 19 e 20). Após a pesquisa, lavagem e quantificação, todos os CCCO são mantidos em cultura (37°C, 5% O₂, 6% CO₂ e saturação de humidade) até ao procedimento seguinte.

¹³ Uma paciente é definida como má respondedora se preencher dois dos seguintes critérios: idade ≥ 40 anos ou outro fator de risco para este diagnóstico; ciclo anterior com ≤ 3 ovócitos com um protocolo normal de estimulação; reserva ovárica anormal (Ferraretti et al., 2011).

¹⁴ Segundo Zegers-Hochschild et al. (2009), a SHO é definida como uma “resposta sistémica exagerada à estimulação ovárica caracterizada por um vasto espectro de manifestações clínicas e laboratoriais, entre as quais distensão abdominal, aumento dos ovários e complicações respiratórias, hemodinâmicas e metabólicas”.

¹⁵ Imagem obtida do site <http://www.fertilityhandbook.com/pages/mini-ivf-minimal-stimulation-ivf/mini-ivf-procedural-overview.php>, acedido no dia 28/06/2014.

¹⁶ Imagem obtida do site <http://www.advancedfertility.com/aspiration.htm>, acedido a 10/09/2014.

3.2. Avaliação da maturidade ovocitária

A primeira avaliação da maturação dos ovócitos é realizada durante a sua pesquisa no líquido folicular, como referido anteriormente. Esta classificação é realizada de acordo com a expansão e o número de células do cumulus e da corona (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011) e pode ser dividida em duas categorias:

- **Má:** as células do cumulus e da corona encontram-se contraídas ou pouco expandidas e de cor escura. Geralmente, ovócitos em metafase I (MI) ou em vesícula germinativa (VG) apresentam este tipo de morfologia. Contudo, poderão ser inseminados em ciclos de FIV, pois existe a possibilidade de atingirem a fase de maturação ideal durante a incubação dos ovócitos com os espermatozoides (figura 19);

- **Boa:** ovócito na fase ideal de maturação. A corona encontra-se muito expandida e com um grande número de células. As células do cumulus apresentam-se como uma massa viscosa e macia. Esta morfologia é característica de ovócitos em metafase II (MII) (figura 20).

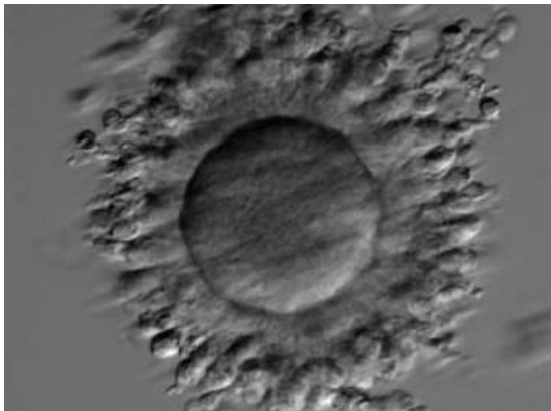


Figura 19 – Ovócito imaturo com as células da corona e do cumulus compactas e contraídas. Imagem retirada de Rienzi *et al.* (2012).

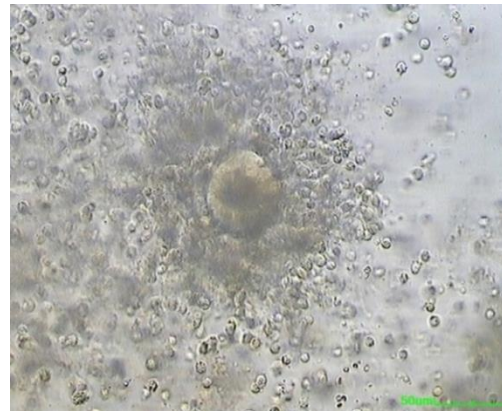


Figura 20 – Células do cumulus e da corona bem expandidas, denunciando um ovócito maduro. A fotografia é propriedade do CEIE e foi reproduzida com permissão.

3.3. A fertilização *in vitro*

Este procedimento inicia-se com a indução da poliovulação (cujo objetivo é recrutar vários folículos de modo a obter um número de ovócitos razoável para inseminar, produzindo-se um número de embriões aceitável e, consequentemente, aumentando a probabilidade de sucesso (Alper, 2007)), através de estimulação

hormonal, e a realização de uma punção folicular. No mesmo dia deste último procedimento é também recolhida a amostra de sémen, que é processada como descrito anteriormente (técnicas de densidade de gradientes e de *swim-up*). A FIV é indicada em casos de anteriores insucessos após IIU, na presença de uma obstrução tubária bilateral, para casos de disfunção ovárica ou de endometriose, na presença de fator masculino não grave e em casos de infertilidade inexplicada (Galán *et al.*, 2008). Não será indicada para pacientes com astenozoospermia, teratozoospermia e criptozoospermia, pois os espermatozoides não serão suficientes e/ou não terão a capacidade de fecundar os ovócitos e produzir embriões de boa qualidade.

Os CCCO são inseminados com os gametas masculinos previamente tratados, aproximadamente três horas após a punção folicular, pois pensa-se que este tempo de incubação entre os dois procedimentos leva ao aumento das taxas de sucesso (Dozortsev *et al.*, 2004). Para determinar qual o volume de espermatozoides a adicionar aos CCCO (a inseminação é realizada numa placa de quatro poços e, no máximo, cada poço pode conter cinco CCCO e 0,5 mL de meio de cultura), de modo a obter-se uma concentração de 50 a 100 000 espermatozoides/mL, é necessário calcular a concentração dos gametas após o *swim-up*. Para tal recorre-se a uma câmara de Neubauer-improved e conta-se o número de espermatozoides progressivos rápidos em cinco quadrados. Por fim, calcula-se o volume necessário a adicionar do *swim-up* para obter a concentração final desejada, de acordo com a seguinte fórmula simplificada: **$1 \div \text{número total de espermatozoides contados}$** . Os gametas masculinos e femininos são depois mantidos em condições controladas de O₂, CO₂, temperatura e humidade.

No dia seguinte, aproximadamente 17±1 horas após a inseminação (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011), os ovócitos são desnudados, ou seja, são separados das células do cumulus e da corona. Este procedimento é realizado sem recurso a substâncias sintetizadas, uma vez que os espermatozoides ao fecundarem os ovócitos já libertam enzimas que irão facilitar a remoção dessas células extracelulares (figura 21). Após a desnudação é possível verificar a ocorrência de fecundação, que é assinalada pela presença de dois pronúcleos (PN) e de dois glóbulos polares (GP) (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). Os pré-zigotos serão mantidos em cultura até ao dia da transferência, que pode ser realizada entre dois a cinco dias após a inseminação.



Figura 21 – Ovócito no dia seguinte à realização da FIV, onde é possível ver que as células da corona e do cumulus já se encontram desprendidas do ovócito, por ação de enzimas libertadas pelos espermatozoides. A fotografia é propriedade do CEIE e foi reproduzida com permissão.

3.4. A microinjeção intracitoplasmática de espermatozoides

Esta técnica é a mais recente e complexa, em relação às anteriormente descritas (IIU e FIV). Para este procedimento é necessário equipamento especializado para micromanipulação a 3D, que consiste (Barnes, 2009):

- Microscópio invertido com ampliação e contraste adequados à realização da técnica (figura 22);
- Micropipetas de vidro que permitam o manuseamento dos gâmetas (figura 23);
- Micromanipuladores com um sistema hidráulico, permitindo um movimento suave (figura 24).



Figura 22 – Microscópio invertido para micromanipulação de gâmetas e embriões. Este equipamento é propriedade do CEIE e foi reproduzido com permissão.

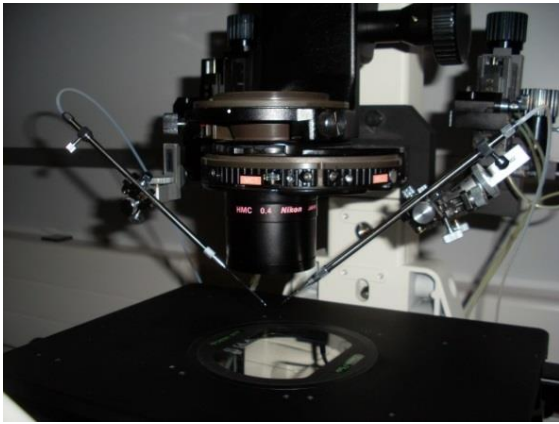


Figura 23 – Micropipetas de vidro montadas no microscópio invertido. Estas são utilizadas na micromanipulação de gâmetas e embriões. Este equipamento é propriedade do CEIE e foi reproduzido com permissão.

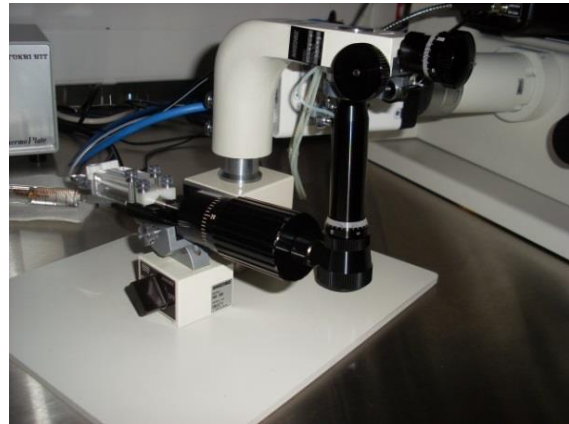


Figura 24 – Micromanipuladores do microscópio invertido, através dos quais é possível movimentar as micropipetas e aspirar ou rejeitar meio de cultura. Este equipamento é propriedade do CEIE e foi reproduzido com permissão.

É também essencial um estereomicroscópio (figura 25), para manusear os gâmetas entre placas, e um ambiente favorável à micromanipulação, com temperatura e atmosfera controladas (figura 26), uma vez que os ovócitos são células muito sensíveis a diferenças de temperatura devido ao facto de se encontrarem em plena meiose (parados em metafase II) (Barnes, 2009).



Figura 25 – Estereomicroscópio. Este equipamento é propriedade do CEIE e foi reproduzido com permissão.



Figura 26 – Bancada aquecida (zona mais clara) junto ao estereomicroscópio, com controlo da atmosfera (comandos de controlo da temperatura, luz e ventilação no plano mais próximo da imagem). Este equipamento é propriedade do CEIE e foi reproduzido com permissão.

A ICSI é aconselhada na presença de fator masculino grave, após obtenção de espermatozoides de TESE, depois de falhas de fecundação em FIV, para realização posterior de diagnóstico genético pré-implantação (DGPI), para inseminação de

ovócitos criopreservados, entre outras indicações (Zulategui *et al.*, 2008). Como acontece numa FIV, é realizada a indução da poliovulação e a punção folicular. A amostra de sêmen é recolhida no dia da punção e tratada no laboratório. No caso de ser necessário descongelar os gametas masculinos, o procedimento é também realizado no dia da punção folicular.

Previamente à realização da ICSI propriamente dita, os ovócitos são desnudados, ou seja, são desagregados das células do cumulus e da corona, após um período de pré-incubação (que se pensa levar a um aumento da taxa de fertilização (Dozortsev *et al.*, 2004)). Este procedimento facilita a avaliação da maturação ovocitária (apenas os ovócitos que se encontram em MII (apresentam um GP) serão inseminados) e também o manuseamento dos gametas durante a micromanipulação (Gómez *et al.*, 2008). A desnudação é realizada com recurso a um método misto, sendo primeiramente enzimático e depois mecânico (Gómez *et al.*, 2008). Os CCCO são incubados durante alguns segundos numa solução que contém a enzima hialuronidase (Hyase™, Vitrolife, Suécia). Esta vai enfraquecer as ligações intercelulares da corona e do cumulus, facilitando a sua remoção (Taylor *et al.*, 2006). Após este passo, os CCCO são lavados em meio de cultura, realizando-se sucessivas pipetagens para que ocorra remoção mecânica das células do cumulus e da corona. Após este processo, os ovócitos são avaliados com precisão quanto à sua maturação (VG, MI ou MII) e posteriormente mantidos em cultura (37°C, 5% O₂, 6% CO₂ e saturação de humidade) até à execução da ICSI.

O desempenho laboratorial da ICSI envolve a escolha dos melhores espermatozoides (figura 27), o esmagamento da sua cauda (figura 28) e posterior introdução (através da pipeta ICSI) direta no citoplasma do ovócito (que está a ser segurado pela pipeta holding) (figura 29 e figura 30). Um único espermatozoide é introduzido num único ovócito.

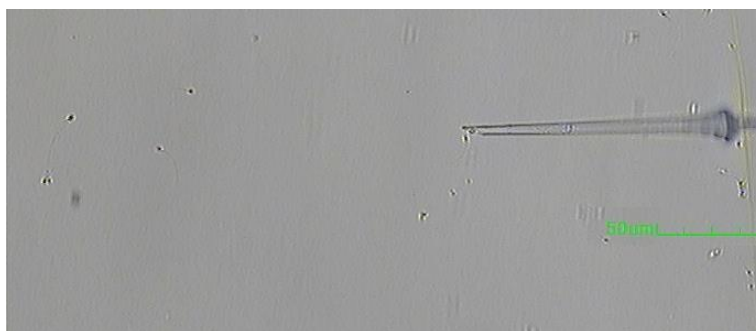


Figura 27 – Espermatozoides móveis no meio ICSI™ (Vitrolife, Suécia; meio viscoso que não permite uma motilidade tão acelerada) a serem selecionados morfologicamente e aspirados para a pipeta de ICSI.

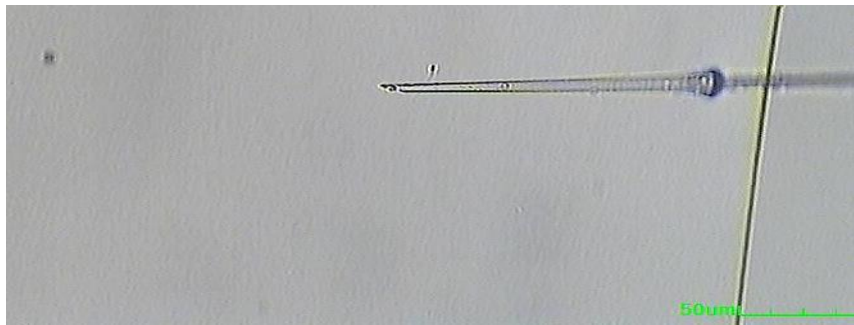


Figura 28 – Após a seleção dos melhores espermatozoides, é necessário proceder ao esmagamento da cauda (com a pipeta de ICSI), de modo a facilitar a sua manipulação e a descondensação do núcleo e, também, para que não altere a estrutura do ovócito após a introdução no citoplasma (Palermo *et al.*, 1996).



Figura 29 – Microinjeção do ovócito. Este está a ser segurado pela pipeta holding e a pipeta ICSI, com o espermatozoide no seu interior, encontra-se prestes a perfurar o ovócito.

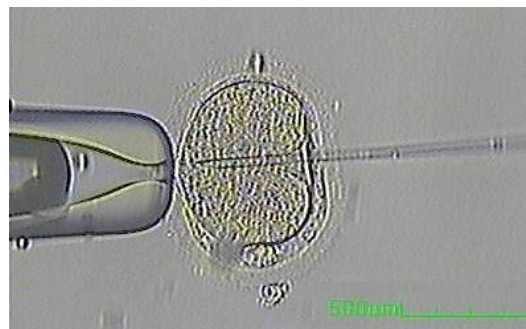


Figura 30 – Microinjeção do ovócito, onde a pipeta de ICSI já está dentro deste. É necessário ocorrer aspiração de algum citoplasma para envolver o espermatozoide e para garantir que a membrana citoplasmática do ovócito foi rompida (Zulategui *et al.*, 2008).

A seleção do espermatozoide a injetar no ovócito baseia-se em duas características muito importantes, a motilidade e a morfologia. Contudo, a ICSI não permite escolher os gâmetas de acordo com a sua funcionalidade, pois espermatozoides morfologicamente normais poderão possuir danos na informação genética (Charehjooy *et al.*, 2014). Tendo em conta que danos na membrana (provocados por agentes tóxicos ou por espécies reativas de oxigénio) também afetam a integridade do ADN (Nasr-Esfahani *et al.*, 2002), Charehjooy *et al.* (2014) desenvolveram um estudo evidenciando as potencialidades da utilização de um HOS prévio a todas as ICSI como

um método melhorado para a seleção dos gametas com maior potencial. Recentemente também surgiu uma técnica melhorada com o nome de injeção intracitoplasmática de espermatozoides em elevada ampliação (IMSI), que permite a seleção das células reprodutoras morfolologicamente normais ao nível de alguns organelos (acrossoma, porção pós-acrossoma, peça intermédia, cauda e núcleo) (Bartoov *et al.*, 2002), o que não era possível durante a ICSI. Deste modo, seria possível evitar a microinjeção de espermatozoides com danos, mas aparentemente normais, levando ao aumento das taxas de sucesso. Contudo, a IMSI é bastante demorada (Lo Monte *et al.*, 2013), a temperatura deve ser ajustada consoante a motilidade espermática e só é aplicada a espermatozoides móveis (Bartoov *et al.*, 2002). Segundo Teixeira *et al.* (2013), o uso clínico da técnica de IMSI ainda não é recomendado, devido à falta de estudos que comprovem o seu contributo para o aumento das taxas de sucesso. Sugerem ainda a realização de mais estudos científicos para se perceber os efeitos da IMSI na taxa de nascidos vivos, de gravidez clínica, de abortos e de anomalias congénitas.

3.5. Avaliação da maturidade e da qualidade ovocitária

Previamente à realização da ICSI e após a desnudação dos ovócitos, o estado de desenvolvimento destes é classificado de acordo com a maturidade nuclear (Gómez *et al.*, 2008):

- **Ovócitos em VG** (figura 31): a presença desta estrutura indica imaturidade ovocitária. Devido à inexistência de bons protocolos de maturação de ovócitos *in vitro*, estes não devem ser utilizados em técnicas de RHA (Gómez *et al.*, 2008);
- **Ovócitos em MI** (figura 32): não é visível a presença de VG, nem do primeiro GP no espaço perivitelino, o que indica que ainda não foi finalizada a primeira divisão meiótica, ou seja, o ovócito está imaturo. Muitas vezes são mantidos em cultura durante umas horas ou até ao dia seguinte, esperando-se que ocorra a extrusão do primeiro GP e, assim, seja plausível proceder-se à sua microinjeção (Strassburger *et al.*, 2004; De Vos *et al.*, 1999);
- **Ovócitos em MII** (figura 33): esta é a fase ideal de maturação ovocitária, pois é visível o primeiro GP no espaço perivitelino. Estes ovócitos estão aptos a ser microinjetados;
- **Ovócitos atrésicos** (figura 34): apresentam um citoplasma escuro (Gómez *et al.*, 2008) e muitas vezes encolhido. São automaticamente descartados.

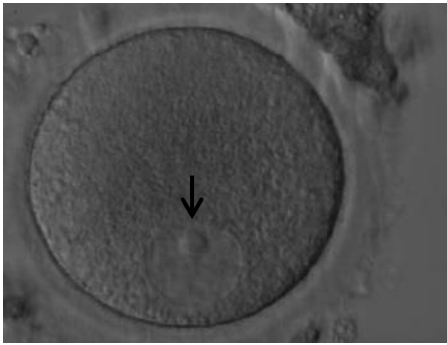


Figura 31 – Ovócito em VG (seta indica a vesícula germinativa). Imagem retirada de Rienzi *et al.* (2012).

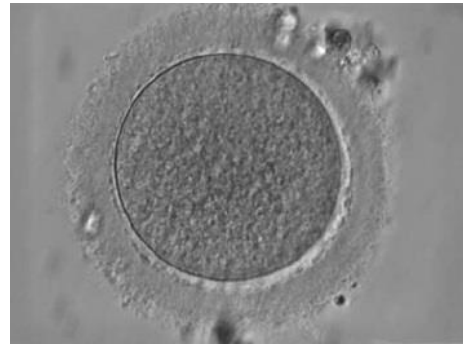


Figura 32 – Ovócito em MI, pela ausência de VG e do primeiro GP. Imagem retirada de Rienzi *et al.* (2012).

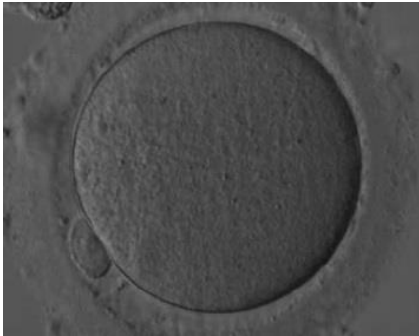


Figura 33 – Ovócito em MII, pela ausência de VG e pela presença do primeiro GP no espaço perivitelino. Imagem retirada de Rienzi *et al.* (2012).



Figura 34 – Ovócito atrésico, apresentando um citoplasma escuro e retraído¹⁷.

A desnudação permitiu observar e avaliar com melhor clareza os ovócitos, pois remove as suas células circundantes. Apesar de estarem documentadas diversas anomalias morfológicas, não existe uma relação direta e inequívoca entre estas e o potencial de fertilização e desenvolvimento do ovócito. No entanto, em alguns casos, como os ovócitos gigantes, é aconselhável que não sejam inseminados (Almeida *et al.*, 2012). Devido à falta de unanimidade em relação ao que é considerado um ovócito normal ou anormal, foram publicados os consensos de Istambul (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011), com o objetivo de criar critérios e conceitos na avaliação da qualidade ovocitária e embrionária. Assim, de acordo com os consensos, um ovócito ideal apresenta uma estrutura esférica, delimitado por uma zona pelúcida uniforme, com um citoplasma uniforme, translúcido e livre de inclusões e com o primeiro GP de tamanho normal. As anomalias ovocitárias são divididas em várias categorias, de acordo com os consensos de Istambul.

¹⁷ Imagem obtida do site http://www.lindenberg.dk/Nyheder_og_artikler/Det%20humane%20aeg.htm, acessado a 06/07/2014.

3.5.1. Anomalias extracitoplasmáticas

- **Zona pelúcida** - apenas cor ou espessura anormais deverão ser anotadas. Contudo, não são consideradas verdadeiras anomalias, pois existe muita variabilidade interespecífica (figura 35);
- **Espaço perivitelino** - a presença de inclusões no seu interior ou de um espaço muito aumentado deve ser anotada. Contudo, não existe um prognóstico específico para estas características (Rienzi *et al.*, 2011) (figura 36);
- **Primeiro GP** - quando tem um tamanho excecionalmente grande, o ovócito deve ser rejeitado, devido ao risco de aneuploidias (figura 37).



Figura 35 – ovócito com zona pelúcida muito espessa e densa¹⁸.

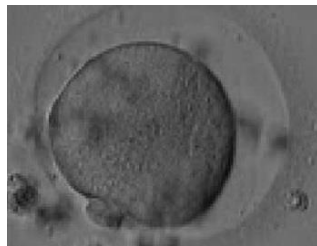


Figura 36 – Ovócito com espaço perivitelino aumentado. Imagem retirada de Rienzi *et al.* (2012).

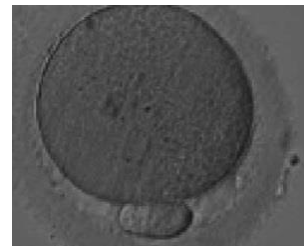


Figura 37 – Ovócito com o primeiro GP muito grande. Imagem retirada de Rienzi *et al.* (2012).

