

MSC
2.º
CICLO
FCUP
2016

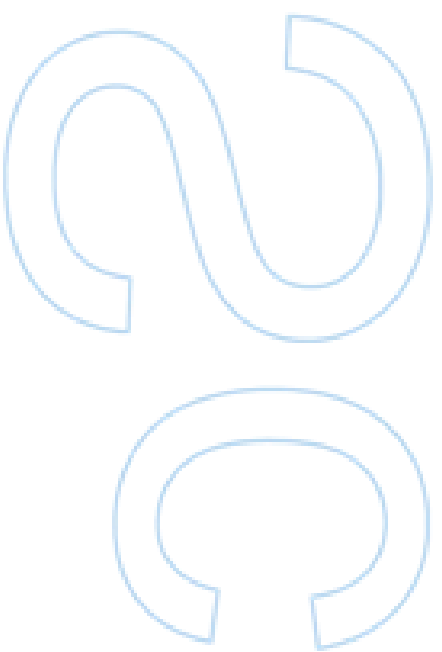
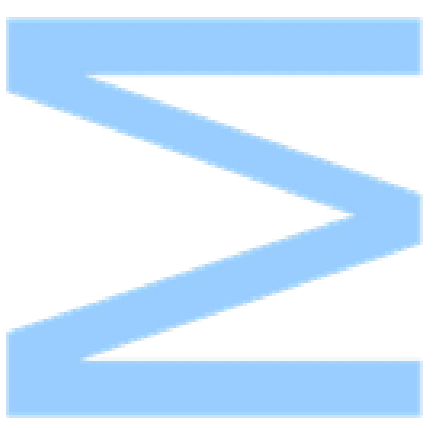


Relatório de Estágio:
O Laboratório de Procriação Medicamente Assistida

Sara Raquel Machado Oliveira
FC

Relatório de Estágio: O Laboratório de Procriação Medicamente Assistida

Sara Raquel Machado Oliveira
Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
Biologia Celular e Molecular
2016

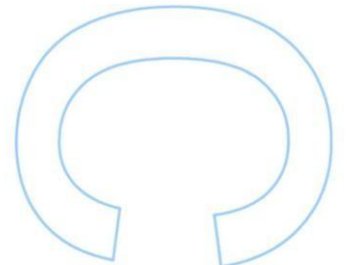
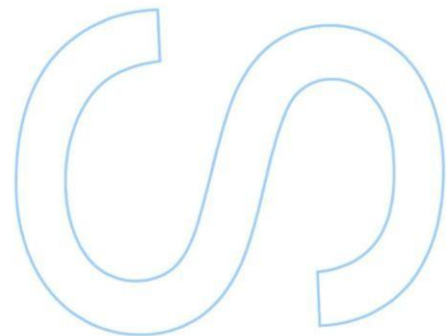
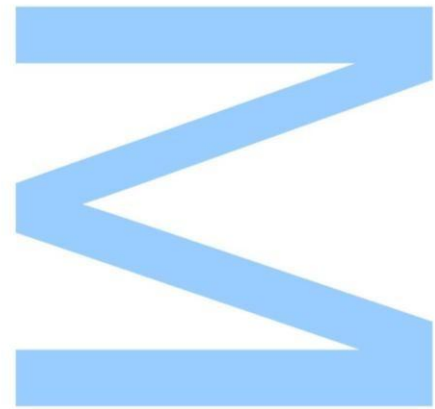




Relatório de Estágio: O Laboratório de Procriação Medicamentemente Assistida

Sara Raquel Machado Oliveira
Mestrado em Biologia Celular e Molecular
Departamento de Biologia
2016

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

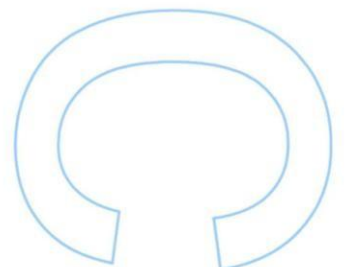
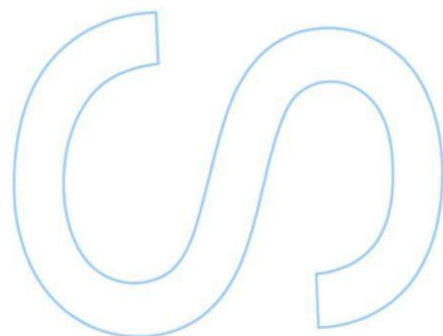
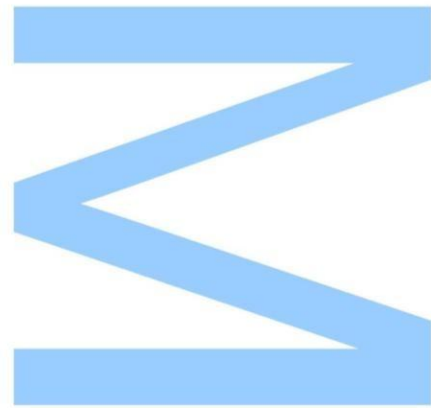




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____ / ____ / ____



Agradecimentos

Existe um provérbio africano que diz “É preciso uma aldeia para educar uma criança”. Na procriação medicamente assistida dizemos “É preciso uma equipa para fazer uma.”

Ao meu orientador, Professor Vasco Almeida, por me ter dado esta oportunidade única de trabalhar na área que eu sempre quis e por todo o apoio, disponibilidade e prontidão demonstrados tanto ao longo deste ano de dissertação como durante todo o meu percurso académico.

Aos Doutores Joaquim Gonçalves e Jorge Braga, pela oportunidade dada e por todas as vezes que permitiram que trabalhássemos em conjunto.

À Doutora Isabel Damião, pelos conhecimentos transmitidos, pela orientação dada e pela confiança e incentivo demonstrados nos momentos em que mais precisei.

À minha colega de estágio, Daniela Sousa, por toda a cooperação, entajuda e amizade demonstrada durante este nosso percurso em conjunto.

Aos meus amigos, Fábio Leite, Fernanda Bernardo, João Faria, Mafalda Mourão, Marco Amaral, Pedro Cunha, Pedro Rodrigues, Raúl Oliveira, Ricardo Sousa, Rita Fortuna, Rita Santos e Susana Barros, por me demonstrarem que a amizade é das melhores coisas que levamos da vida académica, por estarem ao meu lado ao longo destes cinco anos e por serem a minha segunda família.

Aos meus pais e avós, pela educação que me deram, por todos os valores e aprendizagens que me transmitiram e que foram fundamentais ao longo deste ano e, principalmente, por me ensinarem que nunca devemos desistir dos nossos sonhos.

Índice

Agradecimentos	I
Lista de Abreviaturas	V
Lista de Figuras	VIII
Lista de Tabelas	XIV
Resumo	1
Abstract	2
1. Introdução.....	3
1.1. Eixo Hipotálamo-Hipófise Anterior-Gónadas.....	3
1.2. Sistema Reprodutor Masculino	4
1.2.1. Espermatogénese.....	7
1.2.2. Controlo Hormonal.....	11
1.3. Sistema Reprodutor Feminino	14
1.3.1. Oogénese.....	16
1.3.2. Desenvolvimento Folicular.....	18
1.3.3. Ciclo Menstrual e Regulação Hormonal.....	19
1.3.3.1. Ciclo Ovário	20
1.3.3.2. Ciclo Uterino.....	22
1.4. Transporte de Gâmetas e Fertilização	24
1.5. Transporte do Zigoto e Implantação	27
2. Infertilidade	31
2.1. Conceitos e Epidemiologia	31
2.2. História da Infertilidade	32
2.3. Abordagem do Casal Infértil.....	34
2.4. Avaliação do Casal Infértil – Causas de Infertilidade	35
2.4.1. Fatores Não Patológicos.....	36
2.4.1.1. Frequência das Relações Sexuais.....	36
2.4.1.2. Idade	37
2.4.2. Fatores Patológicos Masculinos	38
2.4.3. Fatores Patológicos Femininos.....	43

3. Colheita, Preparação e Seleção de Gâmetas	48
3.1. Análise da Amostra Seminal	48
3.1.1. Parâmetros Macroscópicos	49
3.1.1.1. Aparência Visual.....	49
3.1.1.2. Liquefação.....	49
3.1.1.3. Viscosidade	50
3.1.1.4. Volume	50
3.1.1.5. pH.....	50
3.1.2. Parâmetros Microscópicos.....	51
3.1.2.1. Motilidade	51
3.1.2.2. Vitalidade.....	52
3.1.2.3. Concentração	54
3.1.2.4. Morfologia.....	56
3.1.2.5. Outras Células que não Espermatozoides.....	58
3.1.2.6. Anticorpos Anti-espermatozoides	59
3.1.3. Valores Mínimos de Referência	60
3.1.4. Nomenclatura	61
3.2. Métodos de Colheita da Amostra Seminal	61
3.3. Processamento da Amostra Seminal	64
3.4. Estimulação Ovária	66
3.5. Punção Folicular	67
3.6. Avaliação da Maturidade Ovocitária.....	68
3.7. Desnudação	69
3.7.1. Avaliação da Maturidade Ovocitária após Desnudação	70
3.7.2. Avaliação da Qualidade Ovocitária	70
3.7.2.1. Tamanho e Forma do Ovócito	71
3.7.2.2. Anomalias Intracitoplasmáticas	71
3.7.2.3. Anomalias Extracitoplasmáticas	72
4. Inseminação Intrauterina	74
5. Fertilização <i>in vitro</i>	76
6. Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides	78
6.1. Equipamento de Micromanipulação	79
6.2. Procedimento e Aspetos Técnicos da Microinjeção	81

7.	Cultura Embrionária.....	84
7.1.	Avaliação da Fertilização	85
7.1.1.	Avaliação dos Pronúcleos.....	85
7.1.2.	Avaliação dos Corpos Precursores dos Nucléolos.....	87
7.1.3.	Avaliação do Citoplasma	88
7.2.	Avaliação da Qualidade Embrionária	89
7.2.1.	Singamia e Divisão Precoce	89
7.2.2.	Fase de Clivagem.....	90
7.2.3.	Compactação Celular – Mórula.....	93
7.2.4.	Blastocisto	94
7.2.5.	O Avanço na Avaliação da Qualidade Embrionária – <i>time-lapse</i>	95
7.3.	Diagnóstico Genético Pré-Implantação	98
8.	Transferência de Embriões.....	101
8.1.	Eclosão Assistida.....	103
9.	Criopreservação	104
9.1.	Criopreservação de Embriões.....	104
9.2.	Criopreservação de Ovócitos.....	106
9.3.	Criopreservação de Espermatozoides	108
10.	Doação de Gâmetas e Embriões	110
10.1.	Doação de Espermatozoides	110
10.2.	Doação de Ovócitos	111
10.3.	Doação de Embriões.....	112
	Considerações Finais	113
	Referências Bibliográficas.....	114

Lista de Abreviaturas

- ABP – Proteína de Ligação aos Androgénios (*Androgen Binding Protein*)
- AREL – Agregados do Retículo Endoplasmático Liso
- ATP – Adenosina Trifosfato
- AZF – Fator de Azoospermia
- CC – Citrato de Clomifeno
- CCO – Complexo *Cumulus*-Ovócito
- CFTR – Proteína Reguladora do Transporte Transmembranar da Fibrose Quística
- CGH – Hibridização Genómica Comparativa (*Comparative Genomic Hybridization*)
- CPN – Corpos Precusores dos Nucléolos
- DGPI – Diagnóstico Genético Pré-Implantação
- DGS – Direção-Geral da Saúde
- DIP – Doença Inflamatória Pélvica
- EA – Eclosão Assistida
- EPV – Espaço Perivitelino
- FISH – Hibridização Fluorescente *in situ* (*Fluorescence In Situ Hybridization*)
- FIV – Fertilização *in vitro*
- FOP – Falência Ovária Prematura
- FSH – Hormona Folículo-Estimulante
- GnRH – Hormona Libertadora de Gonadotrofinas
- GP – Glóbulo Polar
- hCG – Hormona Coriónica Humana
- HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
- hMG – Hormona Menopáusicas Humana

HSG – Histerossalpingografia

IBT – *Immunobead Test*

ICMART – *International Committee Monitoring Assisted Reproductive Technologies*

ICSI – Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides

Ig – Imunoglobulina

IUI – Inseminação Intrauterina

IMC – Índice de Massa Corporal

ITS – Infecções de Transmissão Sexual

IVG – Interrupção Voluntária da Gravidez

LH – Hormona Luteinizante

MAR – *Mixed Antiglobulin Reaction*

MESA – *Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration*

MI – Metafase I

MII – Metafase II

NOA – Azoospermia Não Obstrutiva

OA – Azoospermia Obstrutiva

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)

PESA – *Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration*

PMA – Procriação Medicamente Assistida

PN – Pró-Núcleo

PSA – Antígeno Específico da Próstata (*Prostate-Specific Antigen*)

PVP – Polivinilpirrolidona

PZD – Disseção Parcial da Zona Pelúcida (*Partial Zona Dissection*)

QI – Quociente de Inteligência

SCO – Síndrome “só Células de Sertoli” (*Sertoli Cell-Only*)

SNP – Polimorfismo de Nucleótido Único (*Single Polymorfism Nucleotide*)

SOP – Síndrome do Ovário Poliquístico

SUZI – Injeção Subzonal (*Subzonal Insemination*)

TE – Trofoectoderme

TESA – *Testicular Sperm Aspiration*

TESE – *Testicular Sperm Extraction*

VG – Vesícula Germinativa

ZD – *Drilling* da Zona Pelúcida (*Zona Drilling*)

ZP – Zona Pelúcida

Lista de Figuras

Fig. 1 – Organização anatómica do aparelho reprodutor masculino. A figura mostra o testículo, o epidídimo, o vaso deferente, ducto ejaculatório, vesícula seminal e glândula bulbouretral apenas de um lado do corpo, apesar de representarem estruturas pares. Quando o ducto ejaculatório se une à uretra na próstata, ocorre a fusão do sistema urinário e reprodutor. Adaptado de Vander *et al.* (2001).

Fig. 2 – Estrutura do testículo e do túbulo seminífero. (a) Anatomia geral do testículo, com corte de modo a revelar as estruturas internas; (b) Corte transversal de um túbulo seminífero. As células de Leydig encontram-se no tecido intersticial. Adaptado de Tate (2012a).

Fig. 3 – Relação das células de Sertoli com as células da linha germinativa em desenvolvimento. A figura representa a parede do túbulo seminífero. De notar que cada espermatócito primário dá origem a quatro espermatozoides. Adaptado de Sherwood (2010).

Fig. 4 – Espermatozoide maduro. Um espermatozoide é constituído por uma cabeça composta pelo núcleo e recoberta com uma vesícula com enzimas, o acrossoma, por uma peça intermédia com mitocôndrias e por um flagelo formado por microtúbulos. Adaptado de Silverthorn (2010).

Fig. 5 – Controlo hormonal do sistema reprodutor masculino. De notar que a FSH atua apenas nas células de Sertoli, enquanto a LH atua apenas nas células de Leydig. A secreção de FSH é inibida maioritariamente pela inibina, uma hormona segregada pelas células de Sertoli. A secreção de LH é inibida maioritariamente pela testosterona, a hormona segregada pelas células de Leydig. A testosterona, atuando localmente, é essencial para a espermatogénese. Adaptado de Sherwood (2010).

Fig. 6 – Organização anatómica do aparelho reprodutor feminino. A figura apresenta os ovários, as trompas, o útero e a vagina, bem como os ligamentos de apoio. As trompas, o útero e a vagina apresentam cortes transversais para demonstrar a anatomia interna. Adaptado de Tate (2012a).

Fig. 7 – Desenvolvimento folicular e ovocitário. Tipos de folículos ováricos, desde o primordial até ao maduro. Adaptado de Tate (2012a).

Fig. 8 – Ciclo Menstrual. Relação entre as alterações no ciclo ovárico e no ciclo uterino durante o ciclo menstrual de 28 dias. Adaptado de Silverthorn (2010).