3.5.2. Anomalias intracitoplasmáticas

- **Citoplasma** – apenas dimorfismos muito acentuados relacionados com a granulosidade citoplasmática deverão ser anotados, pois estão relacionados com falhas no potencial de implantação. Dimorfismos mais leves, relacionados com a homogeneidade do citoplasma, podem resultar da variabilidade entre ovócitos e não significarem necessariamente uma anomalia (figura 38 e figura 39);
- **Corpo refrátil** – é definido como uma vesícula de lipofuscina e são considerados anómalos quando possuem um tamanho superior a 5µm (Almeida *et al.*, 2012) (figura 40);
- **Agregados de retículo endoplasmático liso tubular (AREL)** – devido à sua associação com anomalias fetais (Otsuki *et al.*, 2004), ovócitos com AREL múltiplos ou maiores do que 18µm não deverão ser inseminados (figura 41);

¹⁸ Imagem obtida do site http://www.lindenberg.dk/Nyheder_og_artikler/Det%20humane%20aeg.htm, acedido a 06/06/2014

- **Vacúolos** – a presença de pequenos vacúolos com fluido, mas transparentes, não aparenta possuir significado biológico. Já grandes vacúolos estão associados a baixas taxas de fecundação e desenvolvimento embrionário (figura 42);
- **Viscosidade** – a viscosidade aumentada do citoplasma ovocitário está associada a baixas taxas de fecundação e desenvolvimento embrionário (Ebner, 2003).



Figura 38 – Ovócito com o citoplasma homogéneo, como é esperado. Imagem retirada de Rienzi *et al.* (2012).

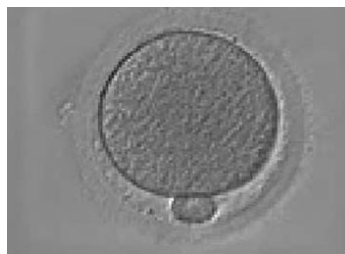


Figura 39 – Ovócito com o citoplasma ligeiramente mais granuloso do que o expectável. Imagem retirada de Rienzi *et al.* (2012).

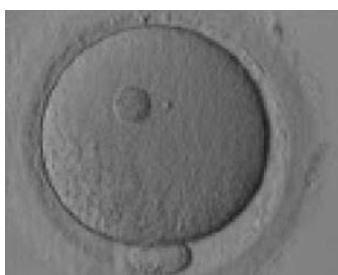


Figura 40 – Ovócito com um corpo refrátil de grandes dimensões. Imagem retirada de Rienzi *et al.* (2012).



Figura 41 – Ovócito com AREL. Imagem retirada de Rienzi *et al.* (2012).



Figura 42 – Ovócito vacuolado. Imagem retirada de Rienzi *et al.* (2012).

3.5.3. Anomalias de número, forma e tamanho

Como já referido anteriormente, é recomendado que não se inseminem ovócitos gigantes, devido ao risco de aneuploidias (figura 43).

3.5.4. Partenogénese

Este fenómeno consiste na divisão do ovócito sem que tenha ocorrido fecundação. O ovócito é automaticamente descartado (Almeida *et al.*, 2012) (figura 44).

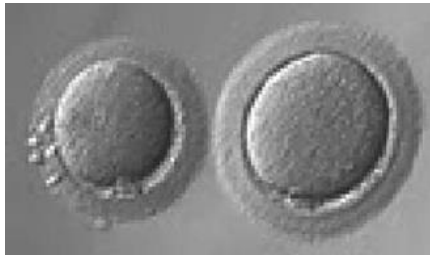


Figura 43 – Ovócito normal (esquerda) ao lado de um ovócito gigante (direita). Imagem retirada de Rienzi *et al.* (2012).



Figura 44 – Partenogénese de ovócito. A fotografia é propriedade do CEIE e foi reproduzida com permissão.

3.6. Avaliação da fertilização e do desenvolvimento embrionário

A fertilização é confirmada pela presença de dois PN (um feminino e um masculino) e de dois GP, 17±1 horas após a inseminação (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). Estes eventos significam que ocorreu o reinício da meiose. Os pré-zigotos podem ser avaliados de acordo com os seguintes critérios (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011):

- **Morfologia dos PN:**

- Tamanho
- Número
- Distância entre os dois PN
- Localização no citoplasma
- Alinhamento em relação aos GP

- **Corpos precursores dos nucléolos (CPN):**

- Distribuição no PN
- Número
- Tamanho

- **Número de GP**

- **Presença de halo** – área cortical mais clara, formando uma zona periférica e mais brilhante no citoplasma. Não existem evidências suficientes que suportem o valor preditivo da sua presença (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011), apesar de estar frequentemente associado a um bom prognóstico (Scott, 2003) (figura 46).

Idealmente, um **pré-zigoto** possui dois GP e dois PN, estes aproximadamente do mesmo tamanho, justapostos, mas com membranas distintas, e no centro do ovócito. Cada PN deve ter um número e tamanho equivalentes de CPN, preferencialmente alinhados na região de justaposição dos PN (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011) (figura 45)

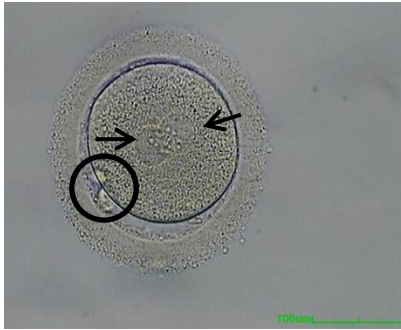


Figura 45 – Pré-zigoto com 2 PN (assinalados pelas setas) e 2 GP (circundados). A fotografia é propriedade do CEIE e foi reproduzida com permissão.



Figura 46 – Pré-zigoto com halo, região cortical inferior, facilmente distinguível da granulosa do resto do citoplasma (assinalado pela seta). A fotografia é propriedade do CEIE e foi reproduzida com permissão.

Existe um sistema de classificação baseado em todas estas características, denominado Z-score (Scott *et al.*, 2007). No entanto, após os consensos de Istambul (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011), esse tipo de avaliação da fecundação tem vindo a ser cada vez menos utilizado, uma vez que foi estabelecida uma classificação para os PN baseada em apenas três categorias: simétrico, assimétrico e anormal, conforme a tabela 9. Esta é uma classificação simplista, quando comparada com o Z-score, pois o valor preditivo dos PN é ainda um assunto controverso, devido aos diferentes resultados obtidos (James *et al.*, 2006; Scott *et al.*, 2007).

Classificação	Descrição
Simétrico	PN com igual número de CPN e com tamanho semelhante, alinhados ou dispersos
Assimétrico	Todos os outros padrões, incluindo PN periféricos
Anormal	PN com um ou nenhum CPN

Tabela 9 – Classificação dos PN dos pré-zigotos de acordo com os consensos de Istambul. Adaptado de Alpha Scientists in Reproductive Medicine & ESHRE Special Interest Group of Embryology (2011).

Poderão ocorrer situações anómalas durante a avaliação da fecundação, tais como:

- **Pré-zigotos com um PN** – em casos de FIV, não significa necessariamente que não ocorreu fecundação, pois poderá haver assincronia em relação ao aparecimento dos dois PN (Gámiz *et al.*, 2008). A ocorrência desta anomalia em ICSI pode indicar a ativação do ovócito por partenogénese, o que também é possível acontecer após FIV (Gámiz *et al.*, 2008). Em qualquer dos casos, não são considerados para a transferência embrionária (figura 47);

- **Pré-zigotos com três ou mais PN** – é frequente a observação deste fenómeno após FIV, significando que o ovócito foi fecundado por dois ou mais espermatozoides. Muitas vezes estes pré-zigotos dividem-se normalmente, dando origem a embriões de boa qualidade morfológica (Gámiz *et al.*, 2008) (figura 49). Estes também podem resultar de ciclos de ICSI, sendo que neste caso a explicação passa pela não extrusão do segundo glóbulo polar (Gámiz *et al.*, 2008). Em qualquer dos casos, não são considerados para a transferência embrionária (figura 48).



Figura 47 – Pré-zigoto após ICSI com 1 PN e 2 GP. Imagem retirada de Papale *et al.* (2012).



Figura 48 – Pré-zigoto com 3 PN (assinalados pelas setas) e 2 GP (circundados). A fotografia é propriedade do CEIE e foi reproduzida com permissão.



Figura 49 – Embrião com 6 células resultante de um pré-zigoto com 3 PN. A fotografia é propriedade do CEIE e foi reproduzida com permissão.

A situação mais grave e dececionante é a falha de fecundação total, quando nenhum ovócito se encontra fecundado após 17 ± 1 horas, tanto em FIV como em ICSI. Esta

situação pode ter diversas causas como problemas nos espermatozoides (falha de ligação à zona pelúcida, ausência de espermatozoides moveis ao fim de 17 ± 1 horas), presença de contaminação, problemas nos ovócitos (protocolo de estimulação, manipulação, presença de dimorfismos graves), entre muitas outras (Santos *et al.*, 2008). Será importante fazer todos os esforços para encontrar a verdadeira causa desta circunstância, de modo a que se minimize as possibilidades de uma segunda ocorrência. Deve também ser explicado ao casal, de forma clara e objetiva, o que se passou. No entanto, o casal está *a priori* preparado para o facto de que a realização de uma técnica de RHA não ser automaticamente sinónimo de sucesso.

Ao fim de 23 ± 1 horas o processo de fertilização termina, ocorrendo a união dos PN (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011), momento a partir do qual o pré-zigoto passa a denominar-se zigoto. À fusão do PN feminino com o masculino dá-se o nome de singamia. Neste período pode também ser possível observar alguns casos de divisão precoce (quando a primeira mitose ocorre às 26 ± 1 horas após ICSI ou às 28 ± 1 horas após FIV (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011)), que deve ser devidamente registada, uma vez que tem vindo a ser relacionada com elevadas taxas de desenvolvimento embrionário e um aumento da taxa de implantação (Fenwick *et al.*, 2002; Van Montfoort *et al.*, 2004; Prados *et al.*, 2008; Sakkas *et al.*, 1998) (figura 50 e figura 51).



Figura 50 – Embrião durante a sua primeira mitose, prestes a dividir-se em duas células. A fotografia é propriedade do CEIE e foi reproduzida com permissão.



Figura 51 – Embrião com duas células. A fotografia é propriedade do CEIE e foi reproduzida com permissão.

Após esta fase, os embriões são observados 44 ± 1 horas (segundo dia) e 68 ± 1 horas (terceiro dia) após inseminação, sendo avaliados os seguintes parâmetros (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011):

- Número de células e, consequente, ritmo de divisão;
- Percentagem e tipo de fragmentação celular;
- Tamanho dos blastómeros;
- Presença de multinucleação;
- Outras características morfológicas anómalas devem ser anotadas, ainda que não seja clara a sua relação com o desenvolvimento embrionário.

Idealmente, um **embrião de segundo dia** possui 4 blastómeros de tamanho igual num arranjo tridimensional e tetraédrico, menos de 10% de fragmentação e não deve possuir células multinucleadas (figura 52)



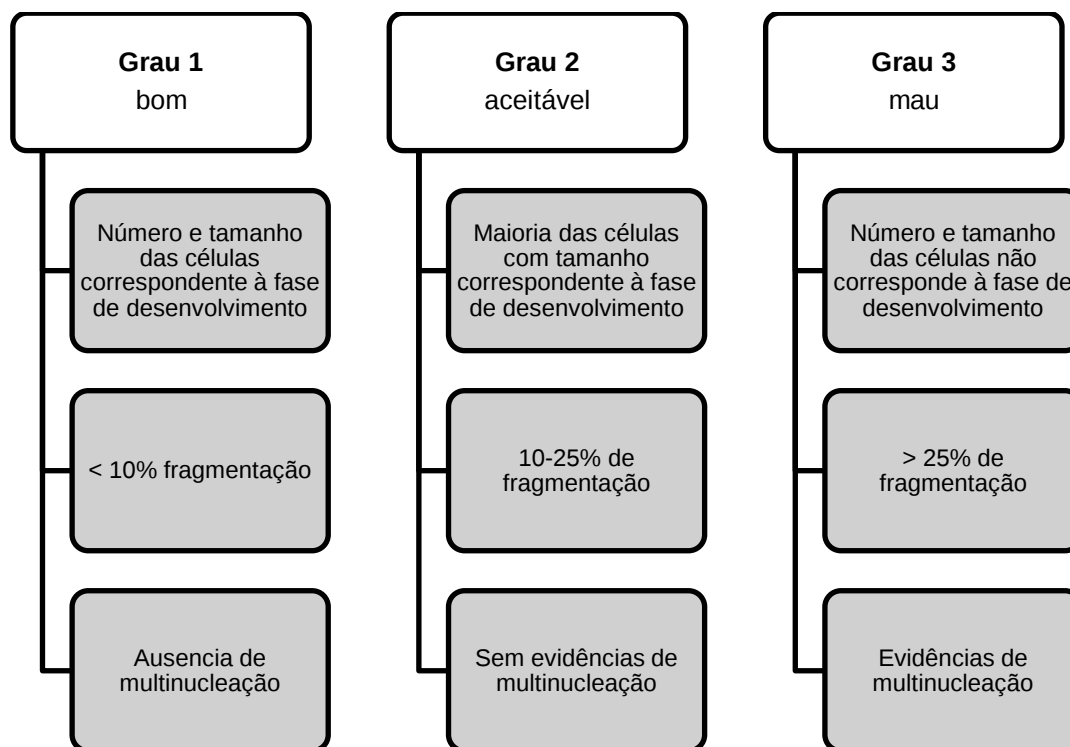
Figura 52 – Embrião ideal de segundo dia com 4 células. A fotografia é propriedade do CEIE e foi reproduzida com permissão.

Idealmente, um **embrião de terceiro dia** possui 8 blastómeros mononucleados de tamanho igual e menos de 10% de fragmentação (figura 53)



Figura 53 – Embrião ideal de terceiro dia com 8 células. A fotografia é propriedade do CEIE e foi reproduzida com permissão.

O parâmetro da fragmentação não é necessariamente um mau prognóstico, caso os fragmentos sejam constituídos apenas por citoplasma (Ajduk and Zernicka-Goetz, 2013) e estejam presentes numa percentagem não elevada (figura 54 e 55). Para além de que, através de estudos com sistemas de time-lapse de monitorização embrionária, foi possível observar que os embriões podem reabsorver os fragmentos (Lemmen *et al.*, 2008) ou estes podem ser eliminados por processos de lise celular (Van Blerkom *et al.*, 2001). No esquema 3 estão apresentados os diferentes graus de classificação de embriões em fase de clivagem.



Esquema 3 – Sistema de classificação de embriões em fase de clivagem (desde a fertilização até ao 3º dia) definido pelos consensos de Istambul (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).



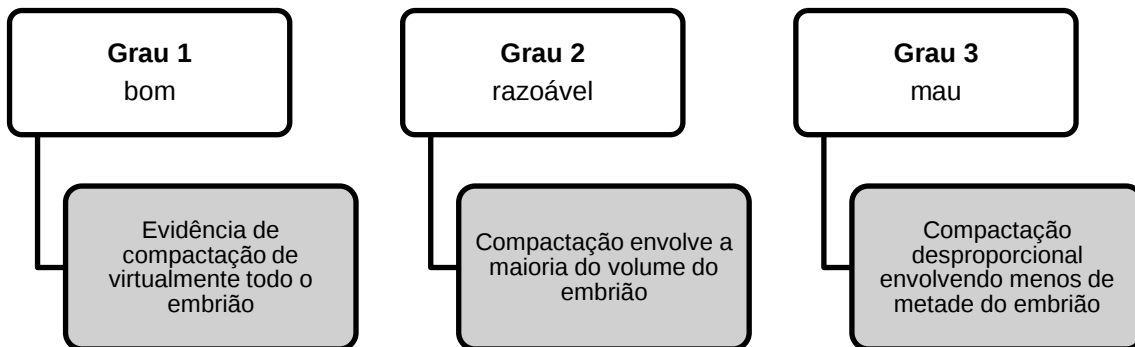
Figura 54 – Embrião com 4 ou 5 células e elevada percentagem de fragmentação. A fotografia é propriedade do CEIE e foi reproduzida com permissão.



Figura 55 – Embrião com 8 células e baixa percentagem de fragmentação. A fotografia é propriedade do CEIE e foi reproduzida com permissão.

Em casos de cultura prolongada (para além do terceiro dia), os embriões são mudados para um meio com características diferentes, pois a partir desta fase têm necessidades nutricionais bastante distintas, por consequência da ativação do seu genoma (Gardner and Lane, 1997). Novas avaliações são realizadas ao quarto dia (92 ± 2 horas) e ao quinto dia (116 ± 2 horas), após inseminação (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). Ao quarto dia, espera-se que já esteja a ocorrer o processo de compactação celular, caracterizado pelo aparecimento de uma massa celular compacta, devido às ligações que se formam entre as células, impedindo que se distingam os seus contornos

(Prados *et al.*, 2008) (figura 56). No esquema 4 apresentam-se os diferentes graus de classificação de embriões ao quarto dia.



Esquema 4 – Sistema de classificação de embriões ao quarto dia de desenvolvimento definido pelos consensos de Istambul (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

O embrião deverá atingir o estado de blastocisto por volta do quinto ou sexto dia de cultura. Um blastocisto de elevada qualidade deve estar bem expandido, possuir uma trofoectoderme com um grande número de células bem definidas, formando um epitélio coesivo, e uma massa celular interna (MCI) bem distinta, proeminente e com muitas células bem compactadas (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011) (figura 57). A MCI é o fator mais importante na avaliação de um blastocisto, uma vez que são estas células que darão origem ao embrião (Cockburn and Rossant, 2010). A avaliação de um blastocisto engloba a MCI, a trofoectoderme e o estado de desenvolvimento, como representado no esquema 5.

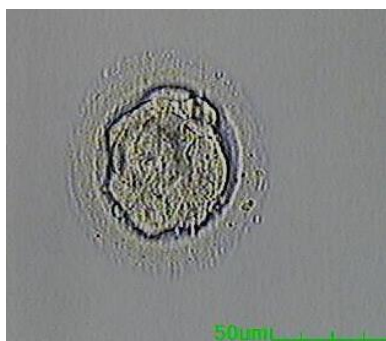
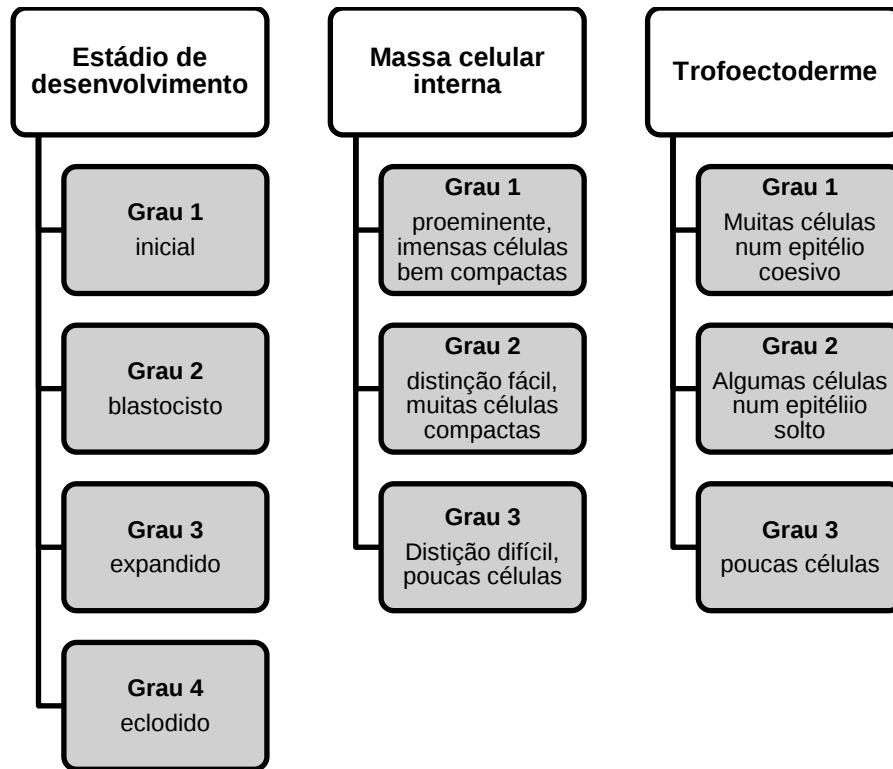


Figura 56 – Embrião em fase de mórula, ideal de quarto dia. A fotografia é propriedade do CEIE e foi reproduzida com permissão.



Figura 57 – Blastocisto bem expandido, com a MCI proeminente e a trofoectoderme bem definida. A fotografia é propriedade do CEIE e foi reproduzida com permissão.



Esquema 5 – Sistema de classificação de embriões ao quinto dia de desenvolvimento definido pelos consensos de Istambul (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

3.7. Transferência de embriões

Em Portugal não existem limites legais quanto ao número máximo de embriões a transferir. Mas o Concelho Nacional de Procriação Medicamente Assistida (CNPMA) recomenda que se transfira um ou dois embriões e, apenas em casos excecionais e devidamente justificados, um máximo de três. O dia da transferência embrionária, assim como o número de embriões a transferir, dependem de vários fatores, tais como a idade da paciente, o número de embriões de boa qualidade obtidos, a recetividade do endométrio e a análise de ciclos anteriores (Florensa *et al.*, 2008).

Antes da realização da transferência é necessário preparar o útero da paciente que irá receber o embrião. Assim, na noite após a punção folicular é iniciada a administração de progesterona, hormona essencial para que o endométrio apresente as características secretoras necessárias para que ocorra implantação e suporte da gravidez. A transferência pode ser realizada a partir do segundo dia de cultura embrionária até ao quinto dia, altura em que os embriões já deverão ter atingido a fase de blastocisto. A transferência intrauterina por via vaginal é a técnica mais utilizada (Florensa *et al.*, 2008). Primeiramente é lavado o cateter de transferência de embriões com meio de cultura. O embrião é seguidamente aspirado e, por fim, é transferido para

o útero da paciente (figura 58). Após a conclusão da transferência embrionária, o cateter é de novo lavado, verificando-se se os embriões foram realmente transferidos. Ao fim de 15 dias confirma-se a ocorrência de implantação, através da realização de um teste de gravidez, no qual é quantificada a hormona hCG.

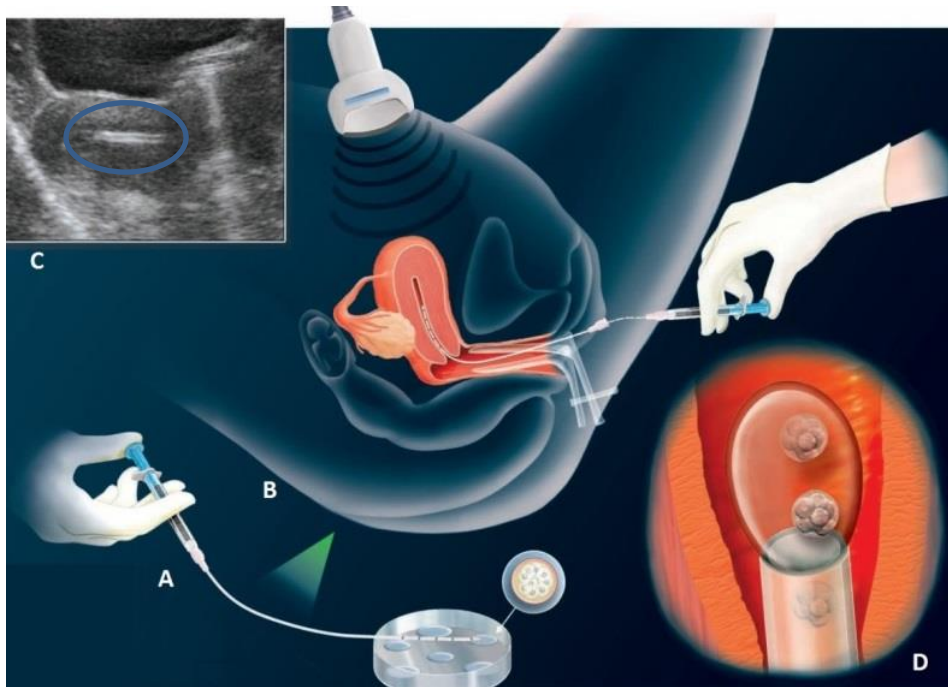


Figura 58 – Transferência de embriões. **A** – aspiração dos embriões da placa de cultura para o cateter de transferência; **B** - cateter inserido no útero; **C** – visualização ecográfica do cateter (circundado a azul); **D** – deposição dos embriões no útero, durante a qual é visível uma pequena gota brilhante na ponta do cateter, através do controlo ecográfico¹⁹.

3.7.1. Eclosão assistida

Antes da transferência embrionária poderá realizar-se um procedimento que tem como objetivo facilitar a implantação do embrião, denominado eclosão assistida (EA). Este consiste no enfraquecimento de uma parte da zona pelúcida através de um variado número de métodos, como químicos, mecânicos e por laser. Embora a ASRM (American Society of Reproductive Medicine) não refira nenhum método como o mais indicado (The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine and The Practice Committee of the Society for Assisted Reproduction Technology, 2014), a realização da EA com recurso a um laser é considerado o método mais seguro, simples e eficaz de utilizar (Hammadeh *et al.*, 2011). Através da EA, o embrião terá mais facilidade em escapar da zona pelúcida e implantar, uma vez que estudos

¹⁹ Imagem obtida do site <http://myselfishgenes.blogspot.pt/2013/02/embryo-transfer.html>, acedido a 10/09/2014.

referem que o embrião começa a eclodir na região da zona pelúcida que foi enfraquecida (Kirkegaard *et al.*, 2012a; Schmoll *et al.*, 2003).

A EA não é um procedimento padrão nos laboratórios de RHA (Hammadeh *et al.*, 2011), pois existe falta de evidência do seu benefício para todos os pacientes. Os grupos que se pensa poderem beneficiar com este procedimento são:

- Pacientes com mau prognóstico (The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine and The Practice Committee of the Society for Assisted Reproduction Technology, 2014);
- Pacientes com idade materna avançada (Seif *et al.*, 2008);
- Pacientes com falhas de implantação recorrentes (Petersen *et al.*, 2005);
- Pacientes em ciclos de transferência de embriões criopreservados (Wan *et al.*, 2014).

Existem vários estudos que comprovam o benefício do uso da EA, contudo uma revisão da Cochrane (Seif *et al.*, 2008) e um guia da ASRM (The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine and The Practice Committee of the Society for Assisted Reproduction Technology, 2014) ainda não recomendam o seu uso regular, devido à falta de evidências quanto ao seu efeito na taxa de nados vivos e em outros indicadores de sucesso.

3.7.2. Quando realizar a transferência embrionária?

Nos últimos 30 anos, as transferências embrionárias após tratamentos de RHA ocorreram maioritariamente na fase de pronúcleo e de clivagem (até ao terceiro dia) (Gardner and Lane, 2009). Com o desenvolvimento de meios de cultura sequenciais tornou-se possível a cultura de embriões até ao quinto dia (Gardner and Lane, 1997) e, portanto, a cultura prolongada e a transferência de blastocistos têm surgido cada vez com mais persistência. Esta prática permite a seleção de embriões em avançadas fases de desenvolvimento, partindo do princípio que apenas sobrevivem os embriões que terão um maior potencial de evolução. Contudo, o facto de um embrião atingir a fase de blastocisto não reflete necessariamente a sua capacidade de implantar e desenvolver-se num recém-nascido saudável, uma vez que mais de 50% dos embriões de quinto dia poderão possuir aneuploidias (Fragouli and Wells, 2011). Assim, levanta-se uma nova temática relacionada com o melhor dia para realizar a transferência embrionária, que permanece sem consenso (Sills and Palermo, 2010). A transferência de blastocistos, traz inúmeras vantagens, entre as quais:

- **Melhor sincronização do estágio do embrião com o ambiente do trato feminino:** as trompas e o útero contêm diferentes níveis de nutrientes e substâncias essenciais ao desenvolvimento embrionário. Numa fecundação natural, o embrião percorre a trompa em fase de clivagem e só atinge o útero por volta do quinto dia. Assim, a transferência de um embrião em fase de clivagem para a cavidade uterina, pode levar a um *stress* metabólico (Gardner *et al.*, 1998). É também importante referir que o protocolo de estimulação ovárica pode desencadear um ambiente uterino desfavorável para o embrião (Van der Auwera *et al.*, 1999), sendo o adiamento da transferência embrionária uma decisão mais plausível;

- **Seleção após ativação do genoma embrionário:** a informação genética fornecida pelo pai só começa a exercer a sua função a partir do terceiro dia de desenvolvimento embrionário, ou seja, todo o potencial de um embrião ainda não é conhecido na fase de clivagem, uma vez que até aqui apenas os genes maternos estiveram ativos (Ajduk and Zernicka-Goetz, 2013). Caso se opte pela cultura dos embriões até ao quinto dia, será possível observar aqueles que continuaram o seu desenvolvimento e, assim, selecionar o melhor embrião a transferir de forma mais assertiva. Deste modo não se corre o risco de transferir um embrião que apresentava boa qualidade ao terceiro dia, mas que, após ativação do seu genoma, não iria evoluir mais;

- **Paragem das contrações uterinas:** as contrações aumentam no dia da punção folicular e começam a diminuir por volta do quarto dia (Lesny *et al.*, 1998). Por isso, a transferência ao quinto dia parece ser a melhor opção, pois haverá menor probabilidade do embrião ser expulso do útero;

- **Criopreservação:** a criopreservação de blastocistos aparenta ter melhores sucessos do que em fase de clivagem (Veeck, 2003);

- **Diagnósticos que incluam biópsia embrionária:** a cultura dos embriões até ao quinto dia permite que a biópsia possa ser realizada às células da trofoectoderme, em vez da análise a blastómeros (como acontece na fase de clivagem). A subtração de duas células ao terceiro dia poderá ter um efeito negativo no desenvolvimento embrionário (Kouru *et al.*, 2012);

- **Taxas de sucesso:** a cultura de blastocistos está associada a melhores taxas de implantação e de gravidez (Kirkegaard *et al.*, 2012b);

- **Maior consistência na seleção de blastocistos:** A seleção de embriões em fase de clivagem pode ser menos consistente, uma vez que se acredita que certo tipo de aneuploidias (anomalias cromossómicas numéricas) ou falhas na expressão do

genoma embrionário, a partir do momento da sua ativação, impossibilitam o embrião de atingir a fase de blastocisto (Fragouli and Wells, 2011).

Contudo, existem também desvantagens deste tipo de abordagem, maioritariamente devido à cultura dos embriões durante 5 dias, que é necessário ter em consideração:

- A cultura prolongada de embriões para além do terceiro dia pode ser um risco, pois os embriões podem não sobreviver. Cerca de 40% dos embriões de boa qualidade em fase de clivagem atingem a fase de blastocisto (Rijnders and Jansen, 1998) e, portanto, ao ser tomada a decisão de realizar a transferência apenas ao quinto dia pode levar ao cancelamento do ciclo, por não haver embriões de qualidade suficiente;
- Maior incidência de modificações epigenéticas e, consequentemente, na expressão de genes (Horsthemke and Ludwig, 2005; Niemitz and Feinberg, 2004);
- Maiores custos (Kirkegaard *et al.*, 2012b);
- Maior risco de parto prematuro, baixo peso à nascença e malformações congénitas (Dumoulin *et al.*, 2010; Källén *et al.*, 2010a, 2010b).

Tendo em conta todas as considerações até aqui referidas, a cultura de embriões até à fase de blastocisto pode ser uma opção viável para casais em ciclos de doação de ovócitos (Gardner and Lane, 2009) ou com bom prognóstico (Glujovsky *et al.*, 2013). Os casos de doação de ovócitos podem ser um bom modelo uma vez que as dadoras tendem a ser mulheres jovens e férteis, ou seja, com ovócitos de boa qualidade, sendo grande a probabilidade de se desenvolverem embriões de boa qualidade. Por outro lado, a transferência de embriões de quinto dia não é indicada para casais que tenham obtido um número reduzido de embriões e de má qualidade.

3.7.3. Como escolher o melhor embrião?

Tendo em conta o critério de avaliação morfológica estática e pontual, o mais utilizado atualmente nas clínicas de RHA, um embrião de boa qualidade para transferir deve ter uma evolução de acordo com os consensos de Istambul (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). Este método implica a remoção dos embriões da incubadora para classificação, sendo expostos a variações do ambiente de cultura (Chamayou *et al.*, 2013). A escolha do melhor embrião para transferir torna-se complicada devido ao facto de não existirem marcadores robustos que deem confiança ao embriologista de que aquele exato embrião se irá desenvolver e resultar num recém-nascido saudável (Wong *et al.*, 2013). A observação pontual de embriões através do microscópio revela um baixo

valor preditivo na realidade de um laboratório de RHA, uma vez que os embriões apenas são visualizados e avaliados em determinados momentos-chave pré-estabelecidos, perdendo-se informação sobre o seu dinâmico e contínuo desenvolvimento (Ajduk and Zernicka-Goetz, 2013; Chamayou *et al.*, 2013). Existe também um ainda elevado desconhecimento do significado biológico de muitas características morfológicas (Wong *et al.*, 2013). Assim, é de enorme importância e interesse o estabelecimento de um método mais fidedigno e de maior valor preditivo de avaliação do desenvolvimento embrionário, facilitando a escolha do melhor embrião no momento da transferência.

3.7.4. As gravidezes múltiplas. Como evitar?

Desde 1978, data do nascimento do primeiro bebé *in vitro*, que as técnicas de RHA têm sofrido uma constante evolução, visando melhores taxas de sucesso. Ainda assim, a taxa de nados vivos permanece abaixo dos 50% (Ajduk and Zernicka-Goetz, 2013), pois a probabilidade de um único embrião implantar e dar origem a uma gravidez com sucesso é baixa (Filho *et al.*, 2010), sendo de 36,8% em 2010, nos Estados Unidos da América e em mulheres com menos de 35 anos (Cohen *et al.*, 2012). Tal deve-se, em parte, à grande variabilidade na competência de desenvolvimento dos embriões obtidos durante os ciclos de tratamento e às dificuldades em determinar quais os embriões com maior probabilidade de originar um recém-nascido (Filho *et al.*, 2012). Portanto, em muitos casos realiza-se a transferência de dois ou mais embriões num único ciclo de tratamento, na tentativa de aumentar as probabilidades de um embrião viável ser transferido, o que resulta frequentemente em gravidezes múltiplas (Ajduk and Zernicka-Goetz, 2013; Filho *et al.*, 2010; Hovatta, 2009). É importante salientar que uma gravidez múltipla é um resultado não desejado das técnicas de RHA, devido aos enormes riscos que acarreta (Adashi *et al.*, 2003; Pinborg, 2005). Portanto, diversos países implementaram restrições legais no que diz respeito ao número de embriões transferidos por ciclo de tratamento, tais como a Noruega, a Suécia, a Bélgica, a Inglaterra, a Alemanha ou a Austrália (Sakkas and Gardner, 2009). Outro fator que influenciou o aumento da taxa de gravidezes múltiplas é a idade cada vez maior durante a qual as mulheres engravidam (Pinborg, 2005).

3.7.4.1. Os números europeus referentes a 2009

O relatório da European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) sobre a RHA em 2009 indica que, em ciclos de FIV e ICSI, foi possível diminuir a percentagem de transferências embrionárias de 3 ou mais embriões (gráfico 5). Contudo, ainda é bastante frequente a transferência de 2 embriões de modo a garantir o sucesso do ciclo (Ferraretti *et al.*, 2013). Dentro destes resultados estão incluídos os países nórdicos (Suécia, Finlândia e Noruega) a atingirem taxas de transferência de um único embrião superiores a 50%, que contrastam com países como a Bulgária, Grécia, Itália, Macedónia, Moldávia, Montenegro e Sérvia com percentagens acima dos 40% de transferências de 3 embriões (Ferraretti *et al.*, 2013).

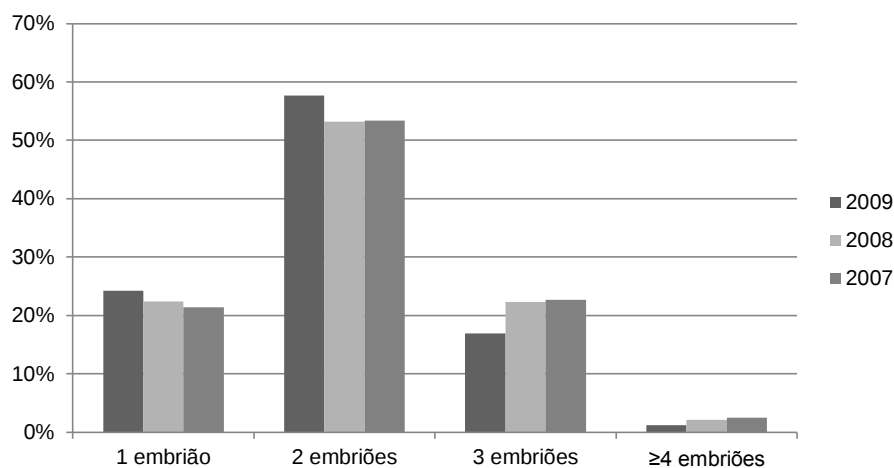


Gráfico 5 – Número de embriões transferidos em ciclos de FIV e ICSI entre 2007 e 2009. Adaptado de Ferraretti *et al.* (2013).

Ainda assim, a taxa de partos de 3 recém-nascidos em simultâneo, após ciclos de FIV e ICSI, não apresenta valores elevados, ao contrário dos valores preocupantes para os partos gemelares (Ferraretti *et al.*, 2013). Enquanto países como a Bulgária, Croácia, Grécia, Lituânia, Roménia e Sérvia apresentam taxas superiores a 2,5% de nascimentos de 3 recém-nascidos, outros estados ostentam taxas inferiores a 0,2% (Bélgica, Dinamarca, Finlândia, Islândia, Noruega, Eslovénia, Suécia, Suíça e Países Baixos). No que diz respeito aos partos gemelares, a sua taxa vai desde <10% na Finlândia e Suécia até mais de 30% na Lituânia, Macedónia e Sérvia (gráfico 6).

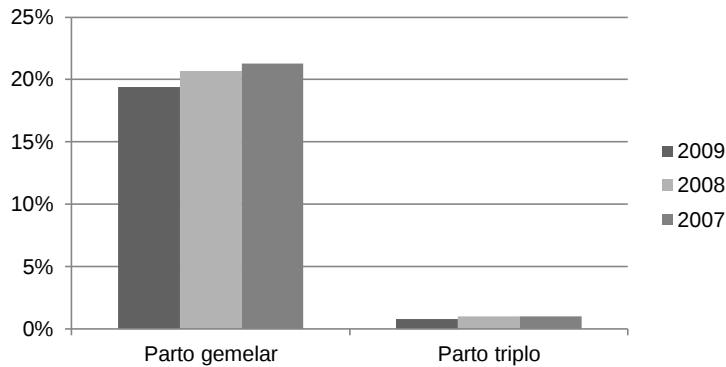


Gráfico 6 – Partos gemelares ou triplos após ciclos de FIV e ICSI entre 2007 e 2009 na Europa. Adaptado de Ferraretti *et al.* (2013).

Em relação ao tempo de gestação, nota-se que os partos de quase 90% das gravidezes únicas apenas ocorrem no fim do tempo (gráfico 7).

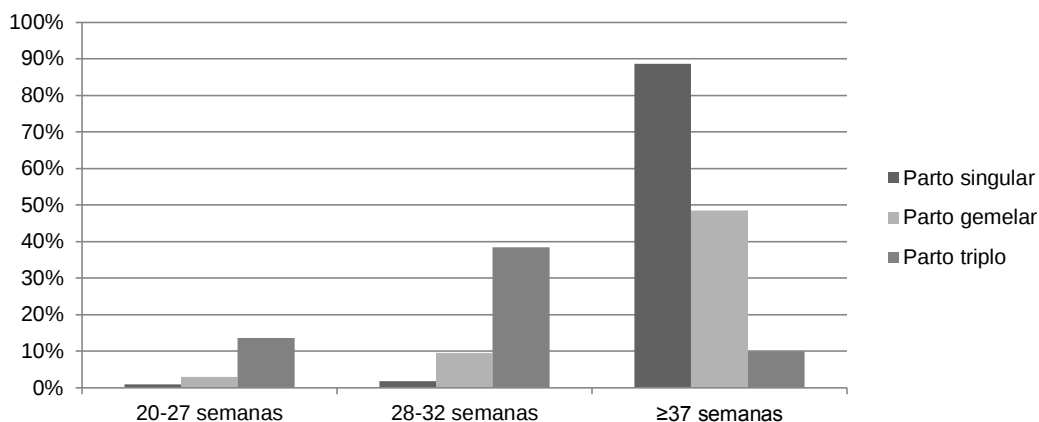


Gráfico 7 – Duração da gestação consoante o tipo de parto. Dados referentes ao ano de 2009. Adaptado de Ferraretti *et al.* (2013).

3.7.4.2. Riscos associados

Uma gravidez múltipla acarreta elevados riscos de saúde para a mãe e para os recém-nascidos (Ajduk and Zernicka-Goetz, 2013), além de maiores custos financeiros (Filho *et al.*, 2010). As complicações fetais mais frequentes são um parto pré-termo e baixo peso à nascença (sendo as principais causas de uma maior incidência de morbilidade e mortalidade perinatais) (Hovatta, 2009; Ombelet *et al.*, 2005) e paralisia cerebral (Adashi *et al.*, 2003). Acredita-se que doenças congénitas do coração são mais comuns em gémeos do que recém-nascidos únicos (Hajdu *et al.*, 2006). Num estudo

de Merlob *et al.* (2005), em Israel, das crianças com malformações que nasceram através de técnicas de RHA, 70% ocorreram em gravidezes múltiplas.

Em relação aos riscos de saúde maternos, estes estão associados a uma maior incidência de hipertensão (Hovatta, 2009) e anemia gestacionais, trombo-embolismo, infeções do trato urinário (Adashi *et al.*, 2003), pré-eclâmpsia, enfarte do miocárdio, trombose, edema pulmonar, realização de cesariana, rutura uterina (sendo maior o risco de realização de uma histerectomia), hemorragia pós-parto e, consequentemente, mortalidade (Walker *et al.*, 2004). Há também um aumento do risco da ocorrência de abortos (Fauser *et al.*, 2005). Devido ao risco aumentado de ocorrência de diabetes gestacional nas gravidezes múltiplas, mulheres diabéticas são aconselhadas a transferir um único embrião, independentemente da qualidade embrionária (Hovatta, 2009).

Os riscos do foro psicológico desempenham também um papel importante na vida dos pais e dos recém-nascidos. Poderão ocorrer casos em que os pais culpam o irmão gémeo que sobreviveu pelo feto que foi perdido ou o próprio irmão se sente responsável; ou um dos irmãos gémeos pode desenvolver *deficit* de atenção ou atrasos no desenvolvimento, por ter sempre alguém com quem tem de competir pela atenção dos pais e outras pessoas envolvidas na sua educação. Os pais podem também passar por situações de *stress*, o que pode levar a depressões e até ao divórcio, devido à sobrecarga de educar duas crianças ao mesmo tempo (Fauser *et al.*, 2005), a problemas financeiros ou à falta de tempo para a vida a dois.

3.7.4.3. Custos associados

No Canadá, o Medical Advisory Secretariat (2006) realizou um estudo em que comparou o custo do nascimento de um bebé com o custo do nascimento de gémeos ou mais recém-nascidos, tendo em conta se foram admitidos na unidade de cuidados intensivos neonatais (UCIN), devido a complicações, ou não.

	Parto vaginal		Cesariana	
	Parto normal	Recém-nascido na UCIN	Parto normal	Recém-nascido na UCIN
Parto único	\$3,996	\$13,696	\$6,704	\$16,404
Parto gemelar	\$4,941	\$24,341	\$8,249	\$27,649
Parto múltiplo*	\$5,886	\$34,041	\$9,794	\$37,349

Tabela 10 – Comparação entre os custos dos diferentes tipos de partos e internamentos. O custo foi calculado pela média de diferentes dias de internamento, por recém-nascido. O preço (em dólares) corresponde aos procedimentos associados, assim como aos custos dos cuidados. * Parto múltiplo corresponde ao nascimento de 3 ou mais recém-nascidos. Adaptado de Medical Advisory Secretariat (2006).

3.7.4.4. Como diminuir o número das gestações múltiplas

Tendo em conta os riscos e custos associados, é de grande importância a existência de estratégias que façam diminuir as taxas de gravidez múltipla. Uma vez que a RHA é considerada a causa mais importante para o aumento dos nascimentos múltiplos nos últimos 25 anos (Cutting *et al.*, 2008), têm vindo a ser implementadas políticas que visam a transferência de um menor número de embriões por ciclo (Filho *et al.*, 2010), idealmente um único embrião. Outro método passa pela redução fetal, procedimento que pode ser realizado entre as 10 e as 14 semanas, através do qual, com controlo ultrassonográfico, é injetado cloreto de potássio no coração do feto selecionado para redução. Este método é considerado eficaz e seguro para a redução de uma gravidez de 4 ou mais fetos. Contudo, apesar de reduzir o risco de uma gravidez pré-termo, aumenta a probabilidade de ocorrerem abortos subsequentes. No caso de gravidezes gemelares, a redução fetal só é aconselhada quando um dos fetos apresenta malformações severas. Assim, como muitas gravidezes resultantes de tratamentos de RHA são gemelares e tendo em conta as importantes e pertinentes questões éticas, este não é considerado um método alternativo à transferência de um só embrião (Medical Advisory Secretariat, 2006). Algumas das questões éticas anteriormente referidas poderão prender-se com o facto de os casais que procuram tratamentos de RHA terem há muito o desejo e o sonho de conceberem. Portanto, depois de alcançada a tão desejada gravidez é um enorme choque pensarem que são obrigados a perder um ou mais dos seus filhos, mesmo que isso signifique uma gravidez com menos riscos para os fetos e para a mãe. Existe também a questão sempre atual ligada ao estatuto do embrião. Poderá este ser considerado uma vida que estamos a acabar antecipadamente, privando-o de um futuro promissor? Ou será apenas um conjunto de células, sem significado humano sobre o qual podem ser tomadas decisões sem objeções de consciência? Outra questão poderá estar relacionada com crenças religiosas que impeçam o casal de aceitar a redução fetal. Ao nível psicológico, após a proposta por parte do médico de realizar uma redução fetal, o casal pode entrar em ansiedade e *stress* por não saber qual a melhor decisão a tomar, podendo também levar a angústia por saber que existe a possibilidade de perderem um ou mais dos seus fetos. Após a realização do procedimento, poderão surgir sentimentos de depressão e tristeza associados à perda de um filho.

3.7.4.4.1. Transferência de um só embrião

Seria fácil diminuir o número de gravidezes múltiplas obtidas, reduzindo o número de embriões transferidos em cada ciclo de tratamento, idealmente um único embrião. Contudo, esta estratégia poderá ter um efeito negativo na taxa de gravidez clínica, uma vez que é difícil determinar qual o embrião que terá uma maior probabilidade de se implantar na parede uterina (Filho *et al.*, 2010; Sakkas and Gardner, 2009). Ainda assim, a transferência de um único embrião (eSET) tem sido referida como a estratégia mais eficaz para reduzir o número das gravidezes múltiplas resultantes de tratamentos de RHA (Cutting *et al.*, 2008). Portanto, diminuir o número de gestações múltiplas e mantendo, ou até aumentando, as taxas de gravidez continua a ser um grande desafio na área da medicina da reprodução (Sakkas and Gardner, 2009). No Reino Unido, a HFEA (Human Fertilization and Embryology Authority²⁰) já implementou políticas de redução da taxa de gravidez múltipla, tendo sido atingido o objetivo de 10% em 2012 (Ajduk and Zernicka-Goetz, 2013). Em outros países europeus, como é o caso da Finlândia e da Suécia, a transferência de um só embrião levou a uma redução da taxa de gravidez múltipla, sem comprometer o número de recém-nascidos (Bergh, 2005; Tiitinen *et al.*, 2004). Contudo, noutras nações, como os Estados Unidos da América e o Canadá, não existem políticas que imponham limites ao número de embriões a transferir. Uma das razões para esta situação é a não existência de financiamento público para os tratamentos de infertilidade. Portanto, de modo a evitar os custos de um novo ciclo, são frequentemente transferidos mais do que um embrião, com o intuito de aumentar as probabilidades de se obter uma gravidez (Medical Advisory Secretariat, 2006).