Fig. 9 – Fertilização: contacto e fusão do ovócito e do espermatozoide. A figura representa, de modo simplificado, os acontecimentos desde que as membranas de ambos os gâmetas se fundem até ao momento de fusão dos pronúcleos masculino e feminino para formarem o zigoto. Adaptado de Moore *et al.* (2004).

Fig. 10 – Estados iniciais do desenvolvimento desde a fertilização até à implantação. O ovócito fertilizado divide-se progressivamente por clivagem até produzir uma mórula que, por sua vez, se torna um blastocisto à medida que se move do local de fertilização na trompa até ao local de implantação no útero. O óvulo e o blastocisto apresentam cortes transversais para possibilitar a visualização da organização interna. As estruturas não se encontram à escala. Adaptado de Sherwood (2010).

Fig. 11 – Etapas da implantação. (a) Adesão – o trofoblasto adere ao epitélio endometrial com a MCI direcionada para a parede uterina. (b) Invasão inicial – surgem microvilosidades na superfície do trofoblasto, que invadem o endométrio; (c) Invasão – o embrião começa a penetrar na mucosa uterina e a invadir as camadas mais profundas da parede uterina. Adaptado de Speroff (1999).

Fig. 12 – Fertilidade relativa de acordo com a idade materna. Uma probabilidade de 1.0 é atribuída ao grupo etário entre os 20 e os 24 anos, representativo da maior taxa de fertilidade. A partir deste período começa a verificar-se um decréscimo, que passa a ser mais acentuado após os 37 anos. Adaptado de Bayer (2012).

Fig. 13 – Realização de um esfregaço. A alíquota da suspensão espermática (S) colocada numa extremidade da lâmina é espalhada no sentido da outra extremidade (na direção da seta) com recurso a outra lâmina. Adaptado de WHO (2010).

Fig. 14 – Representação esquemática das alterações morfológicas típicas em espermatozoides humanos sujeitos ao teste da hipoosmolaridade. A turgescência está representada a cinzento. (a) Sem alteração; (b)-(g) Vários tipos de alterações no flagelo. Adaptado de WHO (2010).

Fig. 15 – Esquemas da grelha de contagem da câmara de Neubauer. Esta câmara apresenta duas câmaras de contagem, onde cada uma possui uma grelha de 3mm x 3mm, e requer uma lamela de espessura especial, suportada 0,1 mm acima da base. Cada área de contagem é dividida em nove grelhas de 1mm x 1mm cada (à esquerda). A grelha central consiste em 25 quadrados grandes rodeados por linhas triplas (ao centro), onde cada um desses quadrados contém 16 quadrados pequenos, também eles rodeados por linhas triplas (à direita). Com uma ampliação de 400x,

apenas é possível observar um quadrado grande no mesmo campo de visão. Adaptado de WHO (2010).

Fig. 16 – Microfotografia de um espermatozoide morfologicamente normal. Adaptado de WHO (2010).

Fig. 17 – Microfotografias de espermatozoides apresentando anomalias da cabeça. (a) Microcefalia; (b) Macrocefalia; (c) Afunilada; (d) Piriforme; (e) Redonda; (f) Amorfa; (g) Vacuolizada (com mais de dois vacúolos ou mais de 20% da área da cabeça ocupada por vacúolos); (h) Acrossoma grande (>70% do tamanho da cabeça); e (i) Acrossoma pequeno (<20% do tamanho da cabeça). Adaptado de WHO (2010).

Fig. 18 – Microfotografias de espermatozoides apresentando anomalias da peça intermédia. (a) Espessa; (b) Irregular; (c) Dobrada; (d) Inserção anómala; e (e) Restos citoplasmáticos. Adaptado de WHO (2010).

Fig. 19 – Microfotografias de espermatozoides apresentando anomalias da cauda. (a) Enrolada; (b) Dobrada, e (c) Dupla. Adaptado de WHO (2010).

Fig. 20 - Microfotografias de outros elementos celulares que não espermatozoides. (a) Célula epitelial do trato genital masculino; (b) Espermatócito; (c) Espermátide; e (d) Leucócito. Adaptado de WHO (2010).

Fig. 21 – Centrifugação por gradientes de densidade descontínuos. (a) Posição dos gradientes de 40% e 80% e da amostra seminal antes da centrifugação; (b) Após a centrifugação, os espermatozoides móveis e normais acumulam-se no fundo do tubo (*pellet*), enquanto os espermatozoides imaturos e imóveis localizam-se na interface dos dois gradientes e no gradiente de 40%. O plasma seminal permanece no topo dos gradientes (Mortimer e Mortimer, 2013).

Fig. 22 – Complexos *cumulus*-ovócito em diferentes estados de maturação. (a) CCO imaturo – as células circundantes apresentam-se compactas; (b) CCO maduro – as células circundantes encontram-se expandidas. Adaptado de Elder (2005).

Fig. 23 – Avaliação da maturidade ovocitária após desnudação. (a) Ovócito imaturo em profase I, com a presença da VG; (b) Ovócito imaturo em MI – o reinício da meiose levou ao desaparecimento da VG, mas o 1º GP está ainda ausente; (c) Ovócito maduro em MII, com a extrusão do 1º GP. Adaptado de Granot e Dekel (2009).

Fig. 24 – Comparação de um ovócito de tamanho normal com um ovócito gigante (à direita). Adaptado de Rienzi *et al.* (2012).

Fig. 25 – Anomalias intracitoplasmáticas. (a) Ovócito com citoplasma normal homogéneo; (b) Ovócito com granulosidade no citoplasma; (c) Ovócito com uma área central granulosa típica de presença de agregação de organelos; (d) Ovócito com um grande corpo refrátil no citoplasma; (e) Ovócito com um único vacúolo de pequenas dimensões; (f) Ovócito com disco de AREL no centro do citoplasma. Todos os ovócitos apresentados encontram-se em MII. Adaptado de Rienzi *et al.* (2012).

Fig. 26 – Anomalias extracitoplasmáticas. (a) Ovócito com uma ZP espessa; (b) Ovócito com EPV aumentado; (c) Ovócito com o 1º GP fragmentado; (d) Ovócito com o 1º GP gigante (5-6 vezes maior que o normal). Todos os ovócitos apresentados encontram-se em MII. Adaptado de Rienzi *et al.* (2012).

Fig. 27 – Representação de uma IIU. Na imagem pode observar-se o espéculo inserido na vagina e o cateter de inseminação, acoplado à seringa que contém os espermatozoides, no interior da cavidade uterina. Retirada de <http://americanpregnancy.org/infertility/intrauterine-insemination/>, acedido a 11/07/2016

Fig. 28 – Técnicas de micromanipulação. São apresentadas representações do *drilling* da ZP (ZD), da disseção parcial da ZP (PZD) e da injeção subzonal de espermatozoides (SUZI). Adaptado de Elder e Dale (2011)

Fig. 29 – Equipamento necessário para a injeção intracitoplasmática de espermatozoides. O microscópio invertido é equipado com um contraste ótico de Hoffman, uma superfície aquecida na platina e dois *sets* idênticos de micromanipuladores e injetores. O *set* da esquerda é utilizado para a manipulação da pipeta *holding*, enquanto o da direita permite o controlo da pipeta ICSI. À direita encontra-se uma ampliação do micromanipulador e respetivo microinjetor, que permite a aspiração ou rejeição de gâmetas e meio. Adaptado de Joris *et al.* (1998) e Barnes (2012).

Fig. 30 – Representação esquemática da placa de microinjeção. (a) Vista superior: as gotas de PVP espalhadas, onde serão colocados os espermatozoides, situam-se à esquerda, enquanto as gotas de meio tamponado, onde serão colocados os ovócitos, encontram-se à direita; (b) Vista frontal: gotas de PVP e de meio tamponado cobertas pelo óleo, responsável pela manutenção das condições de temperatura durante a microinjeção.

Fig. 31 – Processo de microinjeção. De notar a posição do GP às 12h. (a) Antes da entrada no ovócito, o espermatozoide é aproximado da abertura da pipeta de microinjeção; (b) Quando a pipeta de microinjeção atinge o centro do ovócito, observa-

se a rotura da membrana plasmática do ovócito. O espermatozoide é depositado junto à superfície interna da membrana do ovócito (às 9 horas); (c) Após a retirada da pipeta, é observada a rotura da membrana plasmática do ovócito, em forma de cone com o vértice no centro do ovócito. Adaptado de Neri *et al.* (2012).

Fig. 32 – Avaliação do número de PN em pré-zigotos. (a) Pré-zigoto com os CPN perfeitamente alinhados na junção central e justaposta dos PN. Os GP estão fragmentados e encontram-se no eixo longitudinal dos PN. Parecem estar presentes restos celulares no EPV e o halo citoplasmático; (b) Pré-zigoto com apenas 1PN e dois GP distanciados; (c) Pré-zigoto com 3PN como resultado de ICSI num ovócito gigante. Um dos 3PN é ligeiramente maior que os outros. Adaptado de Papale *et al.* (2012).

Fig. 33 – Embriões em diferentes estados de clivagem. (a) Embrião em fase de 2 células, após divisão precoce; (b) Embrião em estado de 4 células; (c) Embrião em estado de 8 células. De notar que todos os embriões apresentados constituem embriões ‘ideais’, sem a presença de fragmentação nem de multinucleação. Adaptado de Prados *et al.* (2012).

Fig. 34 – Diferentes estados de compactação. (a) Embrião de 8 células apresentando compactação moderada. A distinção individual dos blastómeros começa a ser difícil; (b) Mórula de boa qualidade. Todos os blastómeros são incluídos no processo de compactação, não sendo evidentes células individuais; (c) Mórula de má qualidade com diversas células e fragmentos excluídos da massa compacta de células. Adaptado de Prados *et al.* (2012).

Fig. 35 – Diferentes graus de expansão dos blastocistos. (a) Blastocisto inicial; (b) Blastocisto em expansão; (c) Blastocisto expandido com uma MCI e TE de boa qualidade (3-1-1). Adaptado de ASEBIR (2015).

Fig. 36 – Blastocistos e eclosão. (a) Blastocisto em eclosão, a libertar-se da ZP; (b) Blastocisto eclodido, com a ZP à sua esquerda. Adaptado de ASEBIR (2015).

Fig. 37 – Diagnóstico genético pré-implantação. (a) Biópsia embrionária em fase de clivagem apresentando a remoção de 1 blastómero (Adaptado de Iwarsson *et al.* 2011); (b) Biópsia embrionária em fase de blastocisto apresentando a remoção de células da TE (Adaptado de Thornhill *et al.* 2012).

Fig. 38 – Representação de uma transferência de embriões. Na imagem pode observar-se o espéculo inserido na vagina e o cateter de transferência, onde se encontram os embriões, acoplado a uma seringa, no interior da cavidade uterina. No

canto superior esquerdo observa-se uma imagem resultante da visualização ecográfica. Retirada e adaptada de <http://www.ivfconnections.com/forums/content.php/569-After-IVF-Embryo-Transfer-What-You-Need-to-Know>, acedido a 24/07/2016.

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Níveis hormonais em vários estados clínicos. Adaptado de ASRM (2012b).

Tabela 2 – Sistema de classificação das diferentes categorias de motilidade. Adaptado de NAFA e ESHRE-SIGA (2002).

Tabela 3 – Determinação do fator de diluição necessário para avaliação da concentração, de acordo com o número de espermatozoides observados na amostra a fresco (não diluída) na ampliação de 400x. Adaptado de WHO (2010).

Tabela 4 – Determinação do número de quadrados que devem ser contados e do fator de conversão para o cálculo da concentração, sendo este fator dependente da diluição prévia e do número de quadrados contados. Para a determinação precisa de amostras com baixa concentração de espermatozoides, é recomendada a contagem dos 25 quadrados da grelha. Adaptado de NAFA e ESHRE-SIGA (2002).

Tabela 5 – Valores mínimos de referência para os parâmetros analisados na amostra seminal. Adaptado de WHO (2010).

Tabela 6 – Nomenclatura relativa aos diversos parâmetros de análise da amostra seminal e seus desvios dos valores mínimos de referência. O sufixo ‘-spermia’ refere-se ao ejaculado, enquanto o sufixo ‘-zoospermia’ é direcionado aos espermatozoides. Adaptado de WHO (2010).

Tabela 7 – Medicação mais comum para a estimulação ovárica. Adaptado de Shoham e Howles (2009) e Santbrink e Fauser (2008).

Tabela 8 – Estados de maturidade nuclear do ovócito. Esta avaliação é realizada de acordo com a presença e/ou ausência do 1º GP no espaço perivitelino (EPV) e da VG. Adaptado de Rienzi *et al.* (2012) e Gosden (2014).

Tabela 9 – Sistema de classificação de PN segundo os Consensos de Istambul. Adaptado de Alpha SiRM e ESHRE SIGE (2011).

Tabela 10 – Sistema de classificação *Z-scoring*. Os pré-zigotos com igual número de CNP alinhados na junção dos pronúcleos são designados Z1; os que possuem um número igual mas não alinhados são designados Z2; os que possuem desigualdade no número ou no alinhamento dos CPN são designados Z3; os pré-zigotos com PN com um tamanho muito desigual ou que não se encontram em posição central são designados Z4. Adaptado de Scott (2003).

Tabela 11 – *Timings* de observação de ovócitos fertilizados e de embriões e respetivo estado de desenvolvimento expectável. Adaptado de Alpha SiRM e ESHRE SIGE (2011).

Tabela 12 – Sistema de classificação de embriões em fase de clivagem. Adaptado de Alpha SiRM e ESHRE SIGE, (2011).

Tabela 13 – Sistema de classificação de embriões em estado de mórula. Adaptado de Alpha SiRM e ESHRE SIGE, (2011).

Tabela 14 – Sistema de classificação de embriões em fase de blastocisto. O sistema de classificação de blastocistos é uma combinação do grau de expansão, da MCI e da TE; por exemplo, um blastocisto expandido com uma MCI boa e uma TE razoável é classificado como 3-1-2. Adaptado de Alpha SiRM e ESHRE SIGE, (2011).

Tabela 15 – Vitrificação e aquecimento de embriões. Estão apresentados o número de meios e os tempos de permanência em cada um deles, conforme se trate de vitrificação ou aquecimento de embriões em fase de clivagem ou blastocistos, segundo o método Rapid-i™ (*Vitrolife*, Suécia). De notar que apenas o meio RapidWarm Cleave™ possui um quarto meio de aquecimento.

Tabela 16 – Vitrificação e aquecimento de ovócitos. Estão apresentados o número de meios e os tempos de permanência em cada um deles, conforme se trate de vitrificação ou aquecimento de ovócitos, segundo o método Rapid-i™ (*Vitrolife*, Suécia). De notar que o meio RapidWarm Oocyte™ possui um quarto meio de aquecimento.

Resumo

A infertilidade é reconhecida pela Organização Mundial da Saúde como um problema de saúde pública, sendo definida pela incapacidade de obter uma gravidez após 12 meses ou mais de relações sexuais regulares e desprotegidas. Hoje em dia, afeta cerca de 10 a 15% dos casais em idade fértil, apresentando uma tendência crescente de acordo com a idade.

A capacidade reprodutiva está dependente de relações intrínsecas entre o hipotálamo, hipófise anterior, órgãos reprodutores e células-alvo das hormonas sexuais. Qualquer perturbação a este nível pode constituir a origem da infertilidade. As causas de infertilidade são bastante variadas e podem estar presentes em ambos os elementos do casal. Como tal, é necessário um diagnóstico completo e cuidado, de modo a permitir a identificação das causas deste problema bem como o desenvolvimento de um plano de tratamento adequado a cada casal. A inseminação intrauterina (IIU) é a técnica mais simples, na qual a amostra seminal, após colheita e tratamento em laboratório, é injetada diretamente na cavidade uterina da mulher. A fertilização *in vitro* (FIV) implica a estimulação ovárica da mulher e a colheita de ovócitos que são colocados, em laboratório, juntamente com os espermatozoides tratados, num meio de cultura apropriado para a ocorrência da fertilização. Por sua vez, a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) é o tratamento mais complexo de todos, sendo bastante idêntico ao procedimento realizado para a FIV, à exceção do facto dos espermatozoides serem diretamente microinjetados no interior do ovócito. Nos últimos dois tratamentos, os embriões resultantes são colocados em cultura e avaliados diariamente até ao dia de transferência, sendo os embriões excedentários criopreservados.