Para que a transferência de um único embrião seja um método tão eficaz como a transferência dupla, terão de existir critérios que selecionem os casais que poderão beneficiar deste tipo de política, uma vez que numa população não-selecionada, a transferência de um único embrião resultou em taxas de gravidez mais baixas (Hovatta, 2009). A eSET deve ser indicada para casais em que a paciente tenha um elevado risco de ter um parto prematuro (como a existência de anomalias uterinas), ou que possua diabetes, hipertensão ou síndrome de Turner (Hovatta, 2009). De acordo com o Medical Advisory Secretariat (2006), os critérios de inclusão passam por pacientes com bom prognóstico (idade menor ou igual a 35 anos) e pela obtenção de embriões de boa qualidade. Já Hovatta (2009) indica que casais com mais de 3 ciclos anteriores sem sucesso, menos de 2 embriões de qualidade e pacientes com mais de

²⁰ É um órgão estatutário do Reino Unido que regula e inspeciona todas as clínicas de RHA desse país e também a investigação relacionada com embriões humanos. <http://www.hfea.gov.uk/>, acedido a 24/07/2014.

40 anos não deverão ser indicadas para a realização de uma eSET. Esta também pode ser aconselhada em ciclos de doação de ovócitos (Soderstrom-Anttila, 2003; Söderström-Anttila and Vilska, 2007).

Para um número significativo de pacientes, a cultura e transferência de blastocistos será talvez o método mais eficaz para a realização da eSET, mantendo as elevadas taxas de gravidez, uma vez que a avaliação de embriões em estágio de blastocisto apresenta um valor preditivo superior em relação à classificação de embriões em fase de clivagem (Gardner and Lane, 2009). De modo a suportar a cultura de embriões até ao estado de blastocisto, foi necessário ocorrer uma evolução nos procedimentos de criopreservação, permitindo assim aumentar as taxas de implantação e de gravidez evolutiva através da transferência de blastocistos previamente criopreservados (Gardner and Lane, 2009). Assim, a eSET combinada com um bom protocolo de criopreservação é o método com melhor relação custo/benefício, quando comparado com a transferência de dois ou mais embriões, tendo em conta os custos e riscos associados a uma gravidez múltipla.

A eSET envolve uma avaliação cuidadosa e precisa dos embriões, com vista à seleção e transferência do embrião com o melhor potencial de desenvolvimento e, consequentemente, de implantação. Assim, uma melhoria nos métodos que ajudam a prever a qualidade dos embriões levaria ao aumento da confiança dos médicos e embriologistas numa política de eSET, levando à sua implementação mais generalizada e frequente (Van Montfoort *et al.*, 2005). Tal passa pelo desenvolvimento de sistemas de cultura melhorados e métodos de seleção embrionária e de criopreservação aperfeiçoados (Gardner and Lane, 2009), assim como pela descoberta e implementação clínica de biomarcadores do desenvolvimento embrionário, que ajudem na seleção embrionária (Chen *et al.*, 2013).

4. Diagnóstico genético pré-implantação

O DGPI é uma técnica alternativa ao diagnóstico pré-natal e é realizada em embriões necessariamente obtidos através de técnicas de RHA e antes da sua transferência, evitando-se desta forma a realização de interrupções da gravidez (Regateiro, 2007). Este método de diagnóstico permite a escolha e a transferência de embriões não portadores de doenças genéticas e é recomendado a casais que sejam portadores ou com descendência ou familiares afetados (Regateiro, 2007) de anomalias monogénicas (autossómicas, recessivas, dominantes e ligadas ao cromossoma X) ou cromossómicas (estruturais, como as translocações recíprocas e Robertsonsianas, as inversões, ou as numéricas, como as aneuploidias) (Regateiro, 2007). Em Portugal, segundo o artigo 29º da lei nº32/2006, o DGPI “aplica-se a pessoas provenientes de famílias com alterações que causam morte precoce ou doença grave, quando exista risco elevado de transmissão à sua descendência”. Surgem como indicadores a idade materna avançada (devido ao aumento de anomalias cromossómicas com a idade, durante a meiose (Hassold and Hunt, 2009)), sucessivas falhas de implantação, fator masculino severo e casais com cariótipo normal que tenham sofrido abortos recorrentes (Harton *et al.*, 2011). A realização do DGPI consiste na extração de uma ou duas células, que podem ser os glóbulos polares (de ovócitos ou de pré-zigotos), blastómeros de embriões em clivagem com 8 a 12 células (terceiro dia) ou células da trofoectoderme de blastocistos, e posterior análise genética (Harton *et al.*, 2011) (tabela 11).

A biópsia de glóbulos polares poderá ser útil em casos em que se rastreiem mutações de origem materna, como meio de evitar a remoção de blastómeros (alguns laboratórios podem utilizar apenas este método devido a restrições legais relacionadas com a biópsia de embriões (Harton *et al.*, 2011)). A presença de mosaicismo cromossómico (alguns blastómeros aneuploides e outros euploides) poderá levar a que a biópsia de um só blastómero de um embrião em estado de clivagem não seja representativa, podendo ser mais viável a biópsia de dois blastómeros (Regateiro, 2007), de modo a minimizar a obtenção de falsos positivos ou negativos.

Consoante o tipo de patologia a ser detetada são empregues diferentes técnicas para análise do material genético:

- **FISH** (hibridização *in situ* com sondas fluorescentes) – no estudo de anomalias estruturais ou numéricas dos cromossomas (Regateiro, 2007) (por exemplo: casos de anomalias cromossómicas (como translocações), de doenças ligadas ao cromossoma X (escolha do sexo do embrião), ou na análise de aneuploidias);

- **PCR** (reação em cadeia da polimerase) – pode ser empregue em casos de doenças causadas por um gene (Regateiro, 2007).

Células analisadas	Vantagens	Desvantagens
Glóbulos polares	✓ Menos invasivo e com menos questões éticas, pois não são retiradas células do embrião ✓ A maioria das aneuploidias ocorre durante a meiose materna (Hassold <i>et al.</i>, 2007) ✓ Contorna o problema do mosaicismo embrionário e de certas restrições legais	× Apenas é analisado o material genético de origem materna, não podendo ser aplicado a doenças de origem paterna × Mais caro, pois muitos ovócitos não evoluem × Anomalias genéticas após a fase de zigoto afetam 30% dos embriões (Gámiz <i>et al.</i>, 2003)
1 a 2 blastómeros de embriões em fase de clivagem	✓ Material genético de ambos os progenitores	× Mosaicismo (40 a 60% dos embriões são mosaicos), podendo levar a diagnósticos errados × Remoção de 2 blastómeros pode afetar o desenvolvimento posterior (Kouru <i>et al.</i>, 2012)
Células da trofoectoderme de blastocistos	✓ Mosaicismo pode ser contornado pela análise de um maior número de células ✓ Menor impacto no embrião, pois as células da trofoectoderme não irão contribuir para a massa celular interna (que dá origem ao feto) ✓ Procedimento mais fácil de realizar	× Cultura prolongada, sem garantias de que os embriões atinjam a fase de blastocisto × Maior grau de mosaicismo × Necessidade de criopreservação e um novo ciclo de transferência de embriões

Tabela 11 – Comparação entre os diferentes tipos de biópsia que se pode realizar durante o DGPI. Adaptado de Harton *et al.* (2011).

Como já referido anteriormente, a técnica de ICSI deve ser a utilizada, principalmente, quando for recomendado o DGPI por PCR, pois assim evita-se a contaminação por espermatozoides supranumerários (Regateiro, 2007) (que, após FIV, frequentemente ficam presos à zona pelúcida grande parte do desenvolvimento embrionário) ou por células da granulosa. Já nos casos em que existe indicação para a técnica de FISH, não é tão pertinente a utilização da ICSI. A aplicação da técnica de PCR pode também levar a erros de diagnóstico, devido à ocorrência da falha de amplificação de um alelo, dando origem a um falso resultado (Regateiro, 2007). Mais recentemente têm surgido

novas técnicas baseadas em *arrays*, como a hibridização genómica comparativa e *arrays* de polimorfismos de nucleótidos únicos (Harper and Harton, 2010).

Após serem obtidos os resultados do DGPI, a seleção do embrião a transferir deve seguir os seguintes critérios (Thornhill *et al.*, 2005):

- Ausência de anomalia genética;
- Número de células antes e após a biópsia;
- Evidência de divisão celular ativa após a biópsia;
- Ausência de anomalias morfológicas após a biópsia.

5. Criopreservação de embriões

Os embriões excedentários são uma questão pertinente em qualquer clínica de RHA. Com a indução da poliovulação, na maioria das vezes é colhido um número significativo de ovócitos e, conseqüentemente, é obtido um número de embriões de boa qualidade superior àquele que se vai transferir. Nestes casos procede-se à sua criopreservação, podendo esta também ser realizada em pacientes com baixa recetividade do endométrio, dessincronização entre uma dadora de ovócitos e a sua recetora ou quando a paciente está com elevado risco de desenvolver a SHO (Herrero *et al.*, 2011).

Quando existem embriões criopreservados, e do ciclo anterior não evoluiu uma gravidez, opta-se pela realização de um ciclo de transferência desses embriões, evitando-se assim um novo protocolo de estimulação ovárica. Mas, em alguns casos, os casais aceitam a criopreservação e não voltam a contactar o laboratório para dar seguimento ao seu projeto parental. Segundo a lei nº32/2006, os embriões devem permanecer criopreservados por um período máximo de 3 anos, sendo que ao fim desse tempo podem ser doados a outros casais ou cedidos para projetos de investigação, mediante consentimento prévio do casal progenitor.

Os embriões podem ser criopreservados na fase de clivagem ou em fase de blastocisto. Recentemente, a técnica de eleição dos laboratórios de RHA é a vitrificação. Esta, segundo Zegers-Hochschild *et al.* (2009) é definida como “um método de criopreservação ultra rápido, prevenindo a formação de gelo”. A vitrificação leva a maiores taxas de sobrevivência (após a descongelação dos embriões) e de gravidez clínica, quando comparada com o protocolo de congelação lenta (Herrero *et al.*, 2011). Em ambos os métodos, os embriões são armazenados a -196°C (azoto líquido). Para além das vantagens relacionadas com os embriões, a vitrificação também traz melhorias em relação ao trabalho laboratorial, pois esta realiza-se em cerca de 15 minutos (RapidVit™, Vitrolife, Suécia), enquanto o protocolo de congelação lenta demorava cerca de 3 horas (Freeze-Kit 1™, Vitrolife, Suécia).

Recentemente, Wong *et al.* (2014) defendem uma estratégia que passa pela criopreservação de todos os embriões viáveis, ultrapassando assim os fatores indesejáveis de um ciclo de estimulação, dado que a transferência de embriões criopreservados apenas requer a preparação do endométrio, levando a um aumento da recetividade uterina e elevando as taxas cumulativas de sucesso de ciclos de transferência de embriões criopreservados.

6. Criopreservação de gâmetas masculinos e femininos

A primeira **criopreservação de espermatozoides** humanos remonta o ano de 1954 e ainda no mesmo ano conseguiram-se as primeiras gravidezes com recurso a sémen criopreservado (Bunge *et al.*, 1954). Mais recentemente, os resultados obtidos são satisfatórios com uma taxa de recuperação de células viáveis de cerca de 50% (Leibo *et al.*, 2002). Esta técnica, pela sua simplicidade, é muito utilizada em qualquer centro de RHA, tanto para amostras obtidas por ejaculação como por TESE. A criopreservação de gâmetas masculinos é aconselhada para pacientes que irão submeter-se a tratamentos de quimioterapia ou radioterapia (Leibo *et al.*, 2002); pacientes com problemas de ejaculação (evita-se o *stress* da amostra ser obtida no dia da punção folicular); pacientes que se ausentam frequentemente da cidade ou do país (por exemplo, por questões profissionais); ou homens que queiram adiar a sua paternidade. Esta técnica é também particularmente importante nos programas de doação de espermatozoides, permitindo uma melhor seleção dos dadores, como é referido mais à frente. A criopreservação de espermatozoides passa pelo tratamento da amostra seminal, através das técnicas de gradientes de densidades e *swim-up*. Este último é aspirado e diluído com um crioprotetor, sendo a amostra posteriormente armazenada a -196°C (azoto líquido).

Já a **criopreservação de ovócitos** é uma técnica mais complexa e que ainda carece de alguma investigação e métodos melhorados. Como o espermatozoide é uma célula pequena e tem pouco citoplasma, a sua criopreservação não afeta tanto a sua viabilidade, como acontece com os ovócitos. Estes são células muito maiores, com muito citoplasma e que estão em plena meiose. Como a criopreservação leva à formação de cristais de gelo que podem interferir com o reinício da meiose (Herrero *et al.*, 2011), a comunidade científica ainda não conseguiu estabelecer um protocolo de criopreservação para ovócitos que tenha resultados suficientemente satisfatórios, de modo a que passe a ser um procedimento de rotina dos laboratórios de RHA. Contudo, expectativas existem relativamente à vitrificação de ovócitos, pois esta induz menos danos celulares e apresenta maiores taxas de sobrevivência (Herrero *et al.*, 2011). A criopreservação de ovócitos será indicada para pacientes que irão ser submetidas a tratamentos de quimio ou radioterapia; pacientes que estejam em risco de hiperestimulação ovárica e que tenham questões éticas relacionadas com a criopreservação de embriões (Herrero *et al.*, 2011); em ciclos de doação de ovócitos

(evitando-se a necessidade de sincronização da dadora com a recetora) ou para pacientes que desejem adiar o seu projeto de maternidade.

7. Doação de gâmetas masculinos e femininos

A doação de gâmetas é permitida em Portugal, mas não a sua venda, de acordo com a lei nº 32/2006. Contudo, de acordo com o CNPMA, estão previstas compensações monetárias pelos incómodos, deslocamentos e possíveis faltas ao emprego que os dadores de gâmetas possam sofrer.

Os **possíveis dadores masculinos**, que deverão ter entre 18 e 40 anos, iniciam o programa de doação com a realização de um espermograma. Caso tenham uma amostra com os parâmetros dentro dos limites de referência (tabela 6), serão encaminhados para uma entrevista, onde é obtido o seu histórico de saúde e anotadas as suas características físicas. Posteriormente serão realizadas análises sanguíneas (com marcadores víricos) e a avaliação do cariótipo, que caso estejam conformes, permitem a entrada do dador no processo de dádivas. No total são realizadas cinco a seis colheitas, com uma abstinência de cerca de 3 a 4 dias entre cada uma. Em cada dádiva são avaliados os parâmetros de concentração e motilidade, sendo estas criopreservadas após o tratamento da amostra seminal através das técnicas de gradientes de densidades e *swim-up*. Estas dádivas são mantidas em quarentena durante 180 dias, passo obrigatório de modo a garantir a despistagem de doenças víricas. No fim da quarentena, o possível dador é contactado para realizar novas análises sanguíneas com os marcadores víricos. Só após a obtenção de resultados negativos para os marcadores víricos e normais para as análises sanguíneas é que o possível dador passa a dador efetivo e, a partir dessa data, as amostras criopreservadas poderão ser utilizadas em qualquer tratamento de RHA, desde IUI até à ICSI.

No caso das **dadoras de ovócitos**, o processo decorre de maneira ligeiramente diferente, pois devido à importância e escassez das células reprodutoras femininas, não é possível realizar uma punção folicular só para avaliar a sua qualidade. Assim, as dadoras de ovócitos passam primeiro pela entrevista, durante a qual é obtido o seu histórico de saúde e anotadas as suas características físicas. Apenas são aceites mulheres com idade entre 18 e 35 anos e cada dadora só poderá realizar 3 dádivas em toda a sua vida, com um intervalo mínimo de 6 meses entre cada punção folicular. Posteriormente à entrevista serão realizadas as análises sanguíneas com marcadores víricos e a avaliação do cariótipo. Se estiverem conformes e quando é encontrado um casal que seja compatível com a dadora (de acordo com o seu grupo sanguíneo e as

suas características físicas), esta inicia a estimulação ovárica, que será sincronizada com a preparação do endométrio da recetora, que irá receber os embriões. O papel da dadora termina no dia da punção folicular, sendo as dádivas realizadas a fresco, ao contrário dos dadores de espermatozoides.

8. Doenças crónicas virais

As doenças sexualmente transmissíveis continuam a ter um peso relevante para o aumento das doenças crónicas virais (DCV), com possíveis repercussões na gravidez e na fertilidade (Garolla *et al.*, 2013b). No topo da lista das infeções espermáticas estão o VIH (vírus da imunodeficiência humana), o VHC (vírus da hepatite C) e o VHB (Vírus da hepatite B) (Garolla *et al.*, 2013b). Presentemente, as diretivas europeias indicam que apenas os VIH, VHC e VHB devem ser avaliados antes de qualquer casal iniciar um tratamento de RHA (Wingfield and Cottell, 2010).

Existem várias alternativas para que casais que sofram de DCV consigam realizar o seu projeto parental, tais como:

- Pré exposição da pessoa não infetada ao antirretroviral com coito programado, para casais férteis que queiram conceber naturalmente (Savasi *et al.*, 2013a);
- Início antecipado de antirretrovirais²¹ pelo membro afetado e conceção natural (Cohen *et al.*, 2011);
- Lavagem da amostra seminal seguida de IIU, FIV ou ICSI (Savasi *et al.*, 2013a);
- Uso de espermatozoides de dador (Molina *et al.*, 2014);
- Doação de embriões de casais seronegativos (Molina *et al.*, 2014);
- Adoção (Molina *et al.*, 2014).

Contudo, a opção mais utilizada passa pela lavagem do sêmen, por preferência do casal (cujo desejo de ter um filho biológico é muito forte) ou recomendação do médico (Molina *et al.*, 2014).

8.1. A síndrome da imunodeficiência adquirida

A síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) afetava, em 2010, cerca de 35 milhões de pessoas em todo o mundo (Savasi *et al.*, 2013a). Nos últimos anos, as novas terapias antirretrovirais aplicadas no tratamento desta doença levaram a um grande aumento da esperança de vida, assim como da sua qualidade (Englert *et al.*, 2001). Deste modo, casais com um parceiro ou ambos seropositivos poderão considerar a realização do seu desejo de serem pais. As técnicas de RHA reduzem o risco de transmissão do vírus para o parceiro não infetado e ajudam os casais a conseguir uma gravidez (Mencaglia *et al.*, 2005; Savasi *et al.*, 2013a).

²¹ Durante muitos anos, a terapia antirretroviral era apenas iniciada quando a contagem de células CD4 (linfócitos T CD4) era inferior a 200 células por milímetro cúbico. No entanto, devido aos bons resultados obtidos tem havido uma tendência para o início antecipado da terapêutica, ou seja, antes da ocorrência desse evento (Cohen *et al.*, 2011).

Tanto gâmetas como embriões potencialmente infetados com o vírus da SIDA devem ser manuseados separadamente do resto dos tratamentos em curso, numa bancada de trabalho de biossegurança elevada (Savasi *et al.*, 2013a). O debate sobre se o vírus está realmente presente nos gâmetas masculinos continua aceso, devido aos vários estudos contraditórios (Savasi *et al.*, 2013a). Contudo, uma redução muito significativa da carga viral leva a que a probabilidade de transmissão seja muito baixa, ou até, nula (Savasi *et al.*, 2013a).

Nos casos em que o elemento masculino do casal é que possui o vírus, a primeira escolha passa pela lavagem da amostra seminal (Savasi *et al.*, 2013a). Contudo, não existem estudos bem desenhados que comprovem a eficácia deste método. Ainda assim, a maioria dos dados clínicos obtidos levam ao encorajamento do uso deste procedimento (Savasi *et al.*, 2013a). No que diz respeito a casais serodiscordantes em que a mulher é afetada, pouquíssimos são os ensaios realizados e, consequentemente, pouco ainda é sabido sobre a forma como o vírus afeta a fertilidade feminina e como poderá ser realizado o acompanhamento destes casais (Savasi *et al.*, 2013a).

8.2. Vírus da hepatite C

Estima-se que cerca de 150 milhões de pessoas estejam cronicamente afetadas pelo VHC (World Health Organization, 2012). Apesar da discussão ainda estar em aberto quanto à aceitação de casais serodiscordantes infetados com VHC para tratamentos de RHA, Savasi *et al.* (2013b), concluíram que a lavagem do esperma deverá ser utilizada antes do uso da amostra em técnicas de RHA, não sendo necessário a confirmação posterior da ausência do vírus por técnicas de PCR.

Hanafi *et al.* (2011) realizaram um estudo no qual compararam casais em ciclos de ICSI cuja mulher está infetada com VHC com casais em que as pacientes não se encontravam infetadas. O número de embriões divididos e a sua morfologia, não apresentaram diferenças significativas. Contudo, os autores concluíram que o primeiro grupo apresentou piores respostas hormonais à estimulação ovárica, além de menores taxas de gravidez. Portanto, existem dúvidas quanto ao sucesso de tratamentos de mulheres infetadas com o VHC.

Notas finais

É fascinante compreender todos os sentimentos e esperanças que estão em volta da área da RHA. Saber que uma pessoa pode dar a felicidade tremenda que é um filho a alguém que tanto o deseja, é muito gratificante. Contudo, nem sempre a atmosfera é preenchida pela alegria e é necessário saber gerir todas essas emoções da melhor forma, sempre com o interesse dos pacientes em primeiro lugar.

Este ano serviu para adquirir autonomia em algumas técnicas essenciais nesta área, tais como o espermograma, a preparação de amostras seminais para uso em técnicas de RHA, a pesquisa de ovócitos após a punção folicular e também para treinar outros procedimentos bastante mais complexos como a ICSI. O estágio tinha também como objetivos a familiarização com o laboratório e as suas rotinas, que incluíram a preparação de meios, a manutenção de *stocks*, o atendimento aos pacientes, a gestão dos processos, a classificação de embriões, entre outras. Houve também a oportunidade de assistir a técnicas que não são praticadas tão frequentemente, como a TESE e o DGPI.

Foi uma época de muita aprendizagem e trabalho, que foram essenciais para enraizar o meu desejo de desenvolver a minha carreira como embriologista e para fortalecer as bases técnicas e teóricas fundamentais para ser uma boa profissional.