Adicionalmente podem ser realizadas técnicas de diagnóstico genético pré-implantação em casos em que está presente o risco de transmissão de doenças genéticas à descendência. A criopreservação de gâmetas é outro procedimento bastante vantajoso, na medida em que permite a criação de programas de doação de gâmetas bem como a preservação da fertilidade.

Os avanços significativos observados ao longo das últimas décadas na procriação medicamente assistida possibilitaram a aquisição de novos conhecimentos acerca da infertilidade, resultando no desenvolvimento de tecnologias reprodutivas benéficas para os casais inférteis.

Palavras-chave: infertilidade, procriação medicamente assistida, gâmetas, embriões, IIU, FIV, ICSI, criopreservação

Abstract

Infertility is recognized as a public health issue by the World Health Organization. It is defined by the failure to achieve a clinical pregnancy after 12 months or more of regular unprotected sexual intercourse. Nowadays, approximately 10-15% of couples in reproductive age are facing some kind of infertility problem, which has a tendency to increase with age.

Reproductive capability depends on intricate relationships among the hypothalamus, anterior pituitary, reproductive organs, and target cells of the sex hormones. Any disturbance at this level can be the source of infertility. There are multiple potential causes of infertility that can be present in both elements of the couple. It is necessary a comprehensive work-up to identify the causes of infertility and the appropriate treatment for each couple. Intrauterine insemination (IUI) is the simplest technique, in which the processed semen sample is directly injected in the uterine cavity. In vitro fertilization (IVF) implies ovarian stimulation and oocyte retrieval. Afterwards, the oocytes are inseminated with the sperm suspension in a culture media appropriate for fertilization. In turn, intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is the most complex treatment and very similar to the procedure performed to IVF. ICSI involves manual selection of the spermatozoa and its subsequent injection into the oocyte. In IVF and ICSI, the resulting embryos are placed in culture and daily scored until the day of transfer. The remaining embryos are cryopreserved.

Additionally, in cases with a high risk of genetic disorders transmission to the offspring, preimplantation genetic diagnosis can be performed. Gametes cryopreservation is another advantageous procedure, allowing the creation of gametes donation programs and fertility preservation.

Significant advances have been made in the field of reproductive medicine over the past several decades. The knowledge that has been gained had provided a better understanding of infertility and has resulted in the development of reproductive technologies that have been greatly benefited infertile couples.

Key-words: infertility, assisted reproduction, gametes, embryos, IUI, IVF, ICSI, cryopreservation

1. Introdução

A parentalidade é um dos eventos mais importante e desejado na vida do ser humano em idade adulta, contribuindo para a sua plenitude, felicidade e integração (Roupa *et al.*, 2009). No entanto, nem todos os casais conseguem obter uma gravidez espontaneamente, sendo alguns deles confrontados com o diagnóstico de infertilidade e consequentes tratamentos médicos necessários para a ultrapassar (Boivin *et al.*, 2007; Macaluso *et al.*, 2010).

Cada etapa deste percurso é caracterizada por interações entre o ambiente físico e social, os antecedentes biológicos e o comportamento dos indivíduos (Macaluso *et al.*, 2010). Como tal, é necessário compreender a anatomia e a fisiologia dos aparelhos reprodutores masculino e feminino, bem como todo o processo que envolve a formação de gâmetas (gametogénese) e respetiva fecundação, de modo a possibilitar a identificação dos fatores de infertilidade (Sherwood, 2010).

A reprodução está dependente da união dos gâmetas masculino e feminino, onde cada um deles contribui com metade dos cromossomas necessários para formar um novo indivíduo. Contrariamente ao que acontece com os outros sistemas do corpo humano, que são idênticos nos dois sexos, o sistema reprodutor é notoriamente distinto ao nível masculino e feminino, de acordo com o seu papel no processo reprodutivo (Sherwood, 2010).

1.1. Eixo Hipotálamo-Hipófise Anterior-Gónadas

As hormonas são os fatores mais importantes no sistema reprodutor, sendo reguladas pelo eixo hipotálamo-hipófise anterior-gónadas (Silverthorn, 2010). O hipotálamo é uma componente do cérebro localizada no diencéfalo, responsável pelo controlo de funções homeostáticas essenciais na manutenção da estabilidade interna do organismo (Sherwood, 2010). A hipófise, também chamada de glândula pituitária, encontra-se alojada numa cavidade óssea, a sela turca. Esta glândula encontra-se abaixo do hipotálamo e ligada fisicamente a ele (Vander *et al.*, 2001). É composta por dois lobos adjacentes – a hipófise posterior e a hipófise anterior – distintos a nível funcional e anatómico, dado que possuem origem em diferentes tecidos embrionários (Sherwood, 2010). A hipófise posterior, ou neurohipófise, corresponde a um tecido neural e liga-se ao hipotálamo por via de fibras nervosas (Vander *et al.*, 2001). Por sua

vez, a hipófise anterior, ou adenohipófise, consiste num tecido epitelial glandular cuja ligação ao hipotálamo é feita através de vasos sanguíneos (Sherwood, 2010). Deste modo, a libertação de hormonas por parte da hipófise é regulada pelo hipotálamo (Tate, 2012a).

O sistema reprodutivo possui algumas das vias de controlo mais complexas do corpo humano, caracterizadas por interações de variadas hormonas em constante mudança (Silverthorn, 2010). A regulação das funções reprodutivas inicia-se com a secreção do fator libertador de gonadotrofinas (GnRH) por parte do hipotálamo. Esta neurohormona é transportada para a hipófise anterior, estimulando a secreção de duas gonadotrofinas, a hormona luteinizante (LH) e a hormona folículo-estimulante (FSH), para a corrente sanguínea (Guyton e Hall, 2006; Tate, 2012a). As hormonas tróficas libertadas pela hipófise anterior vão atingir as gónadas. Enquanto a LH atua nas células endócrinas, promovendo a produção das hormonas esteroides sexuais, a FSH, juntamente com essas mesmas hormonas, estimula a gametogénese (Silverthorn, 2010).

As hormonas sexuais exercem numerosos efeitos em todas as partes do sistema reprodutivo. Adicionalmente, desempenham efeitos de *feedback* na secreção de GnRH, FSH e LH, fundamentais para a manutenção da homeostasia (Vander *et al.*, 2001; Sherwood, 2010). Cada ligação desta cadeia hormonal é essencial e o mau funcionamento de qualquer um dos seus intervenientes pode comprometer a produção de hormonas sexuais e a gametogénese (Vander *et al.*, 2001).

1.2. Sistema Reprodutor Masculino

O sistema reprodutor masculino é constituído pelos testículos, por um sistema de ductos genitais responsável pelo transporte de espermatozoides e secreções para o exterior, por glândulas anexas que contribuem com importantes secreções para a viabilidade e motilidade dos espermatozoides e pelo pénis, órgão copulador capaz de penetrar e depositar o líquido seminal na vagina (Figura 1) (Junqueira e Carneiro, 2008a; Sherwood, 2010).

Os testículos, gónadas masculinas, são responsáveis pela espermatogénese e pela produção de testosterona. Estes órgãos estão localizados fora da cavidade abdominal e encontram-se rodeados pelo escroto. Até ao sétimo mês do desenvolvimento intrauterino, os testículos do feto estão situados no abdómen. Após

este período, ocorre a sua descida, que constitui um aspeto fundamental para a correta produção de espermatozoides, uma vez que a espermatogénese requer uma temperatura inferior à temperatura corporal interna – cerca de 35°C (Vander *et al.*, 2001). Os testículos encontram-se rodeados por uma cápsula, designada túnica albugínea, que dá origem a numerosos septos incompletos de colagénio. Estes septos dividem os testículos em cerca de 250 a 300 compartimentos denominados lóbulos testiculares, entre os quais estão presentes os túbulos seminíferos rodeados por tecido intersticial (Silverthorn, 2010; Young *et al.*, 2013a). Estas duas porções do testículo são distintas a nível estrutural e funcional: enquanto o tecido intersticial é constituído por um tecido conjuntivo frouxo rico em vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e células de Leydig, responsáveis pela produção de testosterona, os túbulos seminíferos são estruturas altamente enroladas onde ocorre a produção de espermatozoides, com presença de células da linha germinativa bem como de células de Sertoli (Figura 2) (Junqueira e Carneiro, 2008a; Sherwood, 2010).

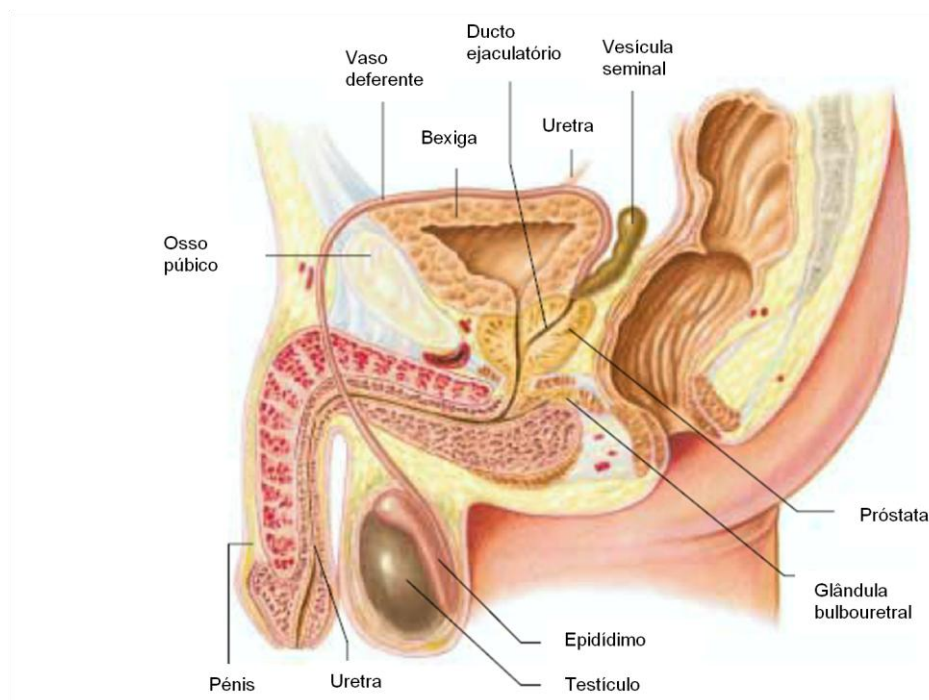


Fig. 1 – Organização anatómica do aparelho reprodutor masculino. A figura mostra o testículo, o epidídimo, o vaso deferente, ducto ejaculatório, vesícula seminal e glândula bulbouretral apenas de um lado do corpo, apesar de representarem estruturas pares. Quando o ducto ejaculatório se une à uretra na próstata, ocorre a fusão do sistema urinário e reprodutor. Adaptado de Vander *et al.* (2001).

Os túbulos seminíferos convergem num conjunto de canais, a rede testicular, a partir da qual cerca de 15 a 20 ductos, designados ductos eferentes, transportam os espermatozoides para a primeira parte do ducto deferente, também conhecida por epidídimo (Silverthorn, 2010; Young *et al.*, 2013a). O epidídimo tem como principal

função a maturação final dos espermatozoides, onde estes adquirem a capacidade de movimentação e de fertilização do ovócito através de secreções proteicas libertadas por este ducto (Silverthorn, 2010; Tate, 2012a). Contrações peristálticas do músculo liso impulsionam os espermatozoides do epidídimo para os ductos deferentes, que servem como local de armazenamento dos gâmetas masculinos (Figura 2) (Sherwood, 2010). A última porção dos ductos deferentes vai entroncar com o ducto de uma glândula anexa, as vesículas seminais, que se unem para formar o ducto ejaculatório que, por sua vez, se projeta na próstata e se une à uretra, proveniente da bexiga. Outras glândulas anexas, as glândulas bulbouretrais, drenam o seu conteúdo para a uretra, antes da entrada deste canal no pénis (Vander *et al.*, 2001; Sherwood, 2010).

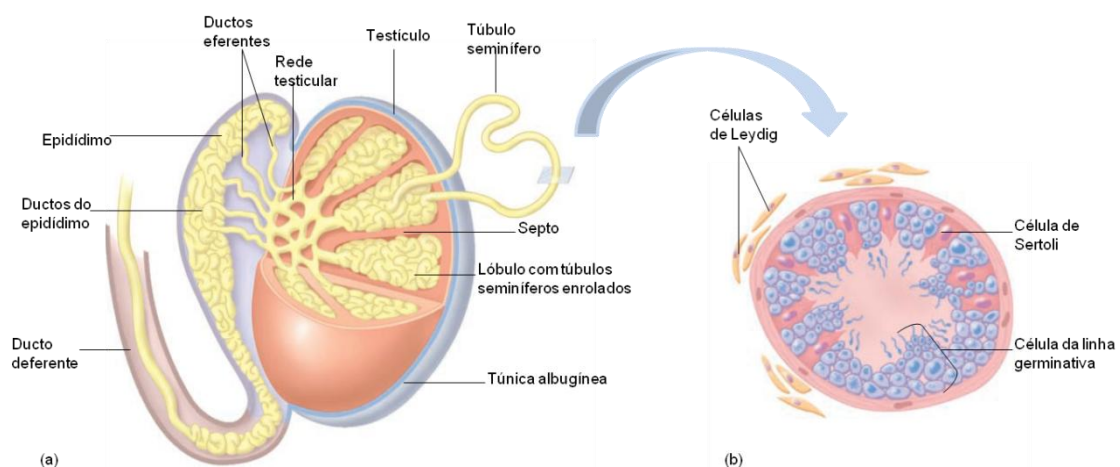


Fig. 2 – Estrutura do testículo e do túbulo seminífero. (a) Anatomia geral do testículo, com corte de modo a revelar as estruturas internas; (b) Corte transversal de um túbulo seminífero. As células de Leydig encontram-se no tecido intersticial. Adaptado de Tate (2012a).

As glândulas anexas referidas anteriormente – vesículas seminais, próstata e glândulas bulbouretrais – são responsáveis pela produção de secreções essenciais para a ocorrência da fecundação (Figura 1). As vesículas seminais, produtoras de um líquido viscoso, (1) fornecem frutose, utilizada como fonte primária de energia para os espermatozoides; (2) segregam prostaglandinas responsáveis por estimular a contração do músculo liso no sistema reprodutor masculino e feminino, ajudando ao transporte dos espermatozoides desde o local de armazenamento até ao local de fertilização; (3) fornecem cerca de 60% do volume do líquido seminal, que auxilia na lavagem da uretra ao longo da passagem do esperma e também dilui a massa de espermatozoides, permitindo que eles se tornem móveis; e (4) segregam fibrinogénio, um precursor da fibrina, que forma uma rede tridimensional proteica correspondente à base do coágulo seminal (Sherwood, 2010; Young *et al.*, 2013a). A próstata, que contribui com cerca de 30% do líquido seminal, (1) segregava um líquido alcalino que neutraliza as secreções ácidas da vagina (pH entre 3.5 e 4.0), importante para a

movimentação dos espermatozoides, que necessitam de um pH entre os 6.0 e os 6.5; (2) produz ácido cítrico e zinco, que conferem vantagem do ponto de vista energético, nutritivo e antibacteriano; (3) fornece enzimas de coagulação, que promovem a quebra do fibrinogénio em monómeros de fibrina, de modo a manter os espermatozoides na vagina aquando da retirada do pénis; e (4) liberta enzimas proteolíticas, onde se destaca o Antígeno Específico da Próstata (PSA – *Prostate Specific Antigen*), capazes de liquefazer o coágulo seminal formado após a ejaculação por degradação da fibrina, tornando o líquido seminal mais fluído e permitindo a movimentação dos espermatozoides (Sherwood, 2010; Silverthorn, 2010; Tate, 2012a). As glândulas bulbouretrais contribuem com menos de 1% para o líquido seminal, sendo apenas responsáveis pela secreção de muco que age como lubrificante durante a relação sexual e ainda neutraliza o ambiente ácido da uretra e da vagina (Silverthorn, 2010; Tate, 2012a). Os compostos específicos de cada uma das três glândulas anexas do aparelho reprodutor masculino são libertados para os ductos genitais e juntam-se aos espermatozoides apenas no momento da ejaculação, através da contração do músculo liso estimulado pelo sistema nervoso, formando, deste modo, o líquido seminal (Vander *et al.*, 2001; Junqueira e Carneiro, 2008a). Somente 4% do volume seminal total corresponde a células germinativas (Tate, 2012a).