Referências bibliográficas

- Abdalla, H., and Thum, M.Y. (2004). An elevated basal FSH reflects a quantitative rather than qualitative decline of the ovarian reserve. *Human Reproduction* 19, 893–898.
- Adashi, E.Y., Barri, P.N., Berkowitz, R., Braude, P., Bryan, E., Carr, J., Cohen, J., Collins, J., Devroey, P., Frydman, R., et al. (2003). Infertility therapy-associated multiple pregnancies (births): an ongoing epidemic. *Reproductive BioMedicine Online* 7, 515–542.
- Ajduk, A., and Zernicka-Goetz, M. (2013). Quality control of embryo development. *Molecular Aspects of Medicine* 34, 903–918.
- Allen, V.M., Wilson, R.D., and Cheung, A. (2006). Pregnancy outcomes after assisted reproductive technology. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada* 28, 220–233.
- Almeida, V.M., Sousa, A.P.M., Plancha, C., Leal, F., Figueiredo, H., and Silva, J. (2012). Classificação da qualidade embrionária. In *Orientações Técnicas Em Medicina Da Reprodução*, C.C. Jorge, ed. (Lisboa: Sociedade Portuguesa de Medicina da Reprodução), pp. 119–142.
- Alper, M.M. (2007). Treatment options III: in vitro fertilization. In *The Boston IVF Handbook of Infertility*, S.R. Bayer, M.M. Alper, and A.S. Penzias, eds. (Boston: Informa Healthcare), pp. 91–110.
- 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.
- American College of Obstetricians and Gynecologists (2013). Obesity in Pregnancy. *Obstetrics and Gynecology* 1–5.
- Van der Auwera, I., Pijnenborg, R., and Koninckx, P.R. (1999). The influence of in-vitro culture versus stimulated and untreated oviductal environment on mouse embryo development and implantation. *Human Reproduction* 14, 2570–2574.
- Barazani, Y., Stahl, P.J., Nagler, H.M., and Stember, D.S. (2012). Management of ejaculatory disorders in infertile men. *Asian Journal of Andrology* 14, 525–529.
- Barnes, F.L. (2009). Equipment and general technical aspects of micromanipulation of gametes and embryos. In *Textbook of Assisted Reproductive Technologies* -

Laboratory and Clinical Perspectives, D.K. Gardner, A. Weissman, C.M. Howles, and Z. Shoham, eds. (London: Informa Healthcare), pp. 163–170.

Bartoov, B., Berkovitz, A., Eltes, F., Kogosowski, A., Menezes, Y., and Barak, Y. (2002). Real-Time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *Journal of Andrology* 23, 1–8.

Bayer, S.R. (2007). Treatment options II: intrauterine insemination. In *The Boston IVF Handbook of Infertility*, S.R. Bayer, M.M. Alper, and A.S. Penzias, eds. (Boston: Informa Healthcare), pp. 85–90.

Bayer, S.R., and Alper, M.M. (2007). The infertility workup. In *The Boston IVF Handbook of Infertility*, S.R. Bayer, M.M. Alper, and A.S. Penzias, eds. (Boston: Informa Healthcare), pp. 25–44.

Bayer, S.R., Alper, M.M., and Penzias, A.S. (2002). *The Boston IVF Handbook of Infertility* (London: The Parthenon Publishing).

Bayer, S.R., Alper, M.M., and Penzias, A.S. (2007). Infertility treatment options: the basics. In *The Boston IVF Handbook of Infertility*, S.R. Bayer, M.M. Alper, and A.S. Penzias, eds. (Boston: Parthenon Publishing Group), pp. 75–88.

Bergh, C. (2005). Single embryo transfer: a mini-review. *Human Reproduction* 20, 323–327.

Björndahl, L., and Kvist, U. (2003). Sequence of ejaculation affects the spermatozoon as a carrier and its message. *Reproductive Biomedicine Online* 7, 440–448.

Van Blerkom, J., Davis, P., and Alexander, S. (2001). A microscopic and biochemical study of fragmentation phenotypes in stage-appropriate human embryos. *Human* 16, 719–729.

Bourne, H., Archer, J., Edgar, D.H., and Baker, H.W.G. (2009). Sperm preparation techniques. In *Textbook of Assisted Reproductive Technologies - Laboratory and Clinical Perspectives*, D.K. Gardner, A. Weissman, C.M. Howles, and Z. Shoham, eds. (London: Informa Healthcare), pp. 53–66.

Brinsden, P., Hartshorne, G., Hirsh, A., Owen, E., Reiss, H., and Reiss, M. (1998). *Reproductive Medicine from A-Z* (Oxford: Oxford University Press).

Brugo-Olmedo, S., Chillik, C., and Kopelman, S. (2001). Definition and causes of infertility. *Reproductive BioMedicine Online* 2, 173–185.

Bunge, R.G., Keettel, W.C., and Sherman, J.K. (1954). Clinical use of frozen semen: report of four cases. *Fertil Steril* 5, 520–529.

Chamayou, S., Patrizio, P., Storaci, G., Tomaselli, V., Alecci, C., Ragolia, C., Crescenzo, C., and 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.

Charehjooy, N., Najafi, M.H., Tavalaei, M., Deemeh, M.R., Azadi, L., Shiravi, A.H., and Nasr-Esfahani, M.H. (2014). Selection of sperm based on hypo-osmotic swelling may improve ICSI outcome: a preliminary prospective clinical trial. *International Journal of Fertility and Sterility* 8, 21–28.

Chen, A.A., Tan, L., Suraj, V., Pera, R.R., and Shen, S. (2013). Biomarkers identified with time-lapse imaging: discovery, validation, and practical application. *Fertility and Sterility* 99, 1035–1043.

Cockburn, K., and Rossant, J. (2010). Making the blastocyst: lessons from the mouse. *The Journal of Clinical Investigation* 120, 995–1003.

Cohen, J., Alikani, M., and Bisignano, A. (2012). Past performance of assisted reproduction technologies as a model to predict future progress: a proposed addendum to Moore's law. *Reproductive Biomedicine Online* 25, 585–590.

Cohen, M.S., Chen, Y.Q., McCauley, M., Gamble, T., Hosseinipour, M.C., Kumarasamy, N., Hakim, J.G., Kumwenda, J., Grinsztejn, B., Pilotto, J.H.S., et al. (2011). Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *The New England Journal of Medicine* 365, 493–505.

Cutting, R., Morroll, D., Roberts, S.A., Pickering, S., and Rutherford, A. (2008). Elective single embryo transfer: guidelines for practice British Fertility Society and Association of Clinical Embryologists. *Human Fertility* 11, 131–146.

Dozortsev, D., Nagy, P., Abdelmassih, S., Oliveira, F., Brasil, A., Abdelmassih, V., Diamond, M., and Abdelmassih, R. (2004). The optimal time for intracytoplasmic sperm injection in the human is from 37 to 41 hours after administration of human chorionic gonadotropin. *Fertility and Sterility* 82, 1492–1496.

Dumoulin, J.C., Land, J.A., Van Montfoort, A.P., Nelissen, E.C., Coonen, E., Derhaag, J.G., Schreurs, I.L., Dunselman, G.A., Kester, A.D., Geraedts, J.P., et al. (2010). Effect of in vitro culture of human embryos on birthweight of newborns. *Human Reproduction* 25, 605–612.

Dunselman, G.A.J., Vermeulen, N., Becker, C., Calhaz-Jorge, C., D’Hooghe, T., De Bie, B., Heikinheimo, O., Horne, A.W., Kiesel, L., Nap, A., et al. (2014). ESHRE guideline: management of women with endometriosis. *Human Reproduction* 29, 400–412.

Ebner, T. (2003). Developmental competence of oocytes showing increased cytoplasmic viscosity. *Human Reproduction* 18, 1294–1298.

Englert, Y., Van Vooren, J.-P., Place, I., Liesnard, C., Laruelle, C., and Delbaere, A. (2001). ART in HIV-infected couples. Has the time come for a change of attitude? *Human Reproduction* 16, 1309–1315.

Esteves, S.C., and Varghese, A.C. (2012). Laboratory handling of epididymal and testicular spermatozoa: what can be done to improve sperm injections outcome. *Journal of Human Reproductive Sciences* 5, 233–243.

Eugster, A., and Vingerhoets, A.J.J.M. (1999). Psychological aspects of in vitro fertilization: a review. *Social Science & Medicine* 48, 575–589.

Fauser, B.C.J.M., Devroey, P., and Macklon, N.S. (2005). Multiple birth resulting from ovarian stimulation for subfertility treatment. *Lancet* 365, 1807–1816.

Fenwick, J., Platteau, P., Murdoch, A.P., and Herbert, M. (2002). Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Human Reproduction* 17, 407–412.

Ferraretti, A.P., La Marca, A., Fauser, B.C.J.M., Tarlatzis, B., Nargund, G., and Gianaroli, L. (2011). ESHRE consensus on the definition of “poor response” to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Human Reproduction* 26, 1616–1624.

Ferraretti, A.P., Goossens, V., Kupka, M., Bhattacharya, S., Mouzon, J. de, Castilla, J.A., Erb, K., Korsak, V., Andersen, A.N., and The European IVF-monitoring Consortium for the ESHRE (2013). Assisted reproductive technology in Europe, 2009: results generated from european registers by ESHRE. *Human Reproduction* 28, 2318–2331.

Filho, E.S., Noble, J.A., and Wells, D. (2010). A review on automatic analysis of human embryo microscope images. *The Open Biomedical Engineering Journal* 4, 170–177.

Filho, E.S., Noble, J.A., Poli, M., Griffiths, T., Emerson, G., and Wells, D. (2012). A method for semi-automatic grading of human blastocyst microscope images. *Human Reproduction* 27, 2641–2648.

- Florensa, M., Esbert, M., Calderón, G., Ballesteros, A., and Remohí, J. (2008). Transferencia de embriones. In *Manual Prático de Esterilidade Y Reproducción Humana*, J. Remohí, A. Cobo, J.L. Romero, M.J. de los Santos, and A. Pellicer, eds. (Madrid: McGraw-Hill Interamericana), pp. 237–244.
- Fragouli, E., and Wells, D. (2011). Aneuploidy in the human blastocyst. *Cytogenetic and Genome Research* 133, 149–159.
- Franken, D.R., Oehninger, S., Burkman, L.J., Coddington, C.C., Kruger, T.F., Rosenwaks, Z., Acosta, A.A., and Hodgen, G.D. (1989). The hemizona assay (HZA): a predictor of human sperm fertilizing potential in in vitro fertilization (IVF) treatment. *Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer* : IVF 6, 44–50.
- Galán, A., Campos, P., Blanco, C., Salinas, R., and Cobo, A. (2008). Inseminación de los ovocitos. In *Manual Prático de Esterilidade Y Reproducción Humana*, J. Remohí, A. Cobo, J.L. Romero, M.J. de los Santos, and A. Pellicer, eds. (Madrid: McGraw-Hill Interamericana), pp. 151–156.
- Gámiz, P., Rubio, C., Santos, M.J. de los, Mercader, A., Simón, C., Remohí, J., and Pellicer, A. (2003). The effect of pronuclear morphology on early development and chromosomal abnormalities in cleavage-stage embryos. *Human Reproduction* 18, 2413–2419.
- Gámiz, P., Santos, M.J. de los, Romero, J.L., and Pérez, S. (2008). Valoración de la fecundación. In *Manual Prático de Esterilidade Y Reproducción Humana*, J. Remohí, A. Cobo, J.L. Romero, M.J. de los Santos, and A. Pellicer, eds. (Madrid: McGraw-Hill Interamericana), pp. 177–187.
- Gardner, D.K., and Lane, M. (1997). Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Human Reproduction Update* 3, 367–382.
- Gardner, D.K., and Lane, M. (2009). Culture systems for the human embryo. In *Textbook of Assisted Reproductive Technologies - Laboratory and Clinical Perspectives*, D.K. Gardner, A. Weissman, C.M. Howles, and Z. Shoham, eds. (London: Informa Healthcare), pp. 219–240.
- Gardner, D.K., Vella, P., Lane, M., Wagley, L., Schlenker, T., and Schoolcraft, W.B. (1998). Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertility and Sterility* 69, 84–88.

- Garolla, A., Torino, M., Sartini, B., Cosci, I., Patassini, C., Carraro, U., and Foresta, C. (2013a). Seminal and molecular evidence that sauna exposure affects human spermatogenesis. *Human Reproduction* 28, 877–885.
- Garolla, A., Pizzol, D., Bertoldo, A., Menegazzo, M., Barzon, L., and Foresta, C. (2013b). Sperm viral infection and male infertility: focus on HBV, HCV, HIV, HPV, HSV, HCMV, and AAV. *Journal of Reproductive Immunology* 100, 20–29.
- Gerris, J. (1999). Methods of semen collection not based on masturbation or surgical sperm retrieval. *Human Reproduction Update* 5, 211–215.
- Glujovsky, D., Blake, D., Bardach, A., and Farquhar, C. (2013). Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- Gómez, E., Amorocho, B., López, D., Santana, A., Fernández, L., and Nicolás, M. (2008). Preparación de los ovocitos para la microinyección. In *Manual Práctico de Esterilidad Y Reproducción Humana*, J. Remohí, A. Cobo, J.L. Romero, M.J. de los Santos, and A. Pellicer, eds. (Madrid: McGraw-Hill Interamericana), pp. 161–164.
- Hajdu, J., Beke, A., Marton, T., Hruby, E., Pete, B., and Papp, Z. (2006). Congenital heart diseases in twin pregnancies. *Fetal Diagnosis and Therapy* 21, 198–203.
- Hammadeh, M.E., Fischer-Hammadeh, C., and Ali, K.R. (2011). Assisted hatching in assisted reproduction: a state of the art. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 28, 119–128.
- Hanafi, N.F., Abo Ali, A.H., and Abo el kheir, H.F. (2011). ICSI outcome in women who have positive PCR result for hepatitis C virus. *Human Reproduction* 26, 143–147.
- Harper, J.C., and Harton, G. (2010). The use of arrays in preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertility and Sterility* 94, 1173–1177.
- Harton, G.L., Magli, M., C., Lundin, K., Montag, M., Lemmen, J., and Harper, J.C. (2011). ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group - best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS). *Human Reproduction* 26, 41–46.
- Hassan, M.A.M., and Killick, S.R. (2004). Is previous use of hormonal contraception associated with a detrimental effect on subsequent fecundity? *Human Reproduction* 19, 344–351.

Hassold, T., and Hunt, P. (2009). Maternal age and chromosomally abnormal pregnancies: what we know and what we wish we knew. *Current Opinion in Pediatrics* 21, 703–708.

Hassold, T., Hall, H., and Hunt, P. (2007). The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Human Molecular Genetics* 16, R203–R208.

Henkel, R.R., and Schill, W.-B. (2003). Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1, 108–129.

Herrero, L., Martínez, M., and Garcia-Velasco, J.A. (2011). Current status of human oocyte and embryo cryopreservation. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 23, 245–250.

Horsthemke, B., and Ludwig, M. (2005). Assisted reproduction: the epigenetic perspective. *Human Reproduction Update* 11, 473–482.

Hovatta, O. (2009). Medical considerations of single embryo transfer. In *Textbook of Assisted Reproductive Technologies - Laboratory and Clinical Perspectives*, D.K. Gardner, A. Weissman, C.M. Howles, and Z. Shoham, eds. (London: Informa Healthcare), pp. 707–710.

James, A.N., Hennessy, S., Reggio, B., Wiemer, K., Larsen, F., and Cohen, J. (2006). The limited importance of pronuclear scoring of human zygotes. *Human Reproduction* 21, 1599–1604.

Jensen, T.K., Swan, S.H., Skakkebaek, N.E., Rasmussen, S., and Jørgensen, N. (2010). Caffeine intake and semen quality in a population of 2554 young Danish men. *American Journal of Epidemiology* 171, 883–891.

Jeyendran, R.S. (2003). *Protocols for Semen Analysis in Clinical Diagnosis* (London: Parthenon Publishing Group).

Källén, B., Finnström, O., Lindam, A., Nilsson, E., Nygren, K.-G., and Otterblad, P.O. (2010a). Congenital malformations in infants born after in vitro fertilization in Sweden. *Birth Defects Research (Part A): Clinical and Molecular Teratology* 88, 137–143.

Källén, B., Finnström, O., Lindam, A., Nilsson, E., Nygren, K.-G., and Olausson, P.O. (2010b). Blastocyst versus cleavage stage transfer in in vitro fertilization: differences in neonatal outcome? *Fertility and Sterility* 94, 1680–1683.

Katz, D.F., Diehl, L., and Overstreet, J.W. (1982). Differences in the movement of morphologically normal and abnormal human seminal spermatozoa. *Biology of Reproduction* 26, 566–570.

Keel, B.A. (2006). Within- and between-subject variation in semen parameters in infertile men and normal semen donors. *Fertility and Sterility* 85, 128–134.

Kennedy, S., Bergqvist, A., Chapron, C., D'Hooghe, T., Dunselman, G., Greb, R., Hummelshoj, L., Prentice, A., and Saridogan, E. (2005). ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Human Reproduction* 20, 2698–2704.

Kirkegaard, K., Hindkjaer, J.J., and Ingerslev, H.J. (2012a). Human embryonic development after blastomere removal: a time-lapse analysis. *Human Reproduction* 27, 97–105.

Kirkegaard, K., Agerholm, I.E., and Ingerslev, H.J. (2012b). Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. *Human Reproduction* 27, 1277–1285.

Kouru, K.H., Malmgren, H., Nordenskjöld, M., Fridström, M., Csemiczky, G., and Blennow, E. (2012). One-cell biopsy significantly improves the outcome of preimplantation genetic diagnosis (PGD) treatment: retrospective analysis of 569 PGD cycles at the Stockholm PGD centre. *Human Reproduction* 27, 2843–2849.

Kühnert, B., and Nieschlag, E. (2004). Reproductive functions of the ageing male. *Human Reproduction Update* 10, 327–339.

Laway, B.A., and Mir, S.A. (2013). Pregnancy and pituitary disorders: Challenges in diagnosis and management. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* 17, 996–1004.

Leibo, S.P., Picton, H.M., and Gosden, R.G. (2002). Cryopreservation of human spermatozoa. In *Current Practices and Controversies in Assisted Reproduction - Report of a Meeting*, E. Vayena, P.J. Rowe, and P.D. Griffin, eds. (Geneva: World Health Organization), pp. 152–165.

Lemmen, J., Agerholm, I., and Ziebe, S. (2008). Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reproductive BioMedicine Online* 17, 385–391.

Lesny, P., Killick, S.R., Tetlow, R.L., Robinson, J., and Maguiness, S.D. (1998). Uterine junctional zone contractions during assisted reproduction cycles. *Human Reproduction Update* 4, 440–445.

Mansour, R. (1998). Intracytoplasmic sperm injection: a state of the art technique. *Human Reproduction Update* 4, 43–56.

Mascarenhas, M.N., Flaxman, S.R., Boerma, T., Vanderpoel, S., and 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.

Medical Advisory Secretariat (2006). In Vitro Fertilization and Multiple Pregnancies: an evidence-based analysis. Ontario Health Technology Assessment Series 6.

Mencaglia, L., Falcone, P., Lentini, G.M., Consigli, S., Pisoni, M., Lofiego, V., Guidetti, R., Piomboni, P., and De Leo, V. (2005). ICSI for treatment of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus-serodiscordant couples with infected male partner. *Human Reproduction* 20, 2242–2246.

Menkveld, R., Wong, W.Y., Lombard, C.J., Wetzels, A.M.M., Thomas, C.M.G., Merkus, H.M.W.M., and Steegers-Theunissen, R.P.M. (2001). Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Human Reproduction* 16, 1165–1171.

Merlob, P., Sapir, O., Sulkes, J., and Fisch, B. (2005). The prevalence of major congenital malformations during two periods of time, 1986-1994 and 1995-2002 in newborns conceived by assisted reproduction technology. *European Journal of Medical Genetics* 48, 5–11.

Meseguer, M., Martínez-Conejero, J. a., O'Connor, J.E., Pellicer, A., Remohí, J., and Garrido, N. (2008). The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program: a new model to study a male infertility prognostic factor. *Fertility and Sterility* 89, 1191–1199.

Meuleman, C., Vandenabeele, B., Fieuws, S., Spiessens, C., Timmerman, D., and D'Hooghe, T. (2009). High prevalence of endometriosis in infertile women with normal ovulation and normospermic partners. *Fertility and Sterility* 92, 68–74.

Molina, I., Gonzalvo, M. del C., Clavero, A., López-Ruz, M.Á., Mozas, J., Pasquau, J., Sampedro, A., Martínez, L., and Castilla, J.A. (2014). Assisted reproductive technology and obstetric outcome in couples when the male partner has a chronic viral disease. *International Journal of Fertility and Sterility* 7, 291–300.

Lo Monte, G., Murisier, F., Piva, I., Germond, M., and Marci, R. (2013). Focus on intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI): a mini-review. *Asian Journal of Andrology* 15, 608–615.

Van Montfoort, A.P.A., Dumoulin, J.C.M., Kester, A.D.M., and Evers, J.L.H. (2004). Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. *Human Reproduction* 19, 2103–2108.

Van Montfoort, A.P.A., Dumoulin, J.C.M., Land, J.A., Coonen, E., Derhaag, J.G., and Evers, J.L.H. (2005). Elective single embryo transfer (eSET) policy in the first three IVF/ICSI treatment cycles. *Human Reproduction* 20, 433–436.

Mortimer, D., and Menkveld, R. (2001). Sperm morphology assessment - historical perspectives and current opinions. *Journal of Andrology* 22, 192–205.

Nabi, A., Khalili, M.A., Halvaei, I., and Roodbari, F. (2014). Prolonged incubation of processed human spermatozoa will increase DNA fragmentation. *Andrologia* 46, 374–379.

NAFA, and ESHRE-SIGA (2002). *Manual on Basic Semen Analysis*.

Nasr-Esfahani, M.H., Aboutorabi, R., Esfandiari, E., and Mardani, M. (2002). Sperm MTT viability assay: a new method for evaluation of human sperm viability. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 19, 477–482.

Niemitz, E.L., and Feinberg, A.P. (2004). Epigenetics and assisted reproductive technology: a call for investigation. *American Journal of Human Genetics* 74, 599–609.

Noone, P.G., Leigh, M.W., Sannuti, A., Minnix, S.L., Carson, J.L., Hazucha, M., Zariwala, M.A., and Knowles, M.R. (2004). Primary ciliary dyskinesia: diagnostic and phenotypic features. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 169, 459–467.

Ombelet, W., De Sutter, P., Van der Elst, J., and Martens, G. (2005). Multiple gestation and infertility treatment: registration, reflection and reaction - the Belgian project. *Human Reproduction Update* 11, 3–14.

Oskowitz, S.P. (2007). Treatment options I: ovulation induction. In *The Boston IVF Handbook of Infertility*, S.R. Bayer, M.M. Alper, and A.S. Penzias, eds. (Boston: Informa Healthcare), pp. 75–84.

Otsuki, J., Okada, A., Morimoto, K., Nagai, Y., and Kubo, H. (2004). The relationship between pregnancy outcome and smooth endoplasmic reticulum clusters in MII human oocytes. *Human Reproduction* 19, 1591–1597.

Palermo, G.D., Schlegel, P.N., Colombero, L.T., Zaninovic, N., Moy, F., and Rosenwaks, Z. (1996). Aggressive sperm immobilization prior to intracytoplasmic

sperm injection with immature spermatozoa improves fertilization and pregnancy rates. *Human Reproduction* 11, 1023–1029.

Papale, L., Fiorentino, A., Montag, M., and Tomasi, G. (2012). The zygote. *Human Reproduction* 27 *Suppl* 1, i22–i49.

Paulozzi, L.J. (1999). International trends in rates of hypospadias and cryptorchidism. *Environmental Health Perspectives* 107, 297–302.

Petersen, C.G., Mauri, A.L., Baruffi, R.L., Oliveira, J.B.A., Massaro, F.C., Elder, K., and Franco Jr, J.G. (2005). Implantation failures: success of assisted hatching with quarter-laser zona thinning. *Reproductive BioMedicine Online* 10, 224–229.

Pinborg, A. (2005). IVF/ICSI twin pregnancies: risks and prevention. *Human Reproduction Update* 11, 575–593.

Poongothai, J., Gopenath, T.S., and Manonayaki, S. (2009). Genetics of human male infertility. *Singapore Medical Journal* 50, 336–347.

Prados, N., Crespo, M., Hernáez, M.J., Ruiz, M., García, J., Vime, P., Calderón, G., and Fernández-Sánchez, M. (2008). Criterios de selección embrionaria. In *Manual Práctico de Esterilidad Y Reproducción Humana*, J. Remohí, A. Cobo, J.L. Romero, M.J. de los Santos, and A. Pellicer, eds. (Madrid: McGraw-Hill Interamericana), pp. 201–214.

Ramlau-Hansen, C.H., Thulstrup, A.M., Aggerholm, A.S., Jensen, M.S., Toft, G., and Bonde, J.P. (2007). Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis. *Human Reproduction* 22, 188–196.

Ray, A., Shah, A., Gudi, A., and Homburg, R. (2012). Unexplained infertility: an update and review of practice. *Reproductive BioMedicine Online* 24, 591–602.

Regateiro, F.J. (2007). *Relatório sobre Diagnóstico Genético Pré-Implantação* (Lisboa).

Rienzi, L., Vajta, G., and Ubaldi, F. (2011). Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature. *Human Reproduction Update* 17, 34–45.

Rienzi, L., Balaban, B., Ebner, T., and Mandelbaum, J. (2012). The oocyte. *Human Reproduction* 27, i2–i21.

Rijnders, P.M., and Jansen, C.A.M. (1998). The predictive value of day 3 embryo morphology regarding blastocyst formation, pregnancy and implantation rate after day

5 transfer following in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 13, 2869–2873.

Rowland, D., McMahon, C.G., Abdo, C., Chen, J., Jannini, E., Waldinger, M.D., and Ahn, T.Y. (2010). Disorders of orgasm and ejaculation in men. *The Journal of Sexual Medicine* 7, 1668–1686.

Sakkas, D., and Gardner, D.K. (2009). Evaluation of embryo quality: new strategies to facilitate single embryo transfer. In *Textbook of Assisted Reproductive Technologies - Laboratory and Clinical Perspectives*, D.K. Gardner, A. Weissman, C.M. Howles, and Z. Shoham, eds. (London: Informa Healthcare), pp. 241–256.

Sakkas, D., Shoukir, Y., Chardonens, D., Bianchi, P.G., and Campana, A. (1998). Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Human Reproduction* 13, 182–187.

Salom, M.G. (2004). Técnicas de recuperación espermática para inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) en infertilidad masculina. *Archivos Españoles de Urología* 57, 1035–1046.

Sampaio, M.G., Tavares, A., Pinto, G., Nunes, J., and Dantas, S. (2012). Indução da ovulação. In *Orientações Técnicas Em Medicina Da Reprodução*, C.C. Jorge, ed. (Lisboa: Sociedade Portuguesa de Medicina da Reprodução), pp. 33–49.

Santos, J.M. de los, Romero, J.L., Zulategui, J.F., Pérez, S., and Santos, M.J. de los (2008). Fallo de fecundación total. In *Manual Prático de Esterilidad Y Reproducción Humana*, J. Remohí, A. Cobo, J.L. Romero, M.J. de los Santos, and A. Pellicer, eds. (Madrid: McGraw-Hill Interamericana), pp. 189–199.

Savasi, V., Mandia, L., Laoreti, A., and Cetin, I. (2013a). Reproductive assistance in HIV serodiscordant couples. *Human Reproduction Update* 19, 136–150.

Savasi, V., Oneta, M., Parrilla, B., and Cetin, I. (2013b). Should HCV discordant couples with a seropositive male partner be treated with assisted reproduction techniques (ART)? *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 167, 181–184.

Schmidt, L. (2006). Infertility and assisted reproduction in Denmark. *Epidemiology and psychosocial consequences*. *Danish Medical Bulletin* 53, 390–417.

Schmoll, F., Schneider, H., Montag, M., Wimmers, K., Rink, K., and Schellander, K. (2003). Effects of different laser-drilled openings in the zona pellucida on hatching of in vitro–produced cattle blastocysts. *Fertility and Sterility* 80, 714–719.

Scott, L. (2003). Pronuclear scoring as a predictor of embryo development. *Reproductive BioMedicine Online* 6, 201–214.

Scott, L., Finn, A., O'Leary, T., McLellan, S., and Hill, J. (2007). Morphologic parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates. *Human Reproduction* 22, 230–240.

Seif, M.M.W., Edi-Osagie, E.C.O., Farquhar, C., Hooper, L., Blake, D., and McGinlay, P. (2008). Assisted hatching on assisted conception (IVF & ICSI) (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews*.

Sharpe, R.M. (2010). Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London: Biological Sciences* 365, 1697–1712.

Shoham, Z., and Howles, C.M. (2009). Drugs used for ovarian stimulation: clomiphene citrate, aromatase inhibitors, metformin, gonadotropins, gonadotropin-releasing hormone analogs, and recombinant gonadotropins. In *Textbook of Assisted Reproductive Technologies - Laboratory and Clinical Perspectives*, D.K. Gardner, A. Weissman, C.M. Howles, and Z. Shoham, eds. (London: Informa Healthcare), pp. 469–488.

Sills, E.S., and Palermo, G.D. (2010). Human blastocyst culture in IVF: current laboratory applications in reproductive medicine practice. *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 51, 441–445.

Silva-Carvalho, J.L., and Santos, A. (2009). Estudo Afrodite: Caracterização da infertilidade em Portugal (Vol. 1. Estudo na Comunidade) (Porto).

Silverberg, K., and Turner, T. (2009). Evaluation of sperm. In *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Laboratory and Clinical Perspectives*, D.K. Gardner, A. Weissman, C.M. Howles, and Z. Shoham, eds. (London: Informa Healthcare), pp. 39–52.

Soares, A.P., Santos, A.T.A., Reis, I., Guimarães, J.M., and Silvestre, M. (2012). Síndrome de Hiperestimulação Ovárica. In *Orientações Técnicas Em Medicina Da Reprodução*, C. Calhaz-Jorge, ed. (Lisboa: Sociedade Portuguesa de Medicina da Reprodução), pp. 143–155.

Soares, S.R., Troncoso, C., Bosch, E., Serra, V., Simón, C., Remohí, J., and Pellicer, A. (2005). Age and uterine receptiveness: predicting the outcome of oocyte donation cycles. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90, 4399–4404.

Soares, S.R., Simon, C., Remohí, J., and Pellicer, A. (2007). Cigarette smoking affects uterine receptiveness. *Human Reproduction* 22, 543–547.

Sobral, D., Barata, M., Carvalho, M.J., Reis, S., and Sousa, S. (2012). Estilos de Vida e Reprodução. In *Orientações Técnicas Em Medicina Da Reprodução*, C.C. Jorge, ed. (Lisboa: Sociedade Portuguesa de Medicina da Reprodução), pp. 9–32.

Soderstrom-Anttila, V. (2003). Elective single embryo transfer yields good delivery rates in oocyte donation. *Human Reproduction* 18, 1858–1863.

Söderström-Anttila, V., and Vilska, S. (2007). Five years of single embryo transfer with anonymous and non-anonymous oocyte donation. *Reproductive BioMedicine Online* 15, 428–433.

Stephansson, O., Kieler, H., Granath, F., and Falconer, H. (2009). Endometriosis, assisted reproduction technology, and risk of adverse pregnancy outcome. *Human Reproduction* 24, 2341–2347.

Strassburger, D., Friedler, S., Raziel, A., Kasterstein, E., Schachter, M., and Ron-El, R. (2004). The outcome of ICSI of immature MI oocytes and rescued in vitro matured MII oocytes. *Human Reproduction* 19, 1587–1590.

Taylor, T.H., Elliott, T., Colturato, L.F., Straub, R.J., Mitchell-Leef, D., and Nagy, Z.P. (2006). Comparison of bovine- and recombinant human-derived hyaluronidase with regard to fertilization rates and embryo morphology in a sibling oocyte model: a prospective, blinded, randomized study. *Fertility and Sterility* 85, 1544–1546.

Teixeira, D.M., Barbosa, M.A.P., Ferriani, R.A., Navarro, P.A., Raine-Fenning, N., Nastri, C.O., and Martins, W.P. (2013). Regular (ICSI) versus ultra-high magnification (IMSI) sperm selection for assisted reproduction. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.

Teles, N.O. (2011). Diagnóstico genético pré-implantação - aspetos técnicos e considerações éticas. *Acta Médica Portuguesa* 24, 987–996.

Templeton, A. (2000). Infertility and the establishment of pregnancy - overview. *British Medical Bulletin* 56, 577–587.

The Committee on Gynecologic Practice of the American College of Obstetricians and Gynecologists, and Medicine, T.P.C. of the A.S. for R. (2008). Age-related fertility decline: a committee opinion. *Fertility and Sterility* 90, 486–487.

The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (2008). Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertility and Sterility* 90, S60.

The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, and The Practice Committee of the Society for Assisted Reproduction Technology (2014). Role of assisted hatching in in vitro fertilization: a guideline. *Fertility and Sterility* 102, 348–351.

Thornhill, A.R., Die-Smulders, C.E. de, Geraedts, J.P., Harper, J.C., Harton, G.L., Lavery, S.A., Moutou, C., Robinson, M.D., Schmutzler, A.G., Scriven, P.N., et al. (2005). ESHRE PGD Consortium 'Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS). *Human Reproduction* 20, 35–48.

Tiitinen, A., Hydén-Granskog, C., and Gissler, M. (2004). What is the most relevant standard of success in assisted reproduction? The value of cryopreservation on cumulative pregnancy rates per single oocyte retrieval should not be forgotten. *Human Reproduction* 19, 2439–2441.

Torgal, I., Aguiar, A., Oliveira, C., Reis, I.S., Calejo, L., and Matias, S. (2012). Inseminação intra-uterina. In *Orientações Técnicas Em Medicina Da Reprodução* 2, C.C. Jorge, ed. (Lisboa: Sociedade Portuguesa de Medicina da Reprodução), pp. 95–117.

Veeck, L.L. (2003). Does the developmental stage at freeze impact on clinical results post-thaw? *Reproductive BioMedicine Online* 6, 367–374.

De Vos, A., Van de Velde, H., Joris, H., and Van Steirteghem, A. (1999). In-vitro matured metaphase-I oocytes have a lower fertilization rate but similar embryo quality as mature metaphase-II oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 14, 1859–1863.

Walker, M.C., Murphy, K.E., Pan, S., Yang, Q., and Wen, S.W. (2004). Adverse maternal outcomes in multifetal pregnancies. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 111, 1294–1296.

Wan, C.-Y., Song, C., Diao, L.-H., Li, G.-G., Bao, Z.-J., Hu, X.-D., Zhang, H.-Z., and Zeng, Y. (2014). Laser-assisted hatching improves clinical outcomes of vitrified–warmed blastocysts developed from low-grade cleavage-stage embryos : a prospective randomized study. *Reproductive BioMedicine Online* 28, 582–589.

Waylen, A.L., Metwally, M., Jones, G.L., Wilkinson, A.J., and Ledger, W.L. (2009). Effects of cigarette smoking upon clinical outcomes of assisted reproduction: a meta-analysis. *Human Reproduction Update* 15, 31–44.

Wingfield, M., and Cottell, E. (2010). Viral screening of couples undergoing partner donation in assisted reproduction with regard to EU Directives 2004/23/EC, 2006/17/EC and 2006/86/EC: what is the evidence for repeated screening? *Human Reproduction* 25, 3058–3065.

Wong, C., Chen, A.A., Behr, B., and Shen, S. (2013). Time-lapse microscopy and image analysis in basic and clinical embryo development research. *Reproductive BioMedicine Online* 26, 120–129.

Wong, K.M., Mastenbroek, S., and Repping, S. (2014). Cryopreservation of human embryos and its contribution to in vitro fertilization success rates. *Fertility and Sterility* 102, 19–26.

World Health Organization (2010). WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen (Geneva: WHO Press).

World Health Organization (2012). Prevention & Control of Viral Hepatitis Infection : Framework for Global Action.

Zegers-Hochschild, F., Adamson, G.D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., Sullivan, E., and Vanderpoel, S. (2009). International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertility and Sterility* 92, 1520–1524.

Zulategui, J.F., Cobo, A., Romero, J.L., Galán, A., Albert, C., and Santos, M.J. de los (2008). Inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI). In *Manual Prático de Esterilidad Y Reproducción Humana*, J. Remohí, A. Cobo, J.L. Romero, M.J. de los Santos, and A. Pellicer, eds. (Madrid: McGraw-Hill Interamericana), pp. 165–176.

ANEXOS

Anexo A - Tabela de concordâncias para a avaliação da motilidade dos espermatozoides. Adaptado de NAFA & ESHRE (2002).

Média em percentagem	Diferença limite
0	1
1	2
2-3	3
4-6	4
7-9	5
10-13	6
14-19	7
20-27	8
28-44	9
45-55	10
56-72	9
73-80	8
81-86	7
87-90	6
91-93	5
94-96	4
97-98	3
99	2
100	1

APÊNDICE

De modo a complementar o meu relatório de estágio, redigi uma pequena revisão da literatura sobre o sistema de time-lapse. Este sistema tem ganho bastante notoriedade na comunidade de embriologistas por todo o mundo. Contudo é ainda necessário perceber a relação entre os seus custos e benefícios e se este equipamento ajudará realmente a melhorar as taxas de sucesso da RHA.

I. O sistema de time-lapse no laboratório de RHA

i. Tipos de avaliação embrionária

A seleção dos embriões a transferir é baseada em métodos que dão uma pista direta ou indireta sobre o seu potencial de implantação (Montag *et al.*, 2013). São aplicados desde o ovócito até à fase de blastocisto (Montag *et al.*, 2013). Um dos eventos chave para o sucesso de um ciclo de tratamento de infertilidade é a transferência do embrião com maior potencial de implantação (Cruz *et al.*, 2011). Assim, numerosos critérios têm sido propostos e, de entre esses, a avaliação morfológica e estática tem sido o método mais utilizado para a seleção do embrião a transferir (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). Os métodos de avaliação embrionária podem ser divididos em duas classes: invasivos e não invasivos. Os métodos invasivos, ao contrário dos não invasivos, podem provocar alterações no desenvolvimento embrionário devido ao possível impacto da biópsia de células (Montag *et al.*, 2013).

▪ Métodos invasivos:

- **DGPI** – implica a biópsia de glóbulos polares, blastómeros ou de células da trofoectoderme de blastocistos. É aplicada a embriões de casais com risco de transmissão de doenças ligadas ao sexo ou causadas por alterações num único gene;
- **Transcriptómica** – envolve a análise do mRNA celular, refletindo o fenótipo da célula. O resultado depende da sequência de ADN e também das modificações epigenéticas que definem o seu padrão de expressão na célula. Ainda não existem dados suficientes que permitam distinguir um padrão de expressão génica associado a

embriões de alta ou de baixa qualidade (Ajduk and Zernicka-Goetz, 2013). Esta análise pode ser realizada em glóbulos polares (Reich *et al.*, 2011), ovócitos ou blastocistos (Kakourou *et al.*, 2013).

▪ **Métodos não invasivos:**

○ **Avaliação estática e pontual** – este é o método mais tradicional, sendo que os embriões são classificados segundo os consensos de Istambul (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). Este método tem baixos custos e é de fácil implementação, apesar de ser bastante subjetivo (Ajduk and Zernicka-Goetz, 2013). De modo a maximizar a sua confiança, a escolha do embrião é realizada tendo em conta todos os momentos de avaliação realizados desde o ovócito até ao dia da transferência (Ajduk and Zernicka-Goetz, 2013). Este tipo de avaliação é baseado na informação visual obtida pelo embriologista e, portanto, é sujeita a variações inter e intra-observador (Filho *et al.*, 2010);

○ **Cultura prolongada** – muitos embriões param o seu desenvolvimento nas fases iniciais (Montag *et al.*, 2013). Com este método, apenas os embriões que atinjam a fase de blastocisto poderão ser selecionados para transferir;

○ **Análise da vascularidade do folículo e do líquido folicular** – os resultados obtidos num estudo sobre a vascularidade foram muito heterogéneos, impossibilitando o estabelecimento de um modelo robusto passível de ser aplicado à prática clínica (Mercé *et al.*, 2006). Na análise do líquido folicular, já foram identificados alguns marcadores preditivos de gravidez, mas ainda sem aplicação clínica (Montag *et al.*, 2013);

○ **Expressão de genes nas células do cumulus** – esta análise pode servir como marcador da competência do ovócito e, indiretamente, do subsequente embrião. Esta estratégia ainda não foi clinicamente implementada devido à falta de *kits* de deteção prontos a usar com resultados consistentes e aos seus elevados custos (Montag *et al.*, 2013);

○ **Metabolómica** – este método consiste na avaliação simultânea de vários metabolitos excretados pelo embrião para o meio de cultura, incluindo piruvato, glucose ou aminoácidos (Leese, 2012), ou na presença de grupos funcionais (característicos da maioria das moléculas com atividade metabólica) no meio de cultura (Montag *et al.*, 2013). Tanto o piruvato como a glucose são substratos da produção de energia na fase de pré-compactação (Ajduk and Zernicka-Goetz, 2013). O meio de cultura seria o objeto de análise, em embriões incubados individualmente (Montag *et al.*, 2013). A aplicação da análise dos metabolitos em meio clínico ainda

carece de equipamento adequando que permita a análise de um elevado número de amostras e de uma maior simplicidade de diagnóstico (Montag *et al.*, 2013);

- **Avaliação do consumo de oxigénio** – o oxigénio é um potencial marcador de diferenciação de ovócitos competentes (Tejera *et al.*, 2011) e de embriões capazes de evoluírem até à fase de blastocisto (Tejera *et al.*, 2012). Contudo, esta tecnologia não entrou na rotina dos laboratórios devido ao risco de contaminação cruzada pelo uso do mesmo elétronodo de oxigénio (Montag *et al.*, 2013);

- **Avaliação por sistemas de time-lapse (STL)** – Método não invasivo de obtenção de imagens que permite o desenvolvimento normal dos embriões e o seu contínuo acompanhamento durante todo o seu período de incubação. Fornece uma imagem completa dos parâmetros cinéticos que caracterizam o desenvolvimento embrionário, podendo ser realizada uma análise automática das informações obtidas. De acordo com Machtinger & Racowsky (2013), os requisitos mínimos para a seleção embrionária devem incluir a padronização, a facilidade na avaliação, a objetividade, danos mínimos para os embriões e uma elevada correlação com as taxas de sucesso de gravidez.

ii. Utilização de sistemas de time-lapse em ambiente clínico

A técnica de time-lapse é usada há mais de 40 anos, em investigação em animais (Cole, 1967; Gonzales *et al.*, 1995; Grisart *et al.*, 1994; Massip and Mulnard, 1980) e em humanos (Cruz *et al.*, 2012; Lemmen *et al.*, 2008; Mio and Maeda, 2008; Payne *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 2010). No que diz respeito ao seu uso em humanos, este foi iniciado por Payne *et al.* (1997), que reportaram o desenvolvimento de embriões desde a fertilização até aos seus estados iniciais. O desenvolvimento recente de sistemas não-invasivos de time-lapse apropriados para o uso num laboratório de RHA tem atraído a atenção da comunidade científica para este método de seleção embrionária (Herrero and Meseguer, 2013). É oferecida a oportunidade de realizar múltiplas observações da evolução dos embriões *in vitro*, permitindo a seleção daqueles que terão um maior potencial de desenvolvimento e de implantação. Contudo, a eficácia de um tratamento de RHA não irá pura e simplesmente aumentar, uma vez que outras variáveis estão incluídas nesta equação, como as características intrínsecas dos gametas, a robustez do sistema de cultura (Dal Canto *et al.*, 2012) ou a receptividade uterina (Montag *et al.*, 2013). Todavia, uma vez que o STL permite uma seleção mais precisa dos embriões e uma maior estabilidade das condições de cultura, esta tecnologia poderá ter um impacto positivo nas taxas de sucesso dos ciclos de

tratamento (Dal Canto *et al.*, 2012). Vários artigos também já descreveram a tecnologia de monitorização contínua dos embriões como inofensiva em humanos (Cruz *et al.*, 2011; Kirkegaard *et al.*, 2012a; Nakahara *et al.*, 2010; Pribenszky *et al.*, 2010a), quando comparada com a incubação em sistemas tradicionais.

iii. Implementação de novas tecnologias no laboratório de RHA

É importante assegurar a segurança do STL antes de implementar o seu uso clínico. Para que as imagens sejam capturadas, o time-lapse possui um sistema de luz, que periodicamente irá incidir sobre os embriões (Kirkegaard *et al.*, 2012b). Acredita-se que uma exposição intensiva à luz pode ter um efeito negativo no desenvolvimento embrionário (Takenaka *et al.*, 2007) e que uma luz de comprimento de onda na zona dos ultravioleta ou dos infravermelhos deve ser evitada (Frigault *et al.*, 2009). Se o STL possuir partes que se movam ou que levem à circulação dos embriões, pode ocorrer uma acumulação de calor devido ao movimento e à fricção, o que é problemático, juntamente com *stress* da deslocação das placas de cultura e a presença de lubrificantes ou dos seus gases (Kirkegaard *et al.*, 2012a, 2012b). A presença contínua de campos eletromagnéticos em alguns STL pode afetar o desenvolvimento dos embriões (Beraldi *et al.*, 2003). A estabilidade das condições de cultura é também um fator que pode variar consoante o tipo de *design* do STL utilizado (Kirkegaard *et al.*, 2012b). O único estudo randomizado e que utilizou ovócitos de casais inférteis e não somente de ciclos de doação de ovócitos, de Kirkegaard *et al.* (2012a), demonstrou que o STL pode ser utilizado em embriões humanos com segurança, num ambiente clínico.

De modo a avaliar corretamente a introdução de novas tecnologias no laboratório de RHA, deverão ser realizados estudos em animais e posteriormente em embriões humanos, testando todas as variáveis anteriormente referidas e escolhendo preferencialmente como resultado final a taxa de nados vivos (Herrero and Meseguer, 2013), o grande objetivo da RHA. Estudos controlados e randomizados devem também ser efetuados em crianças nascidas através desse novo procedimento (Harper *et al.*, 2012; Herrero and Meseguer, 2013). Só assim será possível compreender os benefícios e os riscos da introdução dessa nova tecnologia e avaliar a sua relação (Brison *et al.*, 2013).

iv. Sistemas de time-lapse disponíveis

Atualmente existem STL comerciais e “home-made” (Wong *et al.*, 2013), nos quais uma pequena incubadora pode ser incorporada num grande sistema de aquisição de imagens (Mio and Maeda, 2008; Payne *et al.*, 1997), ou o contrário, uma grande incubadora pode conter um pequeno microscópio. Por último existe também um sistema que integra um microscópio e uma incubadora num só equipamento. Independentemente do tipo de sistema utilizado é fundamental que as condições ótimas de cultura não sejam perturbadas (Wong *et al.*, 2013), uma vez que estas são essenciais para o sucesso do desenvolvimento dos embriões e para uma gravidez saudável (Meseguer *et al.*, 2012). Os sistemas comerciais disponíveis encontram-se sumariamente descritos nos parágrafos seguintes.

EmbryoScope®

O EmbryoScope® foi o primeiro STL comercial disponível, desenvolvido pela Fertilitech (Dinamarca). Este consiste numa incubadora que permite a aquisição de imagens em vários planos focais de, no máximo, 72 embriões mantidos em cultura individual (por meio do Embryoslide®), através de uma iluminação LED vermelha. A deteção e focagem dos embriões são realizadas de forma automatizada. Associado a este STL está o *software* EmbryoViewer® que permite a aquisição, revisão, anotação e comparação de imagensⁱ.



Figura 1 - EmbryoScope®ⁱⁱ.



Figura 2 – EmbryoViewer®ⁱⁱⁱ.



Figura 3 – Embryoslide®^{iv}.

ⁱ Informação obtida do site <http://www.fertilitech.com/en-GB/Products/EmbryoScope-reg-Time-Lapse-system.aspx> e do site <http://www.fertilitech.com/en-GB/Products/EmbryoViewer-reg-Software.aspx>, acedidos a 15/08/2014.

ⁱⁱ Imagem obtida do site <http://www.fertilitech.com/en-GB/Products/EmbryoScope-reg-Time-Lapse-system.aspx>, acedido a 15/08/2014.

ⁱⁱⁱ Imagem obtida do site <http://www.fertilitech.com/en-GB/Products/EmbryoViewer-reg-Software.aspx>, acedido a 15/08/2014.