1.2.1. Espermatogénese

Em todas as células somáticas, a divisão celular (mitose) resulta na formação de duas células-filhas, cada uma geneticamente idêntica à célula-mãe e com um conjunto completo de cromossomas (células diploides – $2n$). Por outro lado, a produção de células pertencentes à linha germinativa envolve um processo de divisão celular designado meiose, também conhecido por gametogénese, que leva à produção de células haploides (n), cada uma delas com uma combinação única a nível cromossómico (Young *et al.*, 2013a).

A produção de gâmetas masculinos, denominada por espermatogénese, é um processo complexo que pode ser dividido em três etapas principais: proliferação mitótica, meiose e espermiogénese (Sherwood, 2010). Todas estas fases ocorrem nos testículos, mais propriamente nos túbulos seminíferos, apesar da maturação final dos espermatozoides ocorrer no epidídimo (Young *et al.*, 2013a). Até à puberdade, os túbulos seminíferos não são funcionais e apresentam células primitivas em baixa quantidade, condição que se altera após essa fase, na qual se inicia a espermatogénese (Tate, 2012a).

A primeira etapa começa com a célula germinativa primordial, a espermatogónia, situada no compartimento basal do túbulo seminífero, que inicia as divisões mitóticas aquando da puberdade (Junqueira e Carneiro, 2008a). As células-filhas resultantes destas divisões podem distinguir-se em dois tipos de espermatogónias: as espermatogónias tipo A, que se dividem continuamente por mitose para produzir mais espermatogónias deste tipo e, assim, manter o *pool* de células da linha germinativa; e as espermatogónias tipo B, que sofrem diferenciação ao longo de sucessivos ciclos de divisão para darem origem aos espermatozoides. Deste modo, as espermatogónias tipo B são sujeitas a novas divisões mitóticas para produzir espermatócitos primários. Antes de se iniciar a segunda etapa da espermatogénese, os espermatócitos primários migram para o compartimento adluminal do túbulo seminífero (Junqueira e Carneiro, 2008a; Young *et al.*, 2013a). Durante a meiose, cada espermatócito primário (composto por 46 cromossomas, cada um com duas cromátides), através da primeira divisão meiótica, dá origem a dois espermatócitos secundários (23 cromossomas com duas cromátides) que, por sua vez, sofrem a segunda divisão meiótica e se dividem em quatro espermátides (23 cromossomas com uma cromátide) (Figura 3) (Sherwood, 2010; Tate, 2012a).

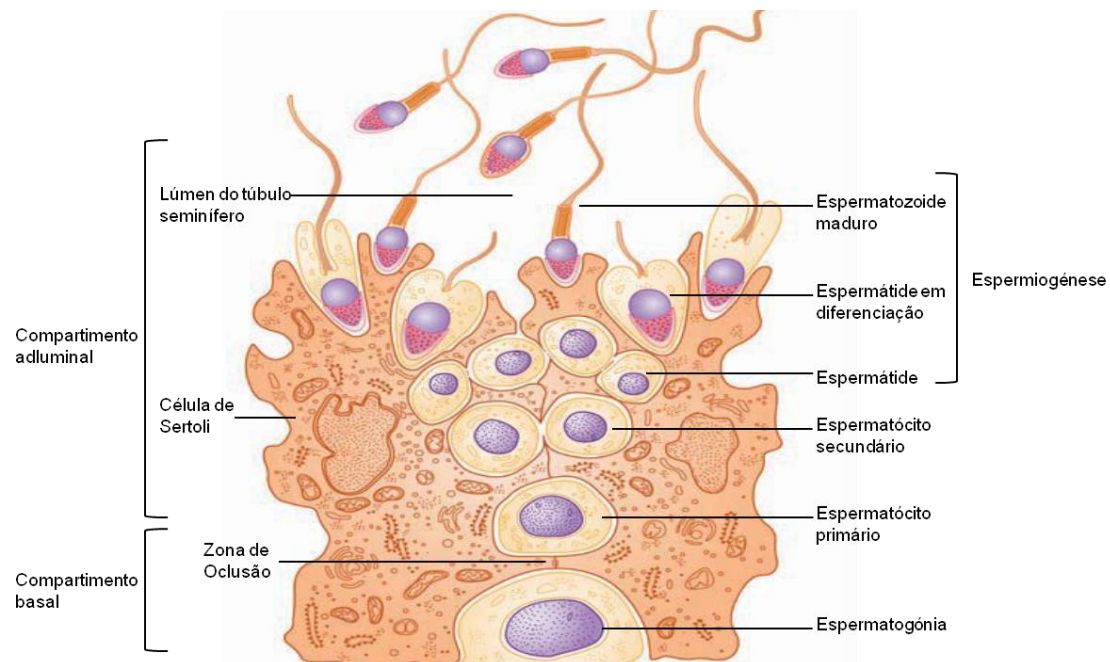


Fig. 3 – Relação das células de Sertoli com as células da linha germinativa em desenvolvimento. A figura representa a parede do túbulo seminífero. De notar que cada espermatócito primário dá origem a quatro espermatozoides. Adaptado de Sherwood (2010).

A fase final da espermatogénese, designada por espermiogénese, consiste na diferenciação de espermátides em células altamente especializadas, os espermatozoides. Neste processo, apesar de não ocorrerem mais divisões celulares, estão envolvidas grandes alterações a nível estrutural, de modo a facilitar a fecundação por parte do espermatozoide. A espermiogénese compreende, então, variadas etapas que vão levar à distinção das 3 partes

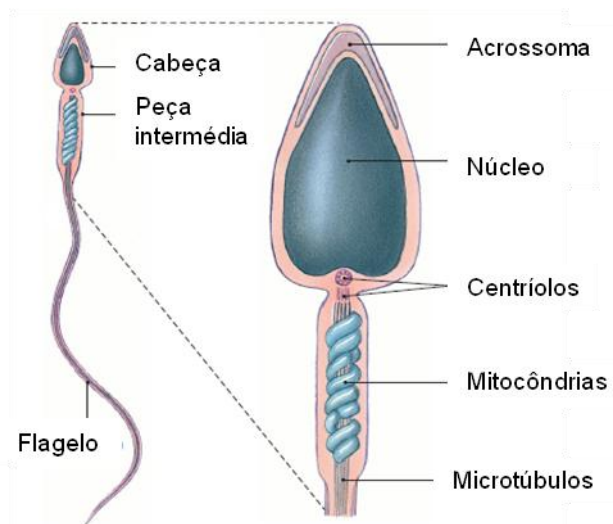


Fig. 4 – Espermatozoide maduro. Um espermatozoide é constituído por uma cabeça composta pelo núcleo e recoberta com uma vesícula com enzimas, o acrossoma, por uma peça intermédia com mitocôndrias e por um flagelo formado por microtúbulos. Adaptado de Silverthorn (2010).

constituintes do espermatozoide: a cabeça, a peça intermédia e o flagelo (Figura 4) (Vander *et al.*, 2001; Sherwood, 2010). A cabeça do espermatozoide consiste maioritariamente no núcleo, que resulta de um processo de condensação e alongamento e é composto pela informação genética (Vander *et al.*, 2001; Junqueira e Carneiro, 2008a). A extremidade anterior do núcleo é coberta pelo acrossoma, formado pela fusão de vesículas provenientes do complexo de Golgi, que contém enzimas hidrolíticas libertadas durante a fecundação e essenciais para a penetração no ovócito (Sherwood, 2010; Tate, 2012a; Young *et al.*, 2013a). Por outro lado, a extremidade posterior do núcleo é ocupada por centríolos, que migram para esta zona e que se alinham paralelamente ao eixo longitudinal do núcleo de modo a alongarem e formarem o flagelo. Esta estrutura longa é constituída pelo axonema, que consiste em nove dupletos de microtúbulos e um duplete central rodeados por fibrilas com proteínas contráteis, capazes de fornecer um movimento em forma de chicote ao espermatozoide (Vander *et al.*, 2001; Junqueira e Carneiro, 2008a; Young *et al.*, 2013a). Este movimento só é possível devido à presença de mitocôndrias a rodear as fibrilas na zona da peça intermédia, que geram energia através da produção de ATP (Figura 4). O citoplasma em excesso é ainda fagocitado pelas células de Sertoli, obtendo-se, no final da espermatogénese, espermatozoides dispostos à volta do lúmen dos túbulos seminíferos com as caudas direcionadas para o centro do lúmen (Tate, 2012a; Young *et al.*, 2013a).

Ao longo das divisões celulares que ocorrem, as células da linha germinativa que se vão formando não se separam completamente, permanecendo unidas por pontes citoplasmáticas, apenas quebradas no momento da libertação dos espermatozoides para o lúmen do túbulo seminífero. Estas ligações são importantes devido ao facto do cromossoma X conter genes que codificam produtos celulares essenciais para a espermatogénese. Caso não acontecessem estas trocas de citoplasma, as células da linha germinativa portadoras do cromossoma Y não seriam capazes de sobreviver e de se desenvolver (Junqueira e Carneiro, 2008a; Sherwood, 2010; Young *et al.*, 2013a).

Outro aspeto relevante para a sobrevivência das células da linha germinativa em desenvolvimento é a presença de células de Sertoli, células epiteliais de grande tamanho que se encontram lado a lado e que se estendem desde a superfície exterior do túbulo até ao lúmen (Sherwood, 2010; Tate, 2012a). As células de Sertoli adjacentes ligam-se e dão origem a zonas de oclusão que, desta forma, criam um anel contínuo em torno da circunferência exterior do túbulo seminífero, contribuindo para a divisão desta estrutura em dois compartimentos, já mencionados anteriormente – basal e adluminal. O compartimento basal, entre a membrana basal e as zonas de oclusão, é composto maioritariamente por espermatogónias, enquanto o compartimento adluminal, que começa nas zonas de oclusão e engloba o lúmen, recebe espermátócitos primários resultantes das divisões mitóticas e que migram para esta zona e se associam intimamente com as células de Sertoli (Figura 3) (Vander *et al.*, 2001; Sherwood, 2010).

As células de Sertoli desempenham, então, as seguintes funções fundamentais para a espermatogénese:

1. As zonas de oclusão formam a barreira hematotesticular, que impede a passagem de substâncias provenientes do sangue para o interior dos túbulos seminíferos, tais como toxinas e anticorpos contra os gâmetas (células diferentes das células somáticas a nível de antigénios), evitando uma resposta autoimune por parte do sistema imunitário e garantindo as condições adequadas para o desenvolvimento destas células (Vander *et al.*, 2001; Junqueira e Carneiro, 2008a; Young *et al.*, 2013a).
2. Devido ao isolamento das células da linha germinativa, as células de Sertoli são as responsáveis pela sua nutrição e sustentação (Silverthorn, 2010).
3. As células de Sertoli desempenham uma importante função fagocitária, tanto na remoção do excesso de citoplasma aquando da espermiogénese,

bem como na destruição de células germinativas anormais incapazes de completar a espermatogénese (Sherwood, 2010).

4. As células de Sertoli são responsáveis pela secreção contínua de um fluído para o lúmen do túbulo, o qual transporta os espermatozoides formados até ao epidídimo e sucessivos ductos genitais (Junqueira e Carneiro, 2008a).
5. Um dos componentes segregados pelas células de Sertoli é a Proteína de Ligação de Androgénios (ABP – *Androgen-binding Protein*), uma proteína que, tal como o nome indica, se liga aos androgénios, mais propriamente à testosterona. Esta ligação leva a que seja mantida uma elevada concentração de testosterona no lúmen, essencial para a produção e maturação das células espermáticas (Vander *et al.*, 2001; Young *et al.*, 2013a).
6. Estas células atuam como intermediárias entre as células da linha germinativa e as hormonas – a FSH originada pela hipófise e a testosterona proveniente das células de Leydig – que levam à libertação de agentes parácrinos que estimulam a espermatogénese. Adicionalmente, as próprias células de Sertoli libertam outra hormona, a inibina, que atua por *feedback* negativo na produção de FSH (Vander *et al.*, 2001; Sherwood, 2010).
7. Durante o desenvolvimento fetal, as células de Sertoli segregam também o fator inibidor de Muller, de modo a promover a regressão dos canais de Muller nos fetos do sexo masculino e induzir o desenvolvimento dos canais de Wolff (Junqueira e Carneiro, 2008a; Sherwood, 2010).

Todo o processo de espermatogénese, desde o início da mitose nas espermatogónias até à libertação dos espermatozoides, dura cerca de 64 dias, a uma taxa média de produção de 200 milhões de espermatozoides por dia (Silverthorn, 2010).

1.2.2. Controlo Hormonal

As células neuroendócrinas do hipotálamo produzem GnRH que vai atuar na hipófise anterior e estimular a secreção de duas hormonas gonadotróficas, a LH e a FSH, para a corrente sanguínea (Tate, 2012a). Estas duas hormonas vão atuar nos testículos, havendo uma clara separação das ações da FSH e da LH nas gónadas masculinas. A FSH tem como alvo as células de Sertoli, de modo a estimular a secreção de agentes parácrinos essenciais para a espermatogénese, como descrito anteriormente. Por sua vez, a LH liga-se aos seus recetores nas células de Leydig e

induz a produção de testosterona. Para além de todos os efeitos desta hormona a nível sistémico, a testosterona atua também a nível local como agente parácrino, movendo-se dos espaços intersticiais para os túbulos seminíferos, onde se vai ligar às células de Sertoli e promover a espermatogénese. Apesar de não haver um efeito direto da LH sobre os túbulos seminíferos, a sua ação indireta é fundamental, uma vez que a testosterona libertada pela ação da LH é indispensável para a produção de espermatozoides (Figura 5) (Vander *et al.*, 2001).

O sistema de controlo por *feedback* da função testicular é maioritariamente regulado por dois fatores: testosterona e inibina (Figura 5). A testosterona atua por *feedback* negativo na inibição da LH de duas maneiras, sendo o efeito predominante na diminuição da GnRH libertada pelo hipotálamo que, por sua vez, diminui, de forma indireta, a libertação tanto de LH como de FSH pela hipófise anterior. Adicionalmente, atua de forma direta na hipófise anterior, causando uma diminuição seletiva na secreção de LH. Por outro lado, a inibina, segregada pelas células de Sertoli, atua diretamente na hipófise anterior, levando à inibição seletiva da secreção de FSH. Apesar de todas estas complexidades, as quantidades totais de GnRH, LH, FSH, testosterona e inibina libertadas e de espermatozoides produzidos são relativamente constantes no dia-a-dia de um homem adulto (Vander *et al.*, 2001).

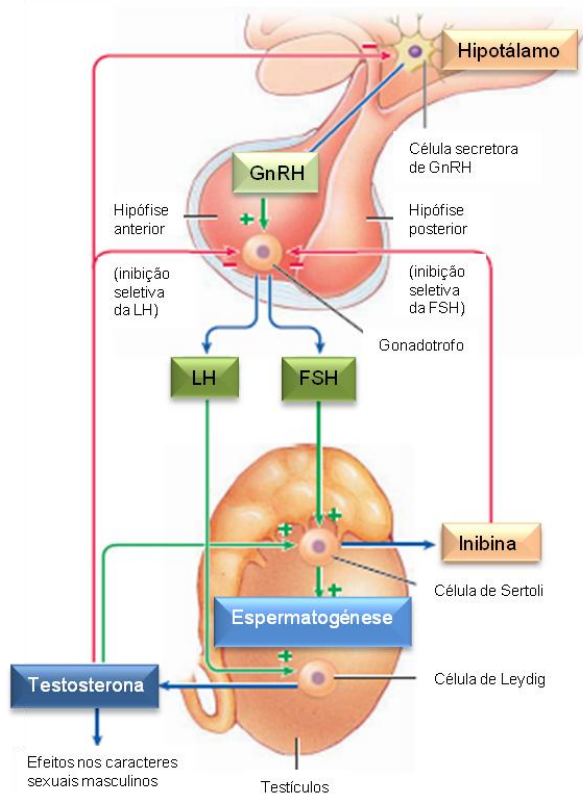


Fig. 5 – Controlo hormonal do sistema reprodutor masculino. De notar que a FSH atua apenas nas células de Sertoli, enquanto a LH atua apenas nas células de Leydig. A secreção de FSH é inibida maioritariamente pela inibina, uma hormona segregada pelas células de Sertoli. A secreção de LH é inibida maioritariamente pela testosterona, a hormona segregada pelas células de Leydig. A testosterona, atuando localmente, é essencial para a espermatogénese. Adaptado de Sherwood (2010).

Para além da ação parácrina essencial nos testículos na promoção da espermatogénese e dos efeitos de *feedback* negativo sobre o hipotálamo e a hipófise, a testosterona é responsável por muitos outros efeitos (Vander *et al.*, 2001). Antes do

nascimento, ocorre a produção de testosterona pelas células de Leydig, estimulada pela hCG, uma hormona segregada pela placenta e que é estruturalmente semelhante à LH. A presença de testosterona nesta fase é responsável pela masculinização dos ductos genitais e da genitália externa bem como pela descida dos testículos para o escroto. Após o nascimento, deixa de haver uma fonte de estimulação e os testículos ficam num estado de dormência até à puberdade, que ocorre por volta dos 12-14 anos nos homens (Sherwood, 2010; Tate, 2012a).

A puberdade é iniciada por um aumento da atividade da GnRH, sendo caracterizada como um período de maturação do sistema reprodutor, culminando na maturidade sexual e na capacidade de reprodução do homem (Sherwood, 2010). Durante esta fase, a testosterona promove o desenvolvimento dos caracteres sexuais masculinos primários, que incluem a capacidade de produzir espermatozoides e o aumento e diferenciação da genitália masculina. A testosterona também estimula o desenvolvimento dos caracteres sexuais masculinos secundários, englobando mudanças estruturais e comportamentais, tais como os padrões de distribuição e crescimento do pelo, a textura da pele, alterações na laringe, aumento do metabolismo e desenvolvimento do músculo esquelético e dos ossos (Vander *et al.*, 2001; Tate, 2012a). Ao longo de toda a vida adulta, a secreção contínua de testosterona é responsável pela manutenção da estrutura da genitália masculina, das glândulas anexas, da espermatogénese e dos caracteres sexuais secundários, havendo uma diminuição gradual da eficiência testicular após os 45-50 anos de idade (Sherwood, 2010; Tate, 2012a).

1.3. Sistema Reprodutor Feminino

O sistema reprodutor feminino é muito mais complexo do que o sistema reprodutor masculino (Sherwood, 2010). Os ciclos de produção de gâmetas, as interações hormonais e as vias de regulação por *feedback* são integrantes de um dos mais complexos sistemas de controlo do corpo humano (Silverthorn, 2010).

O sistema reprodutor feminino pode ser dividido em três unidades estruturais: as gónadas, o trato genital e a genitália externa (Young *et al.*, 2013b). As gónadas femininas correspondem aos ovários, órgãos pares com uma forma elíptica e responsáveis pela produção de ovócitos, num processo designado por oogénese, e pela secreção de hormonas sexuais, o estrogénio e a progesterona (Sherwood, 2010; Silverthorn, 2010). Um grupo de ligamentos acoplado aos ovários é responsável pelo posicionamento e suporte destes órgãos na cavidade abdominal (Figura 6) (Tate, 2012a). Histologicamente, esta estrutura é coberta por epitélio germinativo, havendo imediatamente abaixo uma camada de tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea. A parte mais interna do ovário, correspondente ao córtex, é composta por vários folículos em diferentes estados de desenvolvimento distribuídos pelo estroma (Junqueira e Carneiro, 2008b; Silverthorn, 2010). Na parte mais interna, a medula, está presente tecido conjuntivo frouxo contendo vasos sanguíneos e linfáticos e também nervos (Tate, 2012a).

O trato genital é composto pelas trompas de Falópio, pelo útero e pela vagina (Figura 6). As trompas de Falópio, também conhecidas como ovidutos, encontram-se divididas em 4 partes diferentes a nível anatómico (Young *et al.*, 2013b). O infundíbulo é uma das extremidades da trompa, sendo a sua abertura em forma de funil e situada próxima do ovário, mas não fisicamente ligada a este. A rodear esta abertura estão as fímbrias, estruturas responsáveis por receber o ovócito libertado pelo ovário para a cavidade abdominal. Adjacente a esta zona localiza-se a ampola, caracterizada como a área mais longa e mais ampla da trompa, onde ocorre a fecundação (Tate, 2012a). Seguidamente, estão o istmo e a outra extremidade da trompa que faz a comunicação com o útero, designada por porção intramural (Young *et al.*, 2013b). Histologicamente, a parede da trompa é constituída por duas camadas de músculo liso rodeadas por uma camada serosa e com uma camada mucosa interna com um epitélio ciliado. Enquanto nas duas primeiras zonas predomina a camada mucosa, nas duas últimas é o músculo liso que se apresenta mais evidente (Junqueira e Carneiro, 2008b). As contrações peristálticas do músculo liso, juntamente com as secreções libertadas pela camada mucosa e com o movimento dos cílios, movem o ovócito (ou embrião em

desenvolvimento, no caso de ocorrer fecundação) ao longo das trompas em direção ao útero (Silverthorn, 2010; Young *et al.*, 2013b). Adicionalmente, as secreções desempenham funções nutritivas e protetoras em relação ao ovócito (Young *et al.*, 2013b).

O útero é um órgão em forma de pera invertida com cerca de 7 cm de comprimento e é dividido em três partes. A parte superior, onde entram as trompas, é designada por fundo, enquanto a parte principal do útero corresponde ao corpo, o local onde ocorre a implantação. A zona mais estreita e inferior, que faz a ligação entre a cavidade uterina e a vagina, é referente ao colo do útero, composto por glândulas mucosas cuja atividade varia ao longo do ciclo menstrual (Junqueira e Carneiro, 2008b; Tate, 2012a). A parede uterina é composta por três camadas. A camada exterior é denominada por perimétrio, formada por tecido conjuntivo (Tate, 2012a). Seguidamente encontra-se o miométrio, camada espessa de músculo liso de grande importância durante a gravidez na proteção do feto e também no momento do parto (Young *et al.*, 2013b). O endométrio é a camada mais interna e corresponde à mucosa uterina, podendo ser subdividido em duas camadas, basal e funcional (Figura 6) (Junqueira e Carneiro, 2008b). A espessura da camada funcional varia ao longo do ciclo menstrual por influência hormonal, havendo ciclos de proliferação e outros de degeneração, que resultam num processo conhecido por menstruação (Silverthorn, 2010). Adicionalmente, as secreções libertadas pelo endométrio criam o ambiente necessário para a implantação do zigoto e também para a sua nutrição (Young *et al.*, 2013b). De um modo geral, o útero é responsável pela implantação e manutenção do feto ao longo da gravidez, bem como pela sua expulsão no fim do tempo de gestação (Sherwood, 2010).

O canal que faz a ligação entre o útero e o exterior é a vagina, cuja parede, à semelhança das estruturas anteriores, consiste numa membrana interior mucosa e numa camada exterior muscular rodeadas por uma camada adventícia de tecido conjuntivo. A camada muscular é composta por músculo liso e contém fibras elásticas, fator importante para a expansão necessária na entrada do pénis durante a relação sexual e também durante o nascimento do feto (Tate, 2012a; Young *et al.*, 2013b). A membrana mucosa cria uma camada superficial protetora contra a ação de microrganismos patogénicos, através da manutenção do pH ácido da vagina. Para além disso, ocorre também a lubrificação deste canal, necessária durante a relação sexual (Junqueira e Carneiro, 2008b; Tate, 2012a).

De um modo simplificado, a genitália externa é composta pelo clitóris, pelos lábios maiores e pelos lábios menores, sendo estes últimos responsáveis pela proteção da abertura externa da vagina e da uretra (Sherwood, 2010). Os lábios maiores derivam do mesmo tecido embrionário que dá origem ao escroto no homem, enquanto os lábios menores e o clitóris são os homólogos femininos da uretra peniana e da glândula, respetivamente (Vander *et al.*, 2001; Silverthorn, 2010). No entanto, ao contrário do que acontece no aparelho reprodutor masculino, os ductos reprodutores e urinários encontram-se totalmente separados no aparelho reprodutor feminino (Vander *et al.*, 2001).

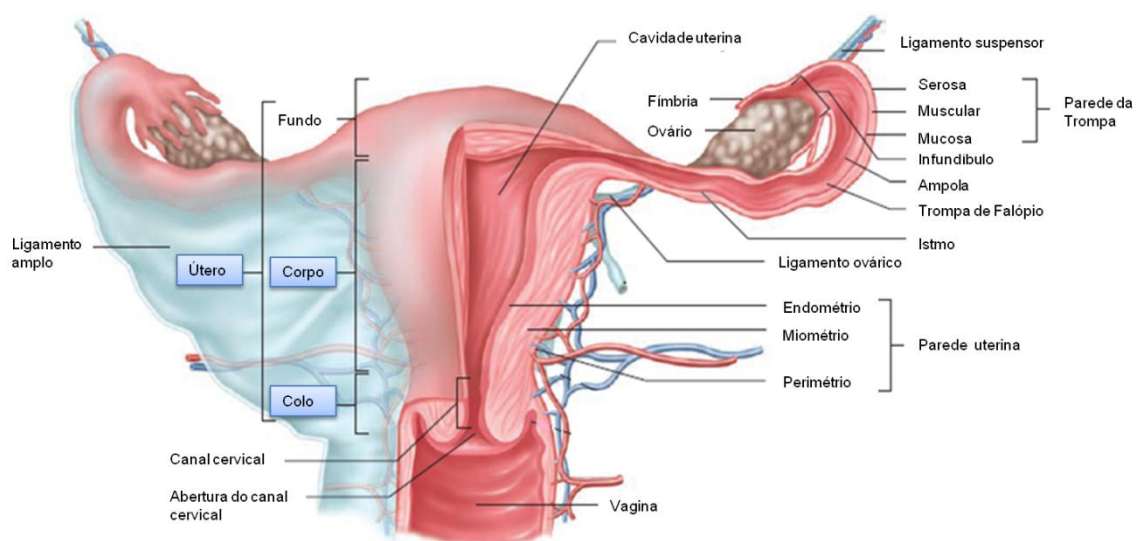


Fig. 6 – Organização anatómica do aparelho reprodutor feminino. A figura apresenta os ovários, as trompas, o útero e a vagina, bem como os ligamentos de apoio. As trompas, o útero e a vagina apresentam cortes transversais para demonstrar a anatomia interna. Adaptado de Tate (2012a).

Resumindo, as principais funções desempenhadas pelo sistema reprodutor feminino são 1) produção de ovócitos; 2) produção de hormonas; 3) receção dos espermatozoides; 4) transporte e fornecimento de um ambiente adequado aos gâmetas para ocorrência de fertilização; 5) manutenção e nutrição do feto em desenvolvimento; 6) expulsão do feto no momento do parto; e 7) nutrição do recém-nascido após o seu nascimento por produção de leite nas glândulas mamárias, um processo conhecido por lactação (Sherwood, 2010; Young *et al.*, 2013b).

1.3.1. Oogénese

A produção de gâmetas femininos, conhecida como oogénese, corresponde à formação de ovócitos, e contrasta em vários aspetos com a espermatogénese

(Sherwood, 2010). Este processo tem início na vida fetal onde, por volta do quinto mês de gestação, células germinativas primordiais, as oogónias, se dividem por mitose, dando origem a cerca de 6 a 7 milhões de oogónias. A partir deste momento, a proliferação mitótica pára, não havendo mais formação de células germinativas (Sherwood, 2010; Silverthorn, 2010). Ainda durante o desenvolvimento embrionário ocorre o início da primeira divisão meiótica, que pára em profase I e leva à passagem das oogónias a ovócitos primários. Por ter ocorrido replicação do DNA, estas células contém 46 cromossomas, cada um deles com duas cromátides (Vander *et al.*, 2001; Tate, 2012a). Os ovócitos primários constituem, assim, o *pool* de gâmetas femininos no momento do nascimento, encontrando-se cerca de 2 milhões destas células disponíveis nos ovários. Até à puberdade, ocorre a redução destes valores para 300 a 400 mil, uma vez que todos os ovócitos que retomem o desenvolvimento sem a presença de hormonas, ou seja, antes da puberdade, morrem por um processo degenerativo chamado atresia (Junqueira e Carneiro, 2008b; Tate, 2012a).

Os ovócitos primários permanecem no estado de paragem meiótica durante anos, até estarem preparados para se voltarem a dividir, a partir da puberdade. Mesmo antes da ovulação, o ovócito primário retoma a divisão e completa a primeira divisão meiótica, criando duas células-filhas possuindo 23 cromossomas com duas cromátides cada. Contudo, uma das células-filhas, o ovócito secundário, retém a maioria do citoplasma rico em nutrientes e organelos importantes para a sua viabilidade, enquanto a outra, designada por 1º glóbulo polar (GP), apresenta uma célula não funcional de pequeno tamanho. O ovócito secundário inicia a segunda divisão meiótica, parando em metafase II (MII) (Sherwood, 2010; Tate, 2012a). A conclusão desta divisão ocorre apenas no caso de fertilização. Para tal, o ovário tem de libertar o ovócito secundário num processo designado ovulação, de modo a ocorrer a penetração por parte de um espermatozoide (Silverthorn, 2010). Como resultado da segunda divisão meiótica, as células-filhas recebem 23 cromossomas com uma cromátide cada. À semelhança da divisão anterior, forma-se uma célula, designada pré-zigoto, que contém a maioria do citoplasma, e outra célula, o 2º GP, também de pequeno tamanho e não funcional (Vander *et al.*, 2001). Caso a fertilização não ocorra, a meiose nunca se completa e o ovócito acaba por se desintegrar. A oogénese é, então, um processo que origina apenas uma célula gamética a partir de um ovócito primário (Silverthorn, 2010).