^{iv} Imagem obtida do site de: <http://www.fertilitech.com/en-GB/Products/EmbryoSlide-reg-culture-dish.aspx>, acedido a 31/08/2014.

Primo Vision

O Primo Vision Time-Lapse Embryo Monitoring System é produzido pela Vitrolife (Suécia). Consiste num microscópio invertido, compacto e digital que pode ser colocado dentro de uma incubadora tradicional. Utiliza um sistema de iluminação LED verde. A cultura dos embriões, apesar de ser realizada em grupo, permite rastrear cada embrião ao longo do seu desenvolvimento. As imagens são enviadas para o *software* Capture, Analyze, Report & Present, que permite a sua comparação e análise^v.



Figura 4 – Primo Vision dentro de uma incubadora.



Figura 5 – Primo Vision^{vi}.



Figura 6 – Software Capture, Analyze, Report & Present do Primo Vision^{vii}.

Eeva (Early Embryo Viability Assessment)

Desenvolvido pela Auxogyn (Estados Unidos da América), este sistema consiste num pequeno microscópio que pode ser inserido numa incubadora tradicional, sendo adquiridas imagens do desenvolvimento dos embriões em cultura. Essas imagens são depois analisadas por um *software* inteligente, de acordo com os intervalos de tempo

^v Informação obtida do site <http://www.vitrolife.com/en/Fertility/Products/Primo-Vision-Time-Lapse-System/Primo-Vision-EVO/> e do site <http://www.vitrolife.com/en/Fertility/Products/Primo-Vision-Time-Lapse-System/>, acedidos a 15/08/2014.

^{vi} Figura 5 e Figura 4 obtidas do site <http://www.vitrolife.com/en/Fertility/Products/Primo-Vision-Time-Lapse-System/Primo-Vision-EVO/>, acedido a 15/08/2014.

^{vii} Imagem obtida do site <http://www.vitrolife.com/en/Fertility/Products/Primo-Vision-Time-Lapse-System/Primo-Vision-Analyzer-Software/>, acedido a 15/08/2014.

de cada divisão celular. Os embriões são incubados numa placa concebida para este sistema. O Eeva permite uma avaliação automática dos embriões, prevendo, ao terceiro dia, o seu desenvolvimento até à fase de blastocisto^{viii}.

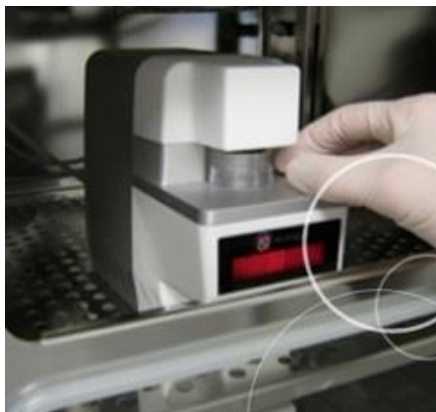


Figura 7 – Sistema Eeva dentro de uma incubadora tradicional^{ix}.

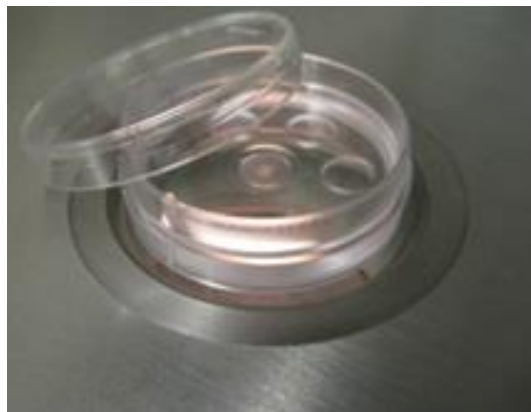


Figura 8 – Placa de cultura Eeva.

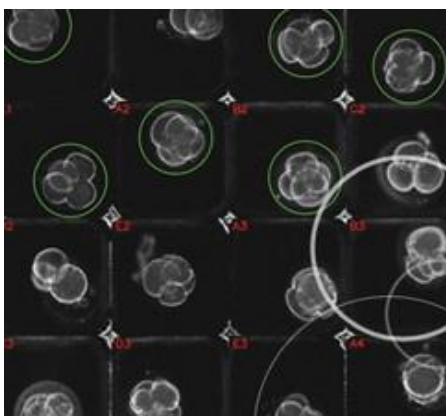


Figura 9 – Software de análise das imagens obtidas do desenvolvimento embrionário^x.

v. Time-lapse vs avaliação estática

O método convencional de avaliação embrionária consiste na análise morfológica dos embriões em intervalos de tempo pré-definidos (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011), com o objetivo de observar as características que poderão ser preditivas do seu potencial de desenvolvimento e de implantação (Aguilar *et al.*, 2014). Contudo, entre esses intervalos de tempo, muita informação que poderia facilitar a tomada de decisão no

^{viii} Informação obtida do site <http://www.eevaivf.com/>, acedido a 31/08/2014.

^{ix} Figura 7 e Figura 8 obtidas do site <http://www.eevaivf.com/benefits-of-eeva/meet-eeva/>, acedido a 31/08/2014.

^x Imagem obtida do site <http://www.eevaivf.com/benefits-of-eeva/the-science-and-clinical-success/>, acedido a 31/08/2014.

momento da transferência é perdida (Aguilar *et al.*, 2014), uma vez que a evolução de ovócito após o momento da inseminação até ao estado de blastocisto é extremamente dinâmica, podendo ser influenciada por diversos fatores (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011; Montag *et al.*, 2011). Portanto, apesar de haver um consenso relativamente aos intervalos de tempo nos quais deve ser realizada a avaliação morfológica convencional (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011), basta uma avaliação um pouco mais cedo ou mais tarde para que seja consideravelmente diferente. Num exemplo claro, Aguilar *et al.* (2014) demonstraram que o valor preditivo do Z-score é limitativo, uma vez que a aparência e distribuição dos pronúcleos estão em constante desenvolvimento, ou seja, a avaliação de um mesmo embrião, tendo em conta o Z-score, poderá ser diferente de acordo com o momento em que os pronúcleos são visualizados.

A preferência esmagadora pela avaliação estática e morfológica dos embriões pode ser explicada pela sua simplicidade, relação custo/eficácia e pela escassez de alternativas superiores (Kirkegaard *et al.*, 2012b). A grande desvantagem deste método é avaliar um processo dinâmico através de algumas visualizações em certos momentos (normalmente uma vez por dia). Tal poderia ser ultrapassado por observações mais frequentes, mas implicava a exposição dos embriões a alterações indesejáveis do ambiente de cultura (Cruz *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2010).

Devido a estas limitações referidas, espera-se que métodos de seleção embrionária melhorados aumentem significativamente as taxas de gravidez dos ciclos de RHA (Kirkegaard *et al.*, 2013). O recente desenvolvimento de STL para uso clínico tem permitido a monitorização dos embriões de forma contínua e segura e a obtenção de um leque de informações muito superior sobre a sua evolução dinâmica, podendo levar à redefinição dos critérios de avaliação morfológica (Kirkegaard *et al.*, 2012b). Uma das grandes vantagens do STL será excluir embriões morfolologicamente classificados como normais, de acordo com a avaliação estática, mas que revelaram padrões aberrantes de divisão através da sua monitorização contínua (Kirkegaard *et al.*, 2012b). A aquisição de imagens por time-lapse minimiza as possíveis perturbações no ambiente de cultura, pois integra a incubação e aquisição de imagens num único sistema (Nakahara *et al.*, 2010). As imagens são posteriormente convertidas num pequeno filme, facilitando a análise dos dados obtidos (Cruz *et al.*, 2011).

Time-lapse	Avaliação morfológica estática
Cultura direta sobre a câmara e aquisição de imagens a intervalos de tempo definidos pelo embriologista. Posterior processamento de imagens num vídeo, permitindo a aquisição de dados morfológicos, dinâmicos e quantitativos	Aquisição de imagens em momentos específicos, normalmente uma vez por dia. A escolha desses tempos depende, por vezes, mais da conveniência para o embriologista do que da sua relevância biológica
As condições de cultura mantêm-se ótimas desde a inseminação até ao dia da transferência e menor manuseamento dos embriões e das suas placas de cultura, reduzindo o risco de trocas ou contaminação (Meseguer <i>et al.</i> , 2012)	É necessário retirar os embriões da incubadora diariamente, ocorrendo alterações de luz, temperatura e atmosfera
Possibilidade de integrar o sistema com um <i>software</i> de análise de imagens. Este permite o alinhamento ótico, a focagem, a captura e armazenamento de imagens	Mais económica, uma vez que não implica a aquisição de meios adicionais para realizar a avaliação
Obtenção de um elevado número de dados sobre o desenvolvimento embrionário	Pouca informação obtida sobre um evento dinâmico e complexo (Freour <i>et al.</i> , 2012)
Diminuição da variabilidade intra e interindividual (Kaser and Racowsky, 2014)	Elevada variação intra e interobservador (Filho <i>et al.</i> , 2010)
Permite a exclusão de embriões morfolologicamente normais, mas com algum tipo de anomalia, como por exemplo blastómeros multinucleados ou embriões com padrões anormais de divisão, que não seriam perceptíveis através da avaliação estática	Embriões morfolologicamente normais, nos momentos de avaliação, são considerados para transferência

Tabela 1 – Comparação entre o STL e a avaliação morfológica estática. Adaptado de Wong *et al.* (2013).

O STL fornece um método não invasivo de seleção embrionária que poderá aumentar a precisão e a sensibilidade da informação obtida sobre o desenvolvimento dos embriões em cultura (Herrero and Meseguer, 2013).

vi. Desafios dos sistemas de time-lapse

Por ser um sistema mecânico e ótico, existem alguns aspetos que carecem de otimização. Um STL apresenta alguns desafios técnicos que precisarão de aperfeiçoamento, entre os quais (Wong *et al.*, 2013):

- **Manutenção dos embriões no campo de visão da lente do microscópio** – os embriões são entidades celulares não aderentes, ou seja, podem movimentar-se devido ao seu manuseamento ou à deslocação das placas de cultura. Essas oscilações podem ocorrer durante a mudança do meio de cultura ou no caso do STL possuir um sistema mecânico que movimenta a placa dos embriões até ao foco de luz para obtenção das imagens. Este problema pode ser ultrapassado com a cultura individual dos embriões ou um sistema de cultura em grupo, mas cuja placa possua

pequenos poços que impeçam a deslocação dos embriões (Pribenszky *et al.*, 2010a) (evita a necessidade de movimentação das placas, pois as imagens de cada embrião são obtidas num único campo ótico de visão (Wong *et al.*, 2013), e permite que os embriões continuem a sua partilha de sinais parácrinos (O'Neill, 1998));

- **Posição e transparência dos embriões** - os STL não permitem rodar os embriões, fazendo com que a sua análise visual seja complicada, sobretudo quando existem blastómeros sobrepostos ou quando os embriões possuem elevada percentagem de fragmentação (Herrero and Meseguer, 2013);

- **Potencial efeito fototóxico nos embriões consequente da exposição frequente à luz** – é conhecido que a luz ultravioleta pode provocar danos no ADN e que os raios infravermelhos podem induzir calor localizado (Frigault *et al.*, 2009). A luz visível é menos prejudicial que a luz de alta energia (como é o caso da luz ultravioleta) e, consequentemente, os STL podem vir incorporados com sistemas de luz visível, incluindo técnicas de microscopia de campo claro e de campo escuro. O tempo de exposição dos embriões à luz pode ser controlado pela duração da aquisição de imagens pelo STL;

- **Tempo ideal para a captura de imagens** – a maioria dos estudos releva que as imagens são adquiridas em intervalos de 15 ou 20 minutos. No entanto, segundo Wong *et al.* (2010), a primeira citocinese ocorre, em média, durante 15 minutos em embriões com um desenvolvimento normal. Portanto, é necessário avaliar qual o intervalo de tempo mais adequado de modo a não ser perdida informação essencial. Por existir um número significativo de variáveis num STL, Herrero & Meseguer (2013) defendem que devem ser estabelecidas diretrizes no que diz respeito às características ótimas de aquisição de imagens no STL, como o comprimento de onda da luz utilizada, o tempo de duração da iluminação e a frequência de obtenção das imagens.

Variáveis que podem afetar a avaliação através do STL

As diferentes condições de cultura que poderão ser utilizadas podem influenciar a duração dos ciclos celulares e do desenvolvimento embrionário. Num estudo realizado por Wale & Gardner (2010) com embriões de ratinhos, a percentagem de oxigénio à qual os embriões foram incubados influenciou a duração das primeiras divisões celulares. Os meios de cultura utilizados são também uma variável que pode afetar o desenvolvimento embrionário (Sifer *et al.*, 2009). Além destes, o tipo de método utilizado para inseminar os ovócitos (FIV ou ICSI) poderá influir alterações na primeira divisão celular (Giorgetti *et al.*, 2007; Lundin *et al.*, 2001).

vii. Avaliação automática dos embriões através do sistema de time-lapse

A análise dos dados recolhidos sobre os embriões em cultura pode ser realizada de forma automática, sem a intervenção do embriologista. Desta forma moderniza-se e melhora-se os procedimentos de RHA, reduz-se custos e aumenta-se a capacidade dos embriologistas para identificarem o embrião com maior potencial de desenvolvimento num recém-nascido saudável. Assim é possível eliminar a subjetividade inerente ao processo de seleção embrionária tradicional (Filho *et al.*, 2010), podendo levar a melhores taxas de sucesso. Contudo, este tipo de avaliação enfrenta os desafios da microscopia automática, tais como (Filho *et al.*, 2010):

- Qualidade da imagem do microscópio;
- Diferenças na morfologia dos embriões em diferentes estádios de desenvolvimento;
- Necessidade de focagem do embrião devido à sua natureza tridimensional;
- Quantidade de dados a analisar.

Portanto, o desenvolvimento de algoritmos para a análise automática dos embriões torna-se uma tarefa bastante complicada (Filho *et al.*, 2010). Contudo, alguns estudos com métodos automáticos de análise embrionária têm sido desenvolvidos, com resultados promissores (Conaghan *et al.*, 2013).

viii. Benefícios do uso do sistema de time-lapse

Num estudo, Wong *et al.* (2010) demonstraram que dois embriões morfologicamente iguais, quando observados pelo método estático, resultaram de processos de desenvolvimento completamente diferentes, após a sua observação pelo STL. Portanto, Wong *et al.* (2013) referenciam que eventos como divisões anormais e fragmentação, que podem ocorrer entre os intervalos de tempo definidos para avaliar os embriões tradicionalmente, são muito difíceis de ser capturados durante esse tipo de classificação. Daí a necessidade e importância do uso do STL para uma contínua monitorização embrionária. Deste modo também será possível a obtenção de dados dinâmicos sobre os embriões, como a formação e a fusão do pronúcleo, o tempo exato entre cada divisão celular e a duração da citocinese (Conaghan *et al.*, 2013; Hlinka *et al.*, 2012; Lemmen *et al.*, 2008; Meseguer *et al.*, 2012).

A multinucleação de blastómeros, que pode ocorrer ao longo de todo o desenvolvimento embrionário (especialmente no estado de 2 células), é um evento extremamente dinâmico (Ergin *et al.*, 2014) e encontra-se associado a baixas taxas de evolução embrionária e de gravidez (Yakin *et al.*, 2005). Através da avaliação estática e pontual, a multinucleação só pode ser detetada em momentos específicos, mas devido à sua natureza dinâmica (a multinucleação pode desaparecer num curto espaço de tempo) pode passar completamente despercebida (Ergin *et al.*, 2014). O STL veio contribuir para a deteção da multinucleação em qualquer altura, como evidenciado por Ergin *et al.* (2014).

Os estudos científicos sobre os STL levam a aumentar o nosso conhecimento do desenvolvimento inicial do embrião e sugerem que esta é uma ferramenta ideal para a investigação do desenvolvimento embrionário inicial (Wong *et al.*, 2013).

ix. A era da morfocinética

Anteriormente ao entusiasmo crescente pelo STL, a cinética da divisão embrionária era analisada, tendo em conta a divisão precoce dos embriões em cultura (Sakkas *et al.*, 1998). O uso do STL fornece dados sobre a cinética do desenvolvimento embrionário, permitindo a determinação precisa do início, duração e intervalo entre as divisões celulares (Meseguer *et al.*, 2012). Assim, características morfológicas e dinâmicas como a formação e desaparecimento dos pronúcleos e dos núcleos, a fragmentação e o tamanho dos blastómeros podem ser quantificados (Meseguer *et al.*, 2012). Desta forma, os parâmetros morfocinéticos podem ser definidos como avaliações quantitativas de momentos do desenvolvimento embrionário (Meseguer *et al.*, 2012).

Marcadores putativos de viabilidade embrionária têm surgido com base em estudos retrospectivos utilizando STL, tanto em animais como em humanos. Esses marcadores surgem de padrões de intervalos de tempo entre as primeiras divisões celulares que sejam característicos de embriões com elevado potencial de desenvolvimento (Aguilar *et al.*, 2014; Chamayou *et al.*, 2013; Cruz *et al.*, 2012; Dal Canto *et al.*, 2012; Hlinka *et al.*, 2012; Kirkegaard *et al.*, 2013; Lemmen *et al.*, 2008; Meseguer *et al.*, 2012; Pribenszky *et al.*, 2010b; Rubio *et al.*, 2012; Wong *et al.*, 2010). Têm surgido recentemente promissores, preditivos e não invasivos marcadores da qualidade embrionária, tais como (Wong *et al.*, 2013):

- Tempo entre a fertilização e o aparecimento dos PN;
- Aparição dos núcleos de cada blastómero após a primeira divisão;

- Duração da primeira citocinese;
- Intervalo de tempo entre a primeira e a segunda mitose;
- Sincronização entre a segunda e a terceira mitose;
- Tempo decorrido até atingir o estado de 5 células.

Todos estes eventos acontecem, normalmente, até ao terceiro dia de desenvolvimento, sugerindo que o potencial de desenvolvimento de um embrião já se encontra pré-determinado (Wong *et al.*, 2013). Assim, um bom marcador seria capaz de maximizar as taxas de sucessos dos tratamentos de RHA, minimizar a probabilidade de ocorrerem gravidezes múltiplas e de permitir a transferência embrionária numa fase anterior a blastocisto (evitando-se a cultura prolongada), sem sacrificar as taxas de sucesso (Wong *et al.*, 2013).

Para identificar os embriões com maior potencial de originarem uma gravidez, dois algoritmos para seleção de embriões tendo em conta parâmetros morfocinéticos foram propostos por duas equipas diferentes. Wong *et al.* (2010) identificaram marcadores preditivos do desenvolvimento de blastocistos através da análise de imagens obtidas por um STL e relacionaram-nos com o perfil de expressão génica. Nenhum dos embriões estudados foi transferido, portanto não foram obtidos dados relacionados com o potencial de implantação. Já Meseguer *et al.* (2011) sugeriram um algoritmo preditivo e hierárquico que combina a avaliação de parâmetros dinâmicos com critérios de exclusão morfológicos, tendo como resultado a taxa de implantação embrionária. Uma limitação do uso de algoritmos é o facto de estes usarem quartis, criando limites bastante exatos, que podem não ser uma simulação correta do desenvolvimento embrionário (Herrero and Meseguer, 2013). Tendo em conta que o embrião é influenciado somente pelo genoma materno até ao 3º dia, é também questionável a representatividade dos marcadores morfocinéticos para fases posteriores à ativação do genoma embrionário (Herrero and Meseguer, 2013).

Foram já identificadas associações entre eventos morfocinéticos das fases iniciais dos embriões e a sua viabilidade e potencial de implantação, sugerindo que os marcadores morfocinéticos preditivos podem melhorar a seleção dos embriões a transferir (Chen *et al.*, 2013; Herrero and Meseguer, 2013). É importante salientar que durante a pesquisa por novos marcadores de viabilidade embrionária, a escolha do resultado final do estudo pode influenciar a validade do marcador. Isto é, a avaliação da formação de blastocisto não é equivalente à análise do potencial de implantação (Kirkegaard *et al.*, 2012b). É também necessário ter em conta que os marcadores não são 100% preditivos do sucesso de implantação embrionária, uma vez que outros parâmetros poderão influenciar esse processo, como a recetividade uterina (Herrero and Meseguer, 2013; Meseguer *et al.*, 2011). O objetivo final de um estudo científico

deverá ser a taxa de nados vivos, uma vez que essa é a meta que todas as equipas de um laboratório de RHA procuram atingir (Herrero and Meseguer, 2013).

Existem alguns fatores que podem alterar o resultado dos parâmetros morfocinéticos (Lechniak *et al.*, 2008), tais como:

- **Condições de cultura** – podem afetar o metabolismo embrionário;
- **Fatores intrínsecos dos ovócitos ou do espermatozoide** – em causa pode estar a maturidade do citoplasma ou o efeito paterno na duração da fase S do ciclo celular;
- **Anomalias cromossómicas** – podem atrasar a replicação do ADN.

x. Breve revisão bibliográfica

Através de uma breve pesquisa bibliográfica na Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), analisei 17 estudos nos quais foram utilizados STL. Oito estudos ajustaram o STL para que a aquisição de imagens ocorresse a cada 20 minutos, 3 ensaios optaram pela obtenção de imagens de 15 em 15 minutos e uma equipa de investigadores apenas indicou que as imagens foram captadas a cada 15 ou 20 minutos, não sendo verdadeiramente específica.

É também perceptível uma clara preferência pelo STL EmbryoScope® (12 estudos utilizaram este equipamento), talvez devido a este ter sido o primeiro disponível para uso clínico a nível comercial ou à grande publicidade que teve junto dos especialistas. As grandes diferenças deste em relação ao sistema Primo Vision (apenas um estudo usou este equipamento) é que permitem uma cultura individual dos embriões e utiliza um sistema integrado de incubação e monitorização embrionárias. Cabe a cada equipa em cada centro de RHA escolher a opção que melhor se adapta ao seu dia-a-dia e às suas preferências.

Com a exceção de Kirkegaard, Hindkjaer, Grøndahl, *et al.* (2012), Azzarello *et al.* (2012), Cruz *et al.* (2011), Wong *et al.* (2010) e Nakahara *et al.* (2010), todos os outros estudos foram realizados retrospectivamente, ou seja, as conclusões só são retiradas após ter ocorrido a experiência em si. Apesar de esses não serem os estudos com maior credibilidade, é a forma de iniciar a investigação de um determinado tema, neste caso, a procura de marcadores de seleção embrionária. Só depois de descobertos é que podem ser validados através de estudos prospetivos e randomizados.

De todos os estudos apresentados na tabela 2, uma diversidade de parâmetros foi avaliada, não sendo fácil a retirada de conclusões. No entanto, é perceptível que parâmetros relacionados com taxas de divisão celular são os mais utilizados e com

melhores resultados em relação à predição da boa qualidade embrionária (Chamayou *et al.*, 2013; Cruz *et al.*, 2012; Dal Canto *et al.*, 2012; Hlinka *et al.*, 2012; Lemmen *et al.*, 2008; Meseguer *et al.*, 2011, 2012; Montag *et al.*, 2013; Rubio *et al.*, 2012; Wong *et al.*, 2010). Quanto aos resultados escolhidos pelos autores para as suas investigações, apenas uma equipa (Azzarello *et al.*, 2012) utilizou a taxa de nados vivos. Algumas investigações (Chamayou *et al.*, 2013; Dal Canto *et al.*, 2012; Hlinka *et al.*, 2012; Meseguer *et al.*, 2011) tiveram como resultado final a taxa de implantação, o que não é por si só preditivo de uma gravidez evolutiva e do nascimento de um recém-nascido saudável.