1.3.2. Desenvolvimento Folicular

Após o início da primeira divisão meiótica, o ovócito primário é coberto por uma camada de células foliculares achatadas, designadas por células da granulosa, constituindo deste modo o folículo primordial (Young *et al.*, 2013b). Os folículos primordiais são convertidos em folículos primários quando o ovócito aumenta de tamanho e as células da granulosa se dividem por mitose, aumentando em tamanho e formando uma única camada de células cuboides (Junqueira e Carneiro, 2008b). Subsequentemente, uma camada homogênea densa de glicoproteínas e proteoglicanos, a zona pelúcida (ZP), desenvolve-se entre o ovócito e as células da granulosa, estruturas que contribuem para

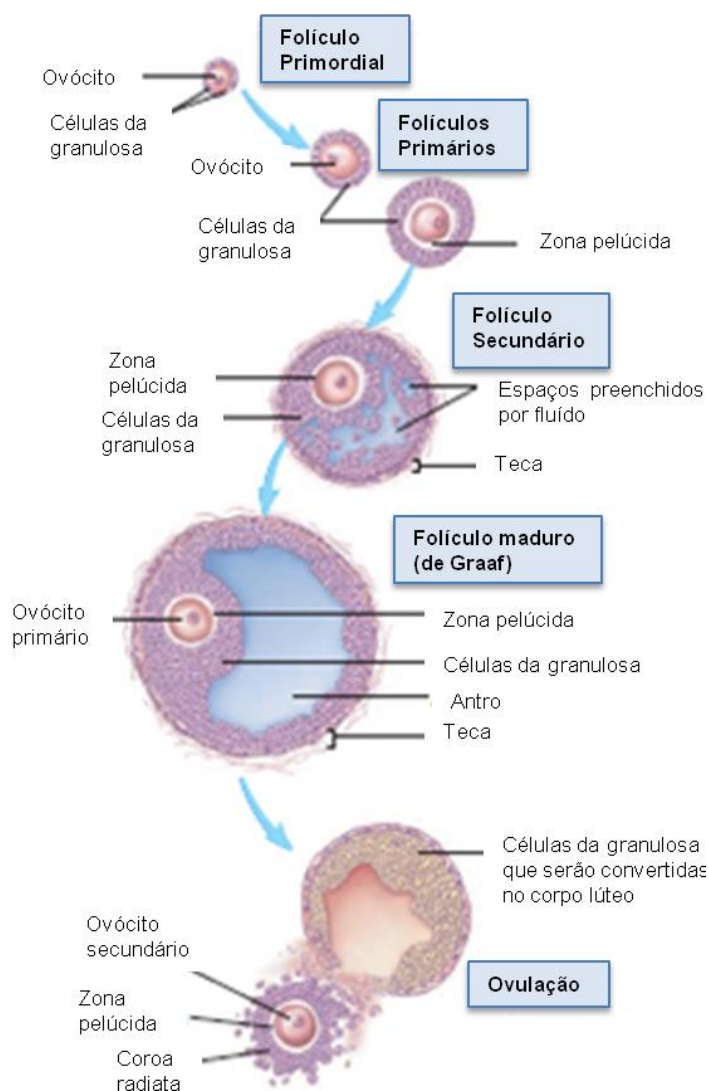


Fig. 7 – Desenvolvimento folicular e ovocitário. Tipos de folículos ovários, desde o primordial até ao maduro. Adaptado de Tate (2012a).

a sua formação. As células da granulosa continuam a proliferar, dando origem a várias camadas, havendo ainda o desenvolvimento de uma camada externa, a teca. Estas modificações culminam na formação do folículo secundário pré-antral (Figura 7) (Sherwood, 2010; Young *et al.*, 2013b).

Devido à influência hormonal, as células foliculares libertam secreções que formam pequenos espaços preenchidos por fluido e que se unem para formar uma cavidade, o antro folicular (Sherwood, 2010). Na zona periférica do folículo, a teca divide-se em duas camadas, as tecas interna e externa. Após as alterações descritas surge o folículo antral (Junqueira e Carneiro, 2008b). Ao longo do desenvolvimento, um dos folículos antrais cresce muito mais do que os outros, tornando-se dominante e originando o folículo maduro ou de Graaf (Sherwood, 2010). Este folículo é

caracterizado por um antro que ocupa a maioria do espaço disponível. No seu interior, encontra-se um ovócito em posição excêntrica – que retoma a divisão meiótica – rodeado pela ZP e por uma camada de células da granulosa, que constituem a coroa radiata (Figura 7) (Young *et al.*, 2013b). Esta estrutura mantém-se presa à parede do folículo por um pequeno espessamento de células da granulosa, o *cumulus oophorus* (Junqueira e Carneiro, 2008b). O aumento da pressão criada pelo líquido folicular, juntamente com enzimas libertadas pelas células foliculares, leva à ovulação, caracterizada como a rutura da parede do ovário e consequente libertação do complexo *cumulus*-ovócito (CCO) para a entrada da trompa (Sherwood, 2010). Após a ovulação, as células que restam do folículo são transformadas no corpo lúteo (ou corpo amarelo). Caso não ocorra gravidez, o corpo lúteo degenera após 10 a 12 dias, formando o corpo albicans (ou corpo branco) que acaba por desaparecer (Tate, 2012a).

A partir do momento em que um folículo inicia o seu desenvolvimento, só tem dois destinos possíveis: ou alcança a maturidade e sofre ovulação ou então degenera por atresia. Até à puberdade, todos os folículos que se desenvolvem sofrem atresia ainda nas primeiras fases devido à ausência de hormonas, tal como descrito anteriormente no caso dos ovócitos. Dos cerca de 300 a 400 mil ovócitos disponíveis na puberdade, apenas 400 irão ser ovulados, ou seja, 99,97% sofrem atresia. Quando a mulher atinge a menopausa restam apenas alguns folículos primários, ocorrendo a cessação da capacidade reprodutiva da mulher (Sherwood, 2010).

1.3.3. Ciclo Menstrual e Regulação Hormonal

O aparelho reprodutor feminino produz gâmetas em ciclos mensais, numa média de 28 dias. Estes ciclos são designados por ciclos menstruais, uma vez que são marcados por um período de descarga sanguínea via útero conhecida por menstruação, que marca o dia 1 do ciclo (Figura 8) (Silverthorn, 2010).

O ciclo menstrual consiste em mudanças periódicas que ocorrem no ovário – alterações nos folículos para a produção de ovócitos secundários – e no útero – preparação do endométrio para a implantação – de uma mulher sexualmente madura, que dividem o ciclo menstrual em ciclo ovárico e ciclo uterino, respetivamente (Figura 8) (Silverthorn, 2010; Tate, 2012a). À semelhança do que acontece no aparelho reprodutor masculino, o ciclo menstrual é regulado por várias hormonas: a GnRH libertada pelo hipotálamo vai atuar sobre a hipófise anterior e levar à libertação de

FSH e LH que, por sua vez, vão atingir os ovários e levar a que estas gónadas produzam estrogénio, progesterona e ainda inibina (Silverthorn, 2010).

1.3.3.1. Ciclo Ovário

O ovário possui duas estruturas capazes de produzir hormonas: as células da granulosa, que segregam estrogénio durante a primeira metade do ciclo, e o corpo lúteo, que liberta progesterona e também algum estrogénio na segunda metade do ciclo, dividindo o ciclo ovário em fase folicular e fase lútea, respetivamente (Figura 8) (Vander *et al.*, 2001).

A **fase folicular** inicia-se com o desenvolvimento de folículos pré-antrais selecionados pelo aumento da FSH no final do ciclo anterior (Vander *et al.*, 2001). As gonadotrofinas, produzidas em baixa quantidade sob ação da GnRH, são ambas necessárias para a produção de estrogénios, mas atuam em diferentes células-alvo (Sherwood, 2010). A LH estimula as células da teca a produzirem androgénios a partir do colesterol, que se difundem para as células da granulosa onde, por ação da FSH, são convertidos em estrogénios (Tate, 2012a). A FSH estimula ainda a formação e crescimento do antro e a proliferação de células da granulosa. Adicionalmente, ao longo do desenvolvimento do folículo, há produção de mais estrogénio, uma vez que cada vez mais células da granulosa são também produzidas, acabando esta hormona por desempenhar uma ação parácrina (Vander *et al.*, 2001).

O aumento dos níveis de estrogénio, juntamente com a produção de inibina pelos folículos, cria um mecanismo de *feedback* negativo (Tate, 2012a). O estrogénio atua na inibição das gonadotrofinas de duas maneiras, sendo o efeito predominante na hipófise anterior, que leva à diminuição direta da FSH. Atua ainda na diminuição da GnRH libertada pelo hipotálamo que, por sua vez, provoca um decréscimo na secreção de FSH e LH (em menor quantidade). A inibina inibe preferencialmente a FSH ao atuar na hipófise anterior (Sherwood, 2010). O decréscimo nos valores de FSH provoca a atresia de todos os folículos em desenvolvimento, excetuando o folículo mais maduro de todos, o chamado folículo dominante. Este folículo não sofre atresia devido ao facto de possuir uma maior sensibilidade à FSH por aumento dos recetores para esta hormona nas células da granulosa, bem como pelo surgimento de recetores para a LH nestas células, passando a ser estimulado por ambas as hormonas gonadotróficas (Vander *et al.*, 2001).

Ao ser atingido o final da fase folicular, conhecido como período pré-ovulatório, os níveis de estrogénios atingem um pico, passando a desempenhar um *feedback* positivo que leva a que, juntamente com a progesterona que começa a ser formada, haja um pico de LH 36 horas antes da ovulação. Este pico é essencial para o amadurecimento do ovócito e para a ovulação, visto que promove a secreção de enzimas proteolíticas (como a colagenase) e de prostaglandinas, que provocam a rutura da parede do folículo e contrações nas células mioepiteliais, respetivamente, resultando na saída do CCO do ovário. Contribui ainda para a luteinização das células do folículo ovulado (Silverthorn, 2010; Tate, 2012a).

Após a ovulação, 18 horas depois do pico de LH, os níveis de estrogénio diminuem consideravelmente e inicia-se a **fase lútea**. A luteinização é caracterizada por alterações bioquímicas e morfológicas nas células que permanecem no ovário e que levam à formação do corpo lúteo, responsável pela produção de progesterona e também de estrogénio (em menor quantidade), sob a influência da LH (Silverthorn, 2010). O aumento dos níveis de progesterona e estrogénio, que atingem o nível máximo ao 21º dia do ciclo, levam a um efeito de *feedback* negativo no hipotálamo e na hipófise anterior, levando à diminuição dos níveis de GnRH, FSH e LH (Sherwood, 2010; Tate, 2012a). Adicionalmente, a inibina produzida pelo corpo lúteo tem também uma ação de *feedback* negativo sob a FSH (Vander *et al.*, 2001). A inibição sob as hormonas gonadotróficas impede que haja nova maturação folicular nesta fase (Sherwood, 2010).

Ao longo da fase lútea, o corpo lúteo liberta hormonas que preparam o aparelho reprodutor feminino para uma possível gravidez (Silverthorn, 2010). Se ocorrer fertilização e implantação, a placenta que se desenvolve segrega uma hormona com uma ação semelhante à LH, a gonadotrofina coriónica humana (hCG – *human chorionic gonadotropin*), que impede que o corpo lúteo degenera. Como consequência, os níveis de estrogénio e progesterona não baixam e a menstruação não ocorre (Tate, 2012a). Por outro lado, caso não ocorra implantação, o corpo lúteo, duas semanas após a sua formação, degenera devido à diminuição dos níveis de LH em circulação e dá origem ao corpo albicans. Esta degeneração provoca uma queda nos níveis de progesterona e estrogénios, levando à remoção dos efeitos inibitórios e a um novo aumento da secreção das gonadotrofinas, por volta do 26º dia do ciclo, que culmina com a indução do desenvolvimento e maturação de um novo conjunto de folículos, que irão iniciar uma nova fase folicular e, conseqüentemente, um novo ciclo menstrual (Figura 8) (Sherwood, 2010).

1.3.3.2. Ciclo Uterino

As variações cíclicas do estrogénio e da progesterona produzidas durante o ciclo ovárico vão provocar alterações significativas ao nível do útero, dando origem ao ciclo uterino. As duas camadas principais do útero, o miométrio e o endométrio, são os grandes alvos das hormonas ováricas, cuja ação divide o ciclo uterino em três fases: fase menstrual, fase proliferativa e fase secretora (Sherwood, 2010). A fase folicular ovárica coincide com as fases menstrual e proliferativa uterinas, enquanto a fase lútea do ovário corresponde à fase secretora uterina (Figura 8) (Vander *et al.*, 2001).

A **fase menstrual** tem a duração de cerca de 5 a 7 dias e é caracterizada pela degeneração e descamação da camada funcional do endométrio, altamente vascularizada e rica em nutrientes, resultando no fluxo menstrual. A queda nos níveis de estrogénio e progesterona, por degeneração do corpo lúteo, levam à vasoconstrição dos vasos sanguíneos uterinos, diminuindo o fornecimento de oxigénio e nutrientes às células do endométrio (Vander *et al.*, 2001). Esta privação resulta, então, na morte celular e descamação do endométrio, à exceção da camada basal, responsável pela regeneração do endométrio nas fases seguintes. Adicionalmente, ocorrem ainda contrações rítmicas do miométrio, de modo a expelir o sangue e os fragmentos de endométrio presentes na cavidade uterina através da vagina (Sherwood, 2010). Tanto a vasoconstrição como as contrações uterinas são reguladas pelas prostaglandinas produzidas pelo endométrio em resposta à queda das hormonas ováricas (Vander *et al.*, 2001). Esta sucessão de eventos só ocorre caso não se verifique fertilização do ovócito e implantação do embrião (Junqueira e Carneiro, 2008b). Caso haja gravidez, tal como já foi explicado, os valores das hormonas ováricas mantêm-se, impedindo a menstruação (Tate, 2012a).

Após a fase menstrual, o endométrio está pronto para iniciar uma nova fase de divisão e reconstrução, designada por **fase proliferativa**, que tem a duração média de 10 dias entre o fim da menstruação e a ovulação (Junqueira e Carneiro, 2008b). Quando a menstruação termina, o endométrio possui apenas cerca de 0,5 mm de espessura. O início da fase proliferativa coincide com o desenvolvimento folicular que dá origem a grandes concentrações de estrogénios em circulação (Figura 8). É esta hormona ovárica que estimula a reparação e proliferação das células epiteliais, glândulas e vasos sanguíneos no endométrio, resultando num aumento de espessura para cerca de 5 mm (Sherwood, 2010). Estas alterações fornecem nutrientes e oxigénio ao endométrio, preparando-o para uma possível gravidez. Adicionalmente, o estrogénio induz a síntese de recetores para a progesterona nas células uterinas e

também provoca contrações do miométrio que favorecem o movimento dos espermatozoides ao longo da cavidade uterina. Para além disso, leva ainda à formação de um muco cervical aquoso e abundante, de modo a facilitar a passagem dos espermatozoides ao longo do colo do útero (Silverthorn, 2010).

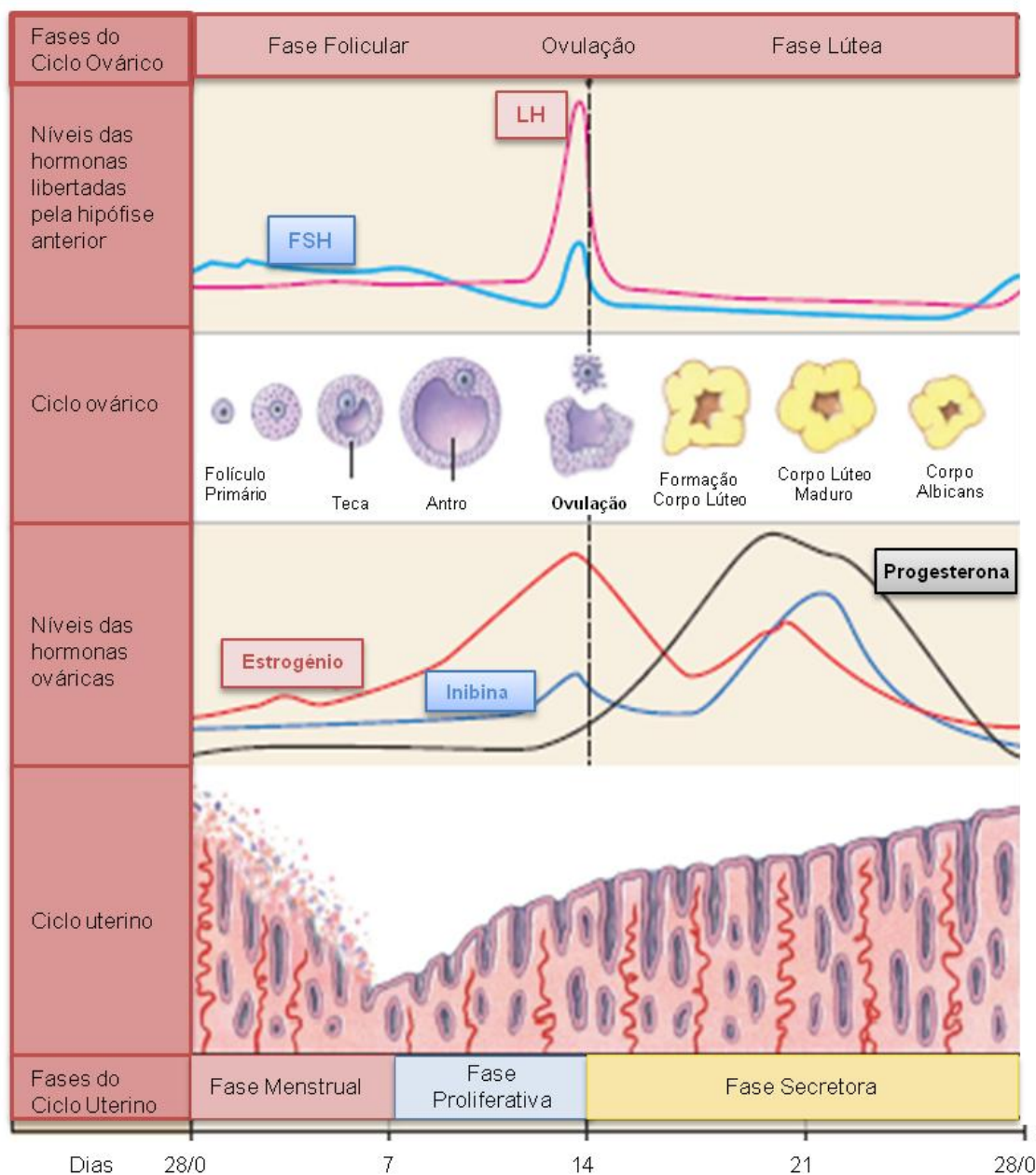


Fig. 8 – Ciclo Menstrual. Relação entre as alterações no ciclo ovárico e no ciclo uterino durante o ciclo menstrual de 28 dias. Adaptado de Silverthorn (2010).

A **fase secretora** tem início após a ovulação e dura cerca de 14 dias (Figura 8) (Young *et al.*, 2013b). Sob a influência da progesterona produzida pelo corpo lúteo (formado na fase lútea do ciclo ovárico), o endométrio sofre um aumento de espessura e ocorrem alterações a nível vascular e secretor, desenvolvendo um ambiente

favorável para a implantação (Sherwood, 2010). Deste modo, os vasos sanguíneos aumentam em número e tamanho e as glândulas tornam-se altamente secretoras de substâncias ricas em glicogénio e lípidos, transformando o estroma uterino em fonte de nutrição para o embrião (Vander *et al.*, 2001; Tate, 2012a). Outro papel importante da progesterona é inibir as contrações musculares do miométrio, que poderiam interferir com a implantação do embrião (Junqueira e Carneiro, 2008b). Para além disso, a progesterona causa ainda o espessamento do muco cervical, formando uma espécie de tampão que previne a passagem tanto de bactérias como de espermatozoides para o útero, protegendo o embrião em desenvolvimento no caso de gravidez (Silverthorn, 2010). Se não ocorrer fertilização e implantação, o corpo lúteo degenera e inicia-se um novo ciclo menstrual (Sherwood, 2010).

À semelhança do que acontece no aparelho reprodutor masculino, as hormonas sexuais, para além de interferirem em todo o processo reprodutivo, são também responsáveis pela manifestação dos caracteres sexuais. O estrogénio controla o desenvolvimento dos caracteres sexuais primários, mas também dos caracteres sexuais secundários mais evidentes: genitália externa, desenvolvimento dos seios e o padrão de distribuição de gordura. Outros traços sexuais secundários são, no entanto, controlados por androgénios produzidos no córtex da supra-renal: crescimento dos pelos púbicos e axilares (Vander *et al.*, 2001; Silverthorn, 2010).

1.4. Transporte de Gâmetas e Fertilização

A reprodução no Homem implica a união dos gâmetas masculino e feminino. Para tal, é necessário a deposição de sémen na vagina através do ato sexual, também conhecido como relação sexual, coito ou copulação. Durante a relação sexual, ocorre a ereção, na qual o pénis se torna mais rígido e dilata de modo a permitir a entrada na vagina, e a ejaculação, caracterizada pela libertação do líquido seminal dos ductos masculinos para o trato genital feminino (Sherwood, 2010).

Após deposição dos espermatozoides na vagina no momento da ejaculação, estes têm de percorrer o caminho desde o canal cervical, passando pelo útero e pelas trompas de Falópio, até atingirem a ampola. A execução deste percurso só é possível graças à capacidade de movimentação dos espermatozoides e às contrações do músculo liso dos canais genitais femininos provocadas pelos altos níveis de estrogénio

mesmo antes da ovulação, pela oxicitina libertada pela hipófise posterior e ainda pelas prostaglandinas contidas no líquido seminal (Sherwood, 2010; Tate, 2012a).

O primeiro e também maior obstáculo no percurso dos espermatozoides é o canal cervical, onde ocorre uma redução da ordem das centenas de milhões para apenas algumas centenas de espermatozoides a atingirem a trompa (Silverthorn, 2010). Tal como mencionado anteriormente, o muco cervical torna-se aquoso apenas quando os níveis de estrogénio são altos, permitindo a passagem dos gâmetas masculinos (Vander *et al.*, 2001). Esta passagem é bastante importante, pois permite que os espermatozoides completem o seu processo de maturação, chamado de **capacitação**, onde adquirem a capacidade de fecundação do ovócito (Silverthorn, 2010). Ocorre, então, a remoção e a modificação de proteínas da membrana plasmática, que leva à exposição de recetores na cabeça do espermatozoide importantes para a fecundação, bem como à diminuição da estabilidade das membranas do espermatozoide e do acrossoma (Tate, 2012a). Para além disso, adquirem ainda um aumento da velocidade e da amplitude do movimento flagelar, designada por **hipermotilidade** (Speroff, 1999a).

No momento da ovulação, verifica-se a libertação do ovócito para a cavidade peritoneal, de modo a ser captado pelas fímbrias. No interior da trompa, é impulsionado por movimentos peristálticos e ciliares até à ampola (Vander *et al.*, 2001). Contudo, a fertilização deve ser até 24 horas após ovulação, período no qual o ovócito é viável. O espermatozoide, por outro lado, pode sobreviver entre 48 horas até 5 dias no trato genital feminino (Sherwood, 2010). Para a fertilização ser bem-sucedida, a relação sexual tem de ocorrer entre 5 dias antes até 1 dia depois da ovulação (Tate, 2012a). Caso isto não se verifique, o ovócito degenera, sendo posteriormente fagocitado (Sherwood, 2010). O encontro ao acaso dos dois gâmetas é possivelmente mediado por quimiotaxia, através de substâncias libertadas pelo CCO (Silverthorn, 2010).

A **fertilização** pode ser dividida em duas partes: (1) penetração do espermatozoide nas camadas que rodeiam o ovócito e (2) contacto e fusão do ovócito e do espermatozoide. Na primeira parte, o espermatozoide penetra através da coroa radiata graças à hipermotilidade adquirida anteriormente (Tate, 2012b). Após a passagem destas camadas de células, o espermatozoide atinge a ZP e sucede-se a ligação de recetores da membrana plasmática do espermatozoide – a proteína fertilina – a recetores na camada externa da ZP do ovócito – a glicoproteína ZP3 (Sherwood, 2010). Esta ligação desencadeia a chamada **reação acrossómica**, que leva à quebra

da membrana do acrossoma e conseqüente libertação e ativação de enzimas digestivas nele contidas, digerindo a ZP localmente e permitindo ao espermatozoide o avanço ao longo deste revestimento (Vander *et al.*, 2001; Tate, 2012b). Uma das enzimas libertadas é a hialuronidase, responsável pela digestão das ligações entre as células da coroa radiata (Guyton e Hall, 2006). Outra das enzimas é a acrosina, que leva à digestão da ZP, permitindo o contacto do espermatozoide com a membrana do ovócito e, conseqüentemente, o início da segunda parte da fertilização (Speroff, 1999a).

O contacto da membrana da cabeça do espermatozoide com a membrana do ovócito provoca a fusão de ambas as membranas, promovendo a entrada do espermatozoide no citoplasma do ovócito (Figura 9) (Silverthorn, 2010). Durante este processo, todo o espermatozoide, incluindo a cauda, entra no ovócito (Ramalho-Santos, 2011). Esta fusão desencadeia o aumento intracelular de Ca^{2+} no citoplasma do ovócito, provocando duas ações importantes para o sucesso da fertilização (Sherwood, 2010). Uma das ações é o **bloqueio da polispermia**, caracterizado por uma reação química por influência do Ca^{2+} , designada por reação cortical (Silverthorn, 2010). Nesta reação, há a exocitose das enzimas contidas nos grânulos corticais localizados na zona cortical do ovócito. Estas enzimas difundem-se para a ZP, originando o endurecimento desta camada e também a inativação dos recetores ZP3 que, conjuntamente, impedem a ligação e a entrada de mais do que um espermatozoide no ovócito (Vander *et al.*, 2001; Sherwood, 2010). Para além disto, o Ca^{2+} desencadeia a **ativação do ovócito**, que leva a uma sequência de eventos que culminam com a conclusão da fertilização e a formação do zigoto (Sherwood, 2010). O primeiro passo é a conclusão da segunda divisão meiótica por parte do ovócito, que forma o 2º GP e o pronúcleo feminino. Entretanto, a cromatina do núcleo haploide do espermatozoide descondensa-se e forma o pronúcleo masculino (Speroff, 1999a; Tate, 2012b). Seguidamente dá-se a migração para o centro da célula e a fusão dos dois pronúcleos, cada um com um conjunto de 23 cromossomas, completando a fertilização e restaurando o número diploide de cromossomas necessário para o desenvolvimento de um novo indivíduo (Vander *et al.*, 2001). Após a fusão e formação do fuso acromático, o zigoto fica preparado para a primeira divisão mitótica (Figura 9) (Silverthorn, 2010).

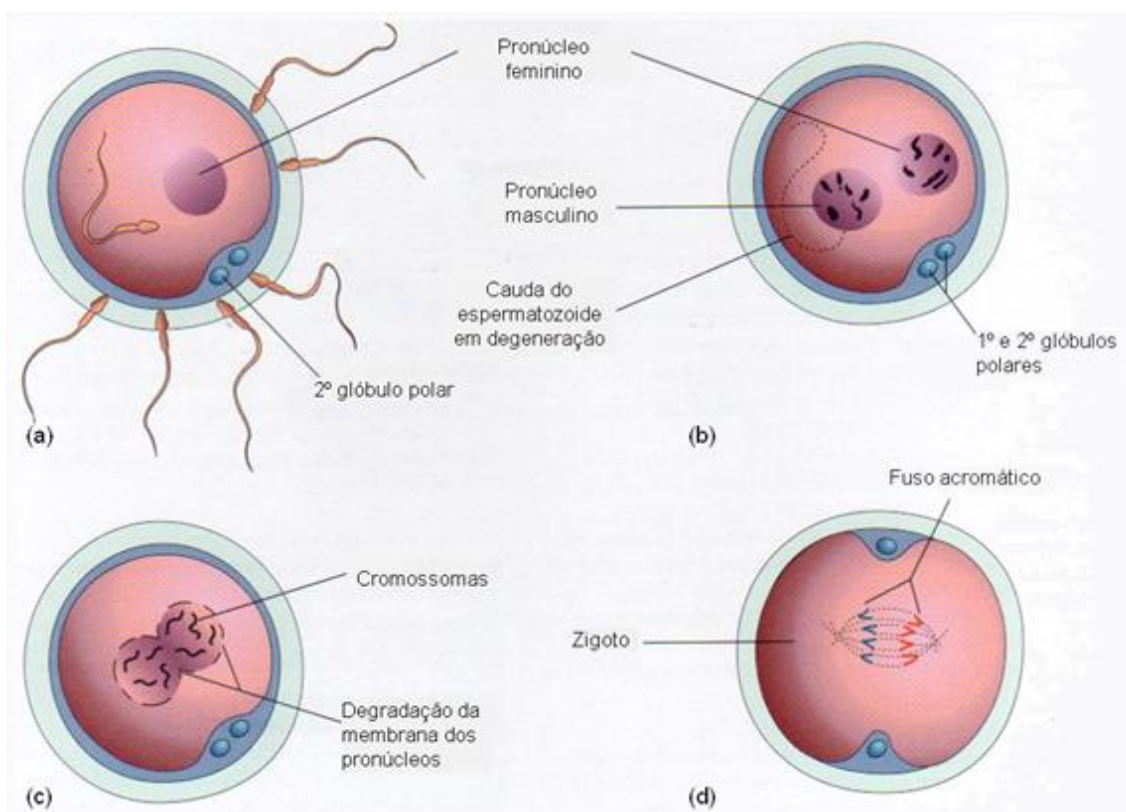


Fig. 9 – Fertilização: contacto e fusão do ovócito e do espermatozoide. A figura representa, de modo simplificado, os acontecimentos desde que as membranas de ambos os gametas se fundem até ao momento de fusão dos pronúcleos masculino e feminino para formarem o zigoto. Adaptado de Moore *et al.* (2004).

1.5. Transporte do Zigoto e Implantação

O início das divisões mitóticas do zigoto ocorre cerca de 18 a 36 horas após fertilização, levando à formação de duas células. Essas duas células voltam a dividir-se para dar origem a quatro células que, por sua vez, geram oito células e assim por diante (Figura 10) (Tate, 2012b). As divisões continuam, num processo denominado por **clivagem**, até atingirem um estado de 12 a 16 células, chamadas blastómeros (Vander *et al.*, 2001; Young *et al.*, 2013b). Nesta fase, cada uma destas células é considerada totipotente, ou seja, possuem a capacidade de desenvolver um indivíduo completo (Tate, 2012b). Cerca de 3 a 4 dias após fertilização, é obtida uma massa sólida de 12 a 32 células, designada por **mórula** (Figura 10). Começa, então, a verificar-se um fenómeno – **compactação** – no qual os blastómeros se modificam e formam uma massa compacta mediada por junções intercelulares (Moore e Persaud, 2004).

Todas estas modificações descritas até ao 4^o dia após a formação do zigoto ocorrem na trompa (Sherwood, 2010). Depois da fertilização, o zigoto é transportado ao longo da trompa graças ao fluxo de líquido criado pelas células secretoras em conjunto com o batimento dos cílios em direção ao útero (Guyton e Hall, 2006). Surgem ainda contrações fracas da musculatura da trompa, por ação do estrogénio (Vander *et al.*, 2001). Adicionalmente, o istmo encontra-se contraído, impedindo a passagem para o útero. Só quando ocorre a subida dos níveis de progesterona, segregada pelo corpo lúteo, é que esta estrutura é capaz de relaxar e permitir a entrada do embrião em desenvolvimento na cavidade uterina (Guyton e Hall, 2006). Este atraso temporário é fundamental para permitir a chegada do embrião em desenvolvimento a um lúmen uterino rico em nutrientes e capaz de suportar o zigoto até ao momento da implantação. Uma chegada prematura da mórula pode provocar a sua morte (Sherwood, 2010).