É notável que a implementação de STL levou a um maior e mais profundo conhecimento da cinética dos embriões, o que poderá levar a comunidade científica a adotar novas estratégias que melhorem a qualidade dos serviços oferecidos na RHA. Os marcadores morfocinéticos apresentam-se como promissores no que diz respeito à predição da evolução dos embriões *in vitro* e a uma gravidez evolutiva. Contudo, mais estudos clínicos prospetivos e randomizados devem ser realizados para que seja possível uma melhor perceção do verdadeiro valor preditivo dos biomarcadores, da sua confiança e robustez para utilização em ambiente clínico.

Artigo	Amostra utilizada	Aquisição de imagens	Tipo de STL	Eventos Avaliados	Principais resultados	Conclusões
Payne <i>et al.</i> (1997)	50 embriões de ICSI	Em intervalos de 1 min	Microscópio com atmosfera controlada	Tempo desde a ICSI até à extrusão do 2º GP Sincronia na formação dos PN Tempo desde a ICSI até ao encontro dos PN Frequência das “ondas citoplasmáticas”	Qualidade dos embriões ao 3º dia	Embriões de boa qualidade evoluíram de ovócitos com um tempo mais uniforme desde a ICSI até ao encontro dos PN e com tendência para ter uma “onda citoplasmática” mais longa. O STL é uma ferramenta poderosa para monitorizar o desenvolvimento embrionário
Lemmen <i>et al.</i> (2008)	102 embriões de FIV ou ICSI	A cada 5 min	Microscópio com câmara integrada numa incubadora	Desaparecimento dos PN 1ª divisão Aparecimento dos núcleos nos 2 blastómeros 2ª divisão dos 2 blastómeros Aparecimento dos núcleos dos 4 blastómeros	Taxa de gravidez	O desaparecimento precoce dos PN e o início da 1ª divisão celular foram relacionados com um maior número de blastómeros ao 2º dia. Sincronia do aparecimento dos núcleos após a 1ª divisão celular foi associada com maiores taxas de gravidez
Nakahara <i>et al.</i> (2010)	292 embriões de ICSI, igualmente distribuídos	A cada 15 min	Incubadora com microscópio integrado Incubadora tradicional	Número de ovócitos fertilizados Taxa de divisão celular Número de embriões de qualidade	Taxa de gravidez clínica	O uso do time-lapse é seguro
Wong <i>et al.</i> (2010)	242 ovócitos de FIV criopreservados em fase de pronúcleo	A cada 5 min	Diferentes sistemas utilizados, sem diferenças significativas nos resultados	Duração da 1ª citocinese Tempo entre o fim da 1ª mitose e o início da 2ª Tempo entre a 2ª e 3ª mitose Perfis de expressão génica	Formação de blastocistos	Os 3 parâmetros morfocinéticos podem ser preditivos da evolução dos embriões
Cruz <i>et al.</i> (2011)	478 embriões de FIV e ICSI com doação de ovócitos, igualmente distribuídos	A cada 20 min 7 planos focais diferentes	EmbryoScope Incubadora tradicional	Qualidade e viabilidade embrionárias Formação de blastocistos	Taxa de formação e viabilidade de blastocistos Taxa de	O uso de time-lapse não compromete o desenvolvimento embrionário nem a taxa de gravidez evolutiva

						gravidez evolutiva	
Meseguer <i>et al.</i> (2011)	247 embriões transferidos após ICSI	A cada 15 min 5 planos focais diferentes	EmbryoScope	Avaliação morfológica Tempos exatos da 1ª, 2ª, 3ª e 4ª divisões celulares Duração do 2º ciclo celular Duração do estágio de 3 células	Taxa de implantação	Proposta de um modelo multivariável de classificação embrionária, que inclui avaliação morfológica, critérios de exclusão e parâmetros morfocinéticos	
Montag <i>et al.</i> (2011)	65 ovócitos fertilizados pela técnica de ICSI	A cada 20 min 7 planos focais diferentes	EmbryoScope	Morfologia dos PN Divisão precoce Morfologia embrionária até ao 3º dia	Morfologia dos PN Divisão precoce Morfologia embrionária	A avaliação de embriões nos seus estados iniciais tem limitações, quando realizada através de forma estática e pontual	
Azzarello <i>et al.</i> (2012)	159 embriões de ICSI	A cada 20 min 7 planos focais diferentes	EmbryoScope	Tempo desde ICSI até ao da desaparecimento membrana dos PN Morfologia dos PN	Taxas de nados vivos	O desaparecimento da membrana dos PN ocorreu mais tarde em embriões que resultaram em nados vivos. Contudo o desenvolvimento dos PN não é preditivo da qualidade do zigoto	
Cruz <i>et al.</i> (2012)	834 embriões de ciclos de ICSI com doação de ovócitos	A cada 20 min 7 planos focais diferentes	EmbryoScope	Desaparecimento dos PN Divisão em 2 blastómeros Divisão em 3 blastómeros Divisão em 4 blastómeros Divisão em 5 blastómeros Formação de mórula	Formação e qualidade de blastocistos	A cinética dos estados iniciais de desenvolvimento dos embriões está relacionada com o seu potencial de evolução até à fase de blastocisto	
Dal Canto <i>et al.</i> (2012)	459 embriões de FIV e ICSI	A cada 20 min 7 planos focais diferentes	EmbryoScope	Divisão em 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 blastómeros Tempo desde 2 blastómeros até dividir em 3; 3 até 4; 2 até 4; 4 até 8; 5 até 8	Formação de blastocistos Taxa de implantação	As divisões desde 2 células até 8 ocorreram progressivamente mais cedo em embriões que evoluíram até à fase de blastocistos, expandiram e implantaram. A observação estática e pontual ao 2º e 3º dia é apropriada para uma correta avaliação embrionária	
Hlinka <i>et al.</i> (2012)	180 embriões de ICSI	A cada 10 min	Primo Vision	Duração das interfases e dos períodos de mitose desde o	Formação de blastocistos	A taxa de divisão dos embriões é uma forma efetiva de identificação	

					estádio de 2 blastómeros até 16	Taxa de implantação	precocidade de embriões viáveis. Embriões com boa morfologia, mas não viáveis podem ser excluídos através da análise destes parâmetros
Kirkegaard, Hindkjaer, Grøndahl, et al. (2012)	600 embriões de FIV e ICSI, igualmente distribuídos	-		EmbryoScope Incubadora tradicional	Proporção de embriões com 4 células ao 2º dia Proporção de embriões com 7-8 células ao 3º dia Proporção de blastocistos ao 5º dia	Taxa de implantação Taxa de gravidez clínica	O STL pode ser aplicado com segurança
Meseguer et al. (2012)	1390 ciclos cujos embriões foram incubados no EmbryoScope 5915 ciclos cujos embriões foram mantidos em cultura na incubadora tradicional	A cada 15 min 5 planos focais diferentes		EmbryoScope Incubadora tradicional	Embriões na IT: Morfologia 48 e 72 h após ICSI Formação de blastocistos Para embriões no EmbryoScope: Divisão em 2, 3, 4 e 5 blastómeros Duração do estágio de 2 células Sincronia das divisões de 2 para 4 células	Taxa de implantação Taxa de gravidez clínica	O uso de time-lapse pode melhorar a taxa de gravidez até uma estimativa de 20%
Rubio et al. (2012)	5225 embriões de FIV e ICSI	A cada 15 ou 20 min 5 ou 7 planos diferentes		EmbryoScope	Avaliação morfológica convencional Divisão de 1 para 2 células; 2 para 3; 3 para 4 Duração do 2º ciclo celular	Taxa de implantação Taxa de gravidez clínica	Embriões com divisão direta de 2 para 3 células tiveram uma taxa de implantação significativamente mais baixa quando comparada com a de embriões com um padrão de divisão normal
Chamayou et al. (2013)	244 embriões de ICSI	A cada 20 min 7 planos focais diferentes		EmbryoScope	Presença dos 2 PN Último momento em que são visíveis os 2 PN Estádio de 1 célula e seguintes até 9 células Início da compactação Estádio de mórula	Formação de blastocistos Taxa de implantação	Os parâmetros morfocinéticos são úteis para realizar decisões apropriadas a cada caso, uma vez que preveem o seu desenvolvimento

					Estádio de blastocisto expandido		
Kirkegaard <i>et al.</i> (2013)	571 embriões de ICSI	A cada 20 min 7 planos focais diferentes	EmbryoScope		Morfologia convencional ao 2º, 3º e 6º dia Aparecimento do 1º PN Encontro dos PN Desaparecimento dos PN 1ª citocinese 1ª divisão Aparição dos núcleos após a 1ª divisão Presença de multinucleação no estágio de 2 células Divisão em 3, 4, 5, 6, 7 e 8 células Estádio de mórula Estádio de blastocisto inicial, expandido e eclodido	Formação de blastocistos Taxa de implantação Taxa de gravidez clínica	O desenvolvimento de blastocistos de elevada qualidade pode ser previsto nas primeiras 48h de cultura. No entanto, os parâmetros morfocinéticos avaliados através do time-lapse não são preditivos de gravidez
Aguilar <i>et al.</i> (2014)	1448 embriões de ICSI com doação de ovócitos	A cada 20 min 7 planos focais diferentes	EmbryoScope		Morfologia convencional ao 2º e 3º dia Avaliação dos PN (momento da extrusão do segundo GP, da aparição do PN, da singamia dos PN; movimento do PN no citoplasma; avaliação dos PN; simetria dos PN; momento do desaparecimento dos PN) Duração da fase S e do 1º ciclo celular	Taxa de implantação Taxa de gravidez clínica	Apenas 3 parâmetros morfocinéticos (extrusão do 2ª GP; desaparecimento dos PN; duração da fase S) foram relacionados com a ocorrência de implantação

Tabela 2 – Comparação das características de estudos que analisaram o desenvolvimento de embriões humanos através STL. Apenas estudos que procuravam padrões de desenvolvimento relacionados com melhores taxas de sucesso foram incluídos.

xi. Perspetivas futuras

Segundo a experiência de Freour *et al.* (2012) (que utilizaram o sistema EmbryoScope®), é relativamente acessível e rápida a adaptação ao novo STL. Estes autores apoiam também que a sua inclusão na rotina do laboratório traz inúmeras vantagens, tais como uma melhor seleção embrionária, educação e treino contínuos, controlo de qualidade e flexibilidade, levando assim a taxas de sucesso melhoradas.

Com os eventos adicionais observados através do time-lapse, comparativamente com a avaliação estática, surge a necessidade de elaborar um novo sistema de avaliação que reflita a qualidade embrionária como é agora anotada (Chamayou *et al.*, 2013). Segundo Chen *et al.* (2013) existem 3 critérios essenciais para a aplicação clínica de marcadores morfocinéticos. O primeiro diz respeito à correlação entre os marcadores e os seus resultados, que deve ser estatisticamente significativa, reprodutível e suportada por estudos científicos bem arquitetados. Em segundo lugar, o biomarcador e a sua identificação devem ser validados tendo em conta a segurança, eficácia e utilidade prática por estudos clínicos prospetivos, randomizados e controlados. Por último, o marcador deve ser quantificável recorrendo a tecnologia fidedigna e compatível com o normal ambiente de trabalho de um laboratório.

Será também importante padronizar a nomenclatura utilizada para os parâmetros morfocinéticos avaliados durante os estudos de time-lapse, de modo a ser possível uma comparação correta dos diferentes artigos publicados. Frequentemente são confundidas definições como divisão e ciclo de divisão (Kirkegaard *et al.*, 2012b). Os mesmos autores acham também necessário o estabelecimento de um evento inicial para as subseqüentes avaliações, que é comumente o momento da fertilização dos ovócitos. No entanto, este momento é difícil de identificar em ciclos de FIV, ao contrário de ovócitos procedentes da técnica de ICSI. Kirkegaard, Agerholm, *et al.* (2012) propuseram um conjunto de definições para vários parâmetros avaliados através do time-lapse, o que é um ponto de partida para um consenso neste tema.

Referências bibliográficas

Aguilar, J., Motato, Y., Escribá, M.J., Ojeda, M., Muñoz, E., and Meseguer, M. (2014). The human first cell cycle: impact on implantation. *Reprod. Biomed. Online* 28, 475–484.

Ajduk, A., and Zernicka-Goetz, M. (2013). Quality control of embryo development. *Mol. Aspects Med.* 34, 903–918.

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. *Hum. Reprod.* 26, 1270–1283.

Azzarello, A., Hoest, T., and Mikkelsen, A.L. (2012). The impact of pronuclei morphology and dynamicity on live birth outcome after time-lapse culture. *Hum. Reprod.* 27, 2649–2657.

Beraldi, R., Sciamanna, I., Mangiacasale, R., Lorenzini, R., and Spadafora, C. (2003). Mouse early embryos obtained by natural breeding or in vitro fertilization display a differential sensitivity to extremely low-frequency electromagnetic fields. *Mutat. Res.* 538, 163–170.

Brison, D.R., Roberts, S.A., and Kimber, S.J. (2013). How should we assess the safety of IVF technologies? *Reprod. Biomed. Online* 27, 710–721.

Chamayou, S., Patrizio, P., Storaci, G., Tomaselli, V., Alecci, C., Ragolia, C., Crescenzo, C., and Guglielmino, A. (2013). The use of morphokinetic parameters to select all embryos with full capacity to implant. *J. Assist. Reprod. Genet.* 30, 703–710.

Chen, A.A., Tan, L., Suraj, V., Pera, R.R., and Shen, S. (2013). Biomarkers identified with time-lapse imaging: discovery, validation, and practical application. *Fertil. Steril.* 99, 1035–1043.

Cole, R.J. (1967). Cinemicrographic observations on the trophoblast and zona pellucida of the mouse blastocyst. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 17, 481–490.

Conaghan, J., Chen, A.A., Willman, S.P., Ivani, K., Chenette, P.E., Boostanfar, R., Baker, V.L., Adamson, G.D., Abusief, M.E., Gvakharia, M., et al. (2013). Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial. *Fertil. Steril.* 100, 412–19.e5.

Cruz, M., Gadea, B., Garrido, N., Pedersen, K.S., Martínez, M., Pérez-Cano, I., Muñoz, M., and Meseguer, M. (2011). Embryo quality, blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients whose embryos were monitored by time-lapse imaging. *J. Assist. Reprod. Genet.* 28, 569–573.

Cruz, M., Garrido, N., Herrero, J., Pérez-Cano, I., Muñoz, M., and Meseguer, M. (2012). Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reprod. Biomed. Online* 25, 371–381.

Dal Canto, M., Coticchio, G., Renzini, M.M., De Ponti, E., Novara, P.V., Brambillasca, F., Comi, R., and Fadini, R. (2012). Cleavage kinetics analysis of human embryos predicts development to blastocyst and implantation. *Reprod. Biomed. Online* 25, 474–480.

Ergin, E.G., Calışkan, E., Yalçinkaya, E., Öztel, Z., Cökelez, K., Özay, A., and Özörnek, H.M. (2014). Frequency of embryo multinucleation detected by time-lapse system and its impact on pregnancy outcome. *Fertil. Steril.* 1–6.

Filho, E.S., Noble, J.A., and Wells, D. (2010). A review on automatic analysis of human embryo microscope images. *Open Biomed. Eng. J.* 4, 170–177.

Freour, T., Lammers, J., Splingart, C., Jean, M., and Barriere, P. (2012). Time lapse (Embryoscope®) as a routine technique in the IVF laboratory: a useful tool for better embryo selection? *Gynécologie Obs. Fertil.* 40, 476–480.

Frigault, M.M., Lacoste, J., Swift, J.L., and Brown, C.M. (2009). Live-cell microscopy - tips and tools. *J. Cell Sci.* 122, 753–767.

Giorgetti, C., Hans, E., Terriou, P., Salzmann, J., Barry, B., Chabert-Orsini, V., Chinchole, J.M., Franquebalme, J.P., Glowaczower, E., Sitri, M.-C., et al. (2007). Early cleavage: an additional predictor of high implantation rate following elective single embryo transfer. *Reprod. Biomed. Online* 14, 85–91.

Gonzales, D.S., Pinheiro, J.C., and Bavister, B.D. (1995). Prediction of the developmental potential of hamster embryos in vitro by precise timing of the third cell cycle. *J. Reprod. Fertil.* 105, 1–8.

Grisart, B., Massip, A., and Dessy, F. (1994). Cinematographic analysis of bovine embryo development in serum-free oviduct-conditioned medium. *J. Reprod. Fertil.* 101, 257–264.

Harper, J., Magli, M.C., Lundin, K., Barratt, C.L.R., and Brison, D. (2012). When and how should new technology be introduced into the IVF laboratory? *Hum. Reprod.* 27, 303–313.

Herrero, J., and Meseguer, M. (2013). Selection of high potential embryos using time-lapse imaging: the era of morphokinetics. *Fertil. Steril.* 99, 1030–1034.

Hlinka, D., Kaľatová, B., Uhrinová, I., Dolinská, S., Rutarová, J., Rezáčová, J., Lazarovská, S., and Dudáš, M. (2012). Time-lapse cleavage rating predicts human embryo viability. *Physiol. Res.* 61, 513–525.

Kakourou, G., Jaroudi, S., Tulay, P., Heath, C., Serhal, P., Harper, J.C., and Sengupta, S.B. (2013). Investigation of gene expression profiles before and after embryonic genome activation and assessment of functional pathways at the human metaphase II oocyte and blastocyst stage. *Fertil. Steril.* 99, 803–814.e23.

Kaser, D.J., and Racowsky, C. (2014). Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: a systematic review. *Hum. Reprod. Update* 1–15.

Kirkegaard, K., Hindkjaer, J.J., Grøndahl, M.L., Kesmodel, U.S., and Ingerslev, H.J. (2012a). A randomized clinical trial comparing embryo culture in a conventional incubator with a time-lapse incubator. *J. Assist. Reprod. Genet.* 29, 565–572.

Kirkegaard, K., Agerholm, I.E., and Ingerslev, H.J. (2012b). Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. *Hum. Reprod.* 27, 1277–1285.

Kirkegaard, K., Kesmodel, U.S., Hindkjær, J.J., and Ingerslev, H.J. (2013). Time-lapse parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: a prospective cohort study. *Hum. Reprod.* 28, 2643–2651.

Lechniak, D., Pers-Kamczyc, E., and Pawlak, P. (2008). Timing of the first zygotic cleavage as a marker of developmental potential of mammalian embryos. *Reprod. Biol.* 8, 23–42.

Leese, H.J. (2012). Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. *Reproduction* 143, 417–427.

Lemmen, J., Agerholm, I., and Ziebe, S. (2008). Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod. Biomed. Online* 17, 385–391.

Lundin, K., Bergh, C., and Hardarson, T. (2001). Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum. Reprod.* 16, 2652–2657.

Machtinger, R., and Racowsky, C. (2013). Morphological systems of human embryo assessment and clinical evidence. *Reprod. Biomed. Online* 26, 210–221.

Massip, A., and Mulnard, J. (1980). Time-lapse cinematographic analysis of hatching of normal and frozen-thawed cow blastocysts. *J. Reprod. Fertil.* 58, 475–478.

Mercé, L.T., Bau, S., Barco, M.J., Troyano, J., Gay, R., Sotos, F., and Villa, A. (2006). Assessment of the ovarian volume, number and volume of follicles and ovarian vascularity by three-dimensional ultrasonography and power Doppler angiography on the HCG day to predict the outcome in IVF/ICSI cycles. *Hum. Reprod.* 21, 1218–1226.

Meseguer, M., Herrero, J., Tejera, A., Hilligsøe, K.M., Ramsing, N.B., and Remohí, J. (2011). The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum. Reprod.* 26, 2658–2671.

Meseguer, M., Rubio, I., Cruz, M., Basile, N., Marcos, J., and Requena, A. (2012). Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertil. Steril.* 98, 1481–9.e10.

Mio, Y., and Maeda, K. (2008). Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 199, 660.e1–5.

Montag, M., Liebenthron, J., and Köster, M. (2011). Which morphological scoring system is relevant in human embryo development? *Placenta* 32, S252–6.

Montag, M., Toth, B., and Strowitzki, T. (2013). New approaches to embryo selection. *Reprod. Biomed. Online* 27, 539–546.

Nakahara, T., Iwase, A., Goto, M., Harata, T., Suzuki, M., Ienaga, M., Kobayashi, H., Takikawa, S., Manabe, S., Kikkawa, F., et al. (2010). Evaluation of the safety of time-lapse observations for human embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.* 27, 93–96.

O'Neill, C. (1998). Autocrine mediators are required to act on the embryo by the 2-cell stage to promote normal development and survival of mouse preimplantation embryos in vitro. *Biol. Reprod.* 58, 1303–1309.

Payne, D., Flaherty, S.P., Barry, M.F., and Matthews, C.D. (1997). Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum. Reprod.* 12, 532–541.

Pribenszky, C., Losonczy, E., Molnár, M., Lang, Z., Mátyás, S., Rajczy, K., Molnár, K., Kovács, P., Nagy, P., Conceicao, J., et al. (2010a). Prediction of in-vitro developmental competence of early cleavage-stage mouse embryos with compact time-lapse equipment. *Reprod. Biomed. Online* 20, 371–379.

Pribenszky, C., Mátyás, S., Kovács, P., Losonczy, E., Zádori, J., and Vajta, G. (2010b). Pregnancy achieved by transfer of a single blastocyst selected by time-lapse monitoring. *Reprod. Biomed. Online* 21, 533–536.

Reich, A., Klatsky, P., Carson, S., and Wessel, G. (2011). The transcriptome of a human polar body accurately reflects its sibling oocyte. *J. Biol. Chem.* 286, 40743–40749.

Rubio, I., Kuhlmann, R., Agerholm, I., Kirk, J., Herrero, J., Escibá, M.-J., Bellver, J., and Meseguer, M. (2012). Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study. *Fertil. Steril.* 98, 1458–1463.

Sakkas, D., Shoukir, Y., Chardonens, D., Bianchi, P.G., and Campana, A. (1998). Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum. Reprod.* 13, 182–187.

Sifer, C., Handelsman, D., Grange, E., Porcher, R., Poncelet, C., Martin-Pont, B., Benzacken, B., and Wolf, J.-P. (2009). An auto-controlled prospective comparison of two embryos culture media (G III series versus ISM) for IVF and ICSI treatments. *J. Assist. Reprod. Genet.* 26, 575–581.

Takenaka, M., Horiuchi, T., and Yanagimachi, R. (2007). Effects of light on development of mammalian zygotes. *Appl. Biol. Sci.* 104, 14289–14293.

Tejera, A., Herrero, J., Los Santos, M.J. de, Garrido, N., Ramsing, N., and Meseguer, M. (2011). Oxygen consumption is a quality marker for human oocyte competence conditioned by ovarian stimulation regimens. *Fertil. Steril.* 96, 618–623.e2.

Tejera, A., Herrero, J., Vilorio, T., Romero, J.L., Gamiz, P., and Meseguer, M. (2012). Time-dependent O₂ consumption patterns determined optimal time ranges for selecting viable human embryos. *Fertil. Steril.* 98, 849–57.e3.

Wale, P.L., and Gardner, D.K. (2010). Time-lapse analysis of mouse embryo development in oxygen gradients. *Reprod. Biomed. Online* 21, 402–410.

Wong, C., Chen, A.A., Behr, B., and Shen, S. (2013). Time-lapse microscopy and image analysis in basic and clinical embryo development research. *Reprod. Biomed. Online* 26, 120–129.

Wong, C.C., Loewke, K.E., Bossert, N.L., Behr, B., De Jonge, C.J., Baer, T.M., and Pera, R.A.R. (2010). Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat. Biotechnol.* 28, 1115–1121.

Yakin, K., Balaban, B., and Urman, B. (2005). Impact of the presence of one or more multinucleated blastomeres on the developmental potential of the embryo to the blastocyst stage. *Fertil. Steril.* 83, 243–245.

Zhang, J.Q., Li, X.L., Peng, Y., Guo, X., Heng, B.C., and Tong, G.Q. (2010). Reduction in exposure of human embryos outside the incubator enhances embryo quality and blastulation rate. *Reprod. Biomed. Online* 20, 510–515.