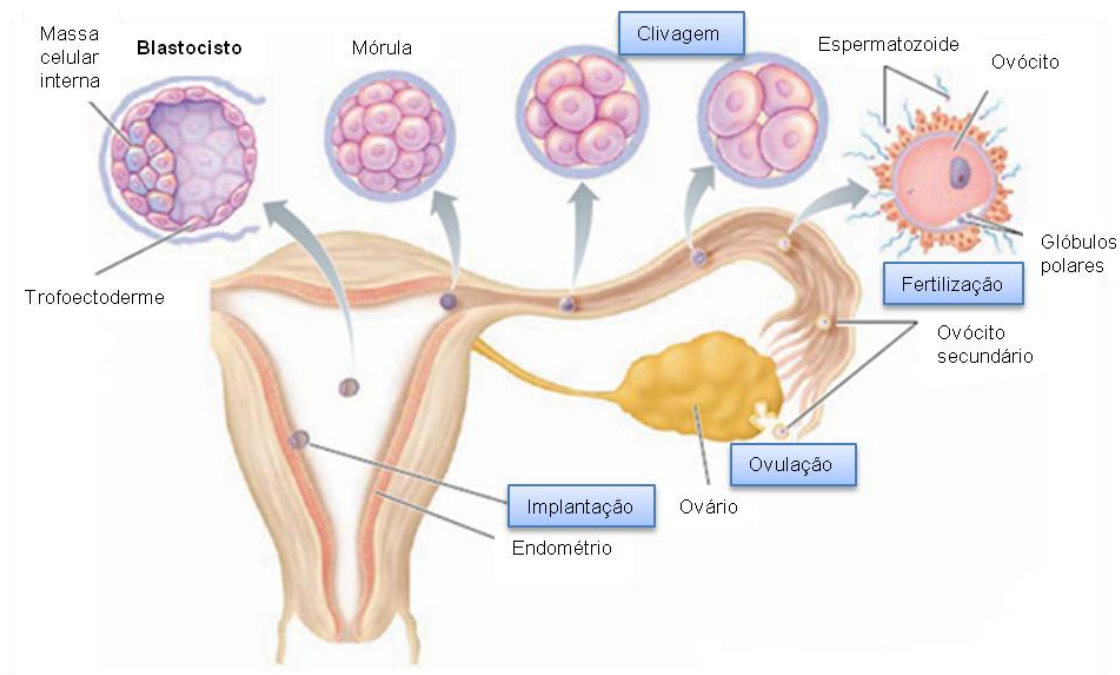


Fig. 10 – Estados iniciais do desenvolvimento desde a fertilização até à implantação. O ovócito fertilizado divide-se progressivamente por clivagem até produzir uma mórula que, por sua vez, se torna um blastocisto à medida que se move do local de fertilização na trompa até ao local de implantação no útero. O óvulo e o blastocisto apresentam cortes transversais para possibilitar a visualização da organização interna. As estruturas não se encontram à escala. Adaptado de Sherwood (2010).

Enquanto o embrião se encontra a flutuar na cavidade uterina, continua a ser submetido a divisões celulares até atingir o estado de **blastocisto** (Vander *et al.*, 2001). Nesta fase, as células acabam por sofrer diferenciação, passando a ser referidas como pluripotentes (Tate, 2012b). O blastocisto surge, então, quando se inicia a formação de uma cavidade preenchida por líquido, o blastocélio, no centro da

massa celular, rodeado por uma camada periférica de blastómeros, o trofoblasto, responsável pela origem dos anexos embrionários (Tate, 2012b; Young *et al.*, 2013b). Num dos pólos do blastocisto, está ainda presente a chamada massa celular interna (MCI), que posteriormente dará origem ao feto (Figura 10) (Vander *et al.*, 2001). Por esta altura, o blastocisto adquire o dobro do tamanho e a ZP torna-se mais fina (Young *et al.*, 2013b). Deste modo, estão reunidas as condições necessárias para ocorrer a eclosão e a implantação num endométrio que atingiu a espessura e a atividade secretora máximas, sob influência hormonal da progesterona e estrogénios (Tate, 2012b).

Por volta do sétimo dia após fertilização, o blastocisto vai sofrer **implantação** (Tate, 2012b). A implantação é caracterizada pela adesão do embrião ao epitélio endometrial, seguida pela penetração na mucosa uterina (Junqueira e Carneiro, 2008b). Este processo consiste em 3 etapas: aposição, adesão e invasão (Speroff, 1999a). A implantação é marcada inicialmente pela aposição, ou seja, o direcionamento do blastocisto para a parede posterior do útero. Para tal, o blastocisto que permanece na cavidade uterina durante 2 a 3 dias tem de libertar-se da ZP (Speroff, 1999a). A segunda etapa – adesão – é mediada por citocinas e envolve moléculas de adesão, onde estão incluídas as integrinas, que tornam o blastocisto mais pegajoso e facilitam este processo (Speroff, 1999a; Sherwood, 2010). A adesão ao epitélio uterino ocorre com a MCI dirigida para o endométrio (Figura 11a) (Vander *et al.*, 2001).

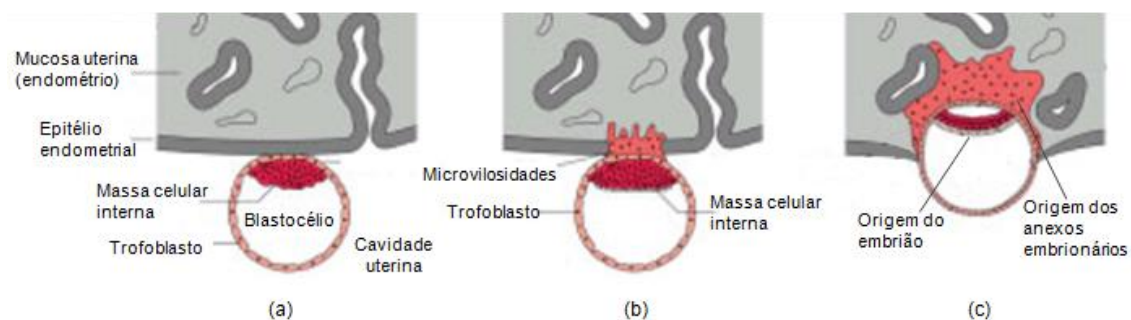


Fig. 11 – Etapas da implantação. (a) Adesão – o trofoblasto adere ao epitélio endometrial com a MCI direcionada para a parede uterina. (b) Invasão inicial – surgem microvilosidades na superfície do trofoblasto, que invadem o endométrio; (c) Invasão – o embrião começa a penetrar na mucosa uterina e a invadir as camadas mais profundas da parede uterina. Adaptado de Speroff (1999).

À medida que o blastocisto entra em contacto próximo com o endométrio, começam a surgir microvilosidades na superfície do trofoblasto que dão início à terceira fase da implantação, a invasão (Figura 11b) (Speroff, 1999a). Esta etapa ocorre por degradação da matriz intracelular sob ação de enzimas proteolíticas

libertadas pela MCI (Sherwood, 2010). A partir do momento em que a matriz sofre lise, o embrião consegue mover-se através do endométrio, penetrando nas camadas mais profundas da parede uterina (Figura 11c) (Speroff, 1999a). O sucesso da implantação, para além de necessitar de todas estas etapas, está dependente da supressão da resposta imune materna por parte de compostos libertados pelo trofoblasto (Sherwood, 2010).

Quando a implantação é completada – cerca de 10 dias após fertilização – o embrião encontra-se imerso num endométrio que lhe providencia proteção e nutrição (Junqueira e Carneiro, 2008b). Contudo, este sistema é adequado à nutrição do embrião apenas durante as primeiras semanas (Vander *et al.*, 2001). Para sustentar o desenvolvimento do embrião/feto durante a sua vida intrauterina, é desenvolvido um órgão especializado nas trocas fisiológicas entre a mãe e o embrião/feto, a placenta (Young *et al.*, 2013b). Este órgão é formado por uma parte fetal e uma parte materna, possuindo, deste modo, a contribuição de células derivadas de dois indivíduos geneticamente diferentes. Para além disso, a placenta é também considerada um órgão endócrino, estando envolvida na produção de hCG, estrogénios e progesterona (Junqueira e Carneiro, 2008b). Durante os dois primeiros meses de gravidez, as altas concentrações das hormonas ováricas são suportadas pelo corpo lúteo. No final deste período, a hCG, responsável pela manutenção do corpo lúteo, deixa de ser produzida e leva à degeneração desta estrutura. Deste modo, o estrogénio e a progesterona passam a ser produzidos pela placenta (Tate, 2012b). Os níveis elevados destas hormonas são essenciais à manutenção da gravidez bem como à inibição por *feedback* negativo da GnRH e das gonadotrofinas, impedindo um novo desenvolvimento folicular até ao final da gravidez (Silverthorn, 2010).

Desde o período de fertilização até à oitava semana de desenvolvimento, o novo ser humano em formação é designado por embrião. Desde este período até ao nascimento é denominado por feto (Tate, 2012b). A gravidez termina com o parto e nascimento entre as 38 e as 40 semanas de gestação, impulsionado por contrações rítmicas do útero que empurram o feto para o exterior (Silverthorn, 2010).

2. Infertilidade

2.1. Conceitos e Epidemiologia

A infertilidade é reconhecida como um problema de saúde pública pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e tem vindo a tornar-se uma preocupação crescente (Penzias, 2012). Os problemas que esta questão levanta a nível médico, social, ético, político e religioso demonstram a sua importância, mas também o seu carácter complexo e difícil de entender (Morice *et al.*, 1995).

A OMS e a Comissão Internacional para a Monitorização da Reprodução Medicamente Assistida (ICMART) definiram clinicamente a infertilidade como “uma doença do sistema reprodutivo traduzida na incapacidade de obter uma gravidez após 12 meses ou mais de relações sexuais regulares e desprotegidas” (Zegers-Hochschild *et al.*, 2009). No caso da idade da mulher ser superior a 35 anos, o processo de avaliação e tratamento é iniciado após um período de 6 meses de infertilidade (Bayer e Alper, 2012). A infertilidade é considerada primária se não houver uma gravidez prévia em nenhum dos elementos do casal e secundária quando pelo menos um dos elementos do casal já obteve conceção, mesmo que a gravidez tenha sido ectópica ou resultado em aborto (Frey e Patel, 2004; Mitwally e Abuzeid, 2008).

Apesar da prevalência da infertilidade ser difícil de avaliar, estudos apontam que, na população mundial, cerca de 10 a 15% dos casais em idade fértil sejam atingidos pela infertilidade, com uma incidência crescente de acordo com a idade (DGS, 2008). Para além disso, estas estimativas variam consoante a distribuição geográfica, como foi demonstrado num estudo de 2007. Nos países desenvolvidos, a prevalência da infertilidade variou entre 3,5% e 16,7%, enquanto nos países menos desenvolvidos esteve entre 6,9% e 9,3%, com uma prevalência média global estimada de 9%, onde 56% dos casais procuraram ajuda médica e apenas 22,4% a obtiveram (Boivin *et al.*, 2007). Estas estimativas são mais baixas do que as tipicamente mencionadas. No que diz respeito a Portugal, um estudo que teve como objetivo caracterizar a infertilidade através de inquéritos na comunidade estimou que 9,8% das mulheres com idade entre os 25 e os 69 enfrentaram problemas de infertilidade ao longo da vida. Para mulheres em idade reprodutiva (entre os 25 e os 44 anos), a percentagem foi de 8,2% (Silva-Carvalho e Santos, 2009).

Adicionalmente existem outros dois conceitos importantes para a compreensão da reprodução. A esterilidade, por vezes confundida com infertilidade, corresponde a

um estado permanente onde existe uma causa masculina e/ou feminina que impeça em absoluto a concepção (Fauser e Devroey, 2011). Por outro lado, a fecundabilidade, enquanto sinónimo de taxa de concepção, diz respeito à capacidade para obter uma gravidez comprovada durante o ciclo menstrual (Whitman-Elia e Baxley, 2001; Fauser e Devroey, 2011). A taxa de concepção em cada ciclo menstrual é de cerca de 20 a 25%. Após o período de um ano, esta probabilidade aumenta para os 80%. Ao fim de dois anos, a proporção sobe para os 90% (DGS, 2010; Fauser e Devroey, 2011). Comparativamente a outras espécies do reino animal, a fertilidade humana é, infelizmente, no âmbito da PMA, baixa (Roupa *et al.*, 2009).

As causas de infertilidade são múltiplas e podem estar presentes, tal como já foi referido, tanto no aparelho reprodutor masculino como feminino. O fator masculino está presente em cerca de 30 a 40% das situações de infertilidade (Whitman-Elia e Baxley, 2001; NICE, 2013). Dentro do fator feminino, o fator tubo-peritoneal representa cerca de 30 a 40% de infertilidade na mulher (Whitman-Elia e Baxley, 2001), enquanto as disfunções ovulatórias são responsáveis por um valor à volta de 25% (NICE, 2013). O fator cervical está ainda presente em 10% dos casos de infertilidade feminina, existindo ainda outras causas cuja percentagem não é tão significativa (5%) (Whitman-Elia e Baxley, 2001). Em cerca de 30 a 40% dos casos, as causas são encontradas em ambos os membros do casal (DGS, 2008; NICE, 2013). Importa ainda referir que aproximadamente 10% dos casos permanecem inexplicados mesmo após investigação, representando a chamada infertilidade idiopática (Whitman-Elia e Baxley, 2001).

Tendencialmente, a infertilidade conjugal deverá aumentar, como consequência da prática de comportamentos de risco (alimentação desequilibrada, obesidade, tabagismo, exposição a Infeções de Transmissão Sexual (ITS), entre outros), bem como do adiamento da gravidez por motivos profissionais e/ou económicos (Vasconcelos *et al.*, 2014).

2.2. História da Infertilidade

A infertilidade, para além de toda a dimensão física e emocional que acarreta, não pode ser dissociada da componente histórica, social e cultural. Desde o início da Humanidade que há registos acerca da infertilidade (Faria, 2014). Com o aumento da importância deste tema, cientistas, filósofos, físicos e médicos dedicaram-se a estudar e adquirir cada vez mais conhecimentos sobre este assunto (Penzias, 2012).

Ao longo da história e das suas variadas civilizações, a mulher foi sempre considerada símbolo de fertilidade (Morice *et al.*, 1995). Como tal, na maioria das referências, a infertilidade é considerada um problema exclusivamente feminino (Faria, 2014). Na Bíblia, as mulheres eram avaliadas pela sua capacidade de ter filhos e a infertilidade era vista como uma punição feita por Deus (Penzias, 2012). No povo egípcio, as mulheres ocupavam uma posição fundamental, tendo um estatuto igual ao dos homens. Esta posição privilegiada é única em sociedades antigas. Aqui, ao contrário de outras civilizações, a infertilidade não era considerada um castigo divino nem um problema associado apenas às mulheres, mas sim uma doença que podia ser diagnosticada e tratada (Morice *et al.*, 1995). Na medicina ocidental, que tem as suas raízes na Grécia Antiga, a mulher era considerada uma criatura inferior e sub-humana, ideia que persistiu durante muitos séculos. Apesar disto, a infertilidade não era motivo de exclusão (Morice *et al.*, 1995; Lunenfeld e Elder, 2005). No período da escola Árabe (700-1200), a infertilidade tanto podia ter origem masculina como feminina (Lunenfeld e Elder, 2005). Na Idade Média, a infertilidade continuava a ser sinal de castigo, maioritariamente devido a pecados, infidelidade ou blasfémia (Morice *et al.*, 1995).

O Renascimento é marcado por um período de grande progresso científico, que foi evoluindo ao longo dos séculos e que possibilitou a descoberta de inúmeras causas de infertilidade bem como o seu diagnóstico. Apesar de todos estes avanços, a infertilidade continuava a ser atribuída em larga escala à mulher (Morice *et al.*, 1995). A partir dos anos 50, o desenvolvimento de ensaios radioimunológicos permite a descoberta da endocrinologia e desordens associadas à mesma que, nos anos 60, possibilitaram a introdução de medicação para a fertilidade que leva à regulação do ciclo menstrual. Nos anos 80 surgem cirurgias capazes de corrigir anomalias anatómicas responsáveis pela infertilidade até que, nos anos 90, nasce o primeiro bebé resultante de fertilização *in vitro* (FIV) (Penzias, 2012). De uma maneira geral, ao longo do século XX, a mulher começa, finalmente, a ser tratada como uma paciente com os seus direitos, passando a ser compreendida e integrada na sociedade (Morice *et al.*, 1995).

No passado, as pessoas tinham pouco controlo sobre a infertilidade e os casais que não conseguiam obter uma gravidez tinham de se conformar com esse facto. Hoje em dia, a infertilidade é um assunto de grande importância, cujos avanços na medicina têm aumentado as soluções e as probabilidades de conceção por parte dos casais através do recurso à Procriação Medicamente Assistida (PMA) (Roupa *et al.*, 2009).

2.3. Abordagem do Casal Infértil

Em condições normais, após os 12 meses de infertilidade, é fundamental começar uma avaliação inicial ao casal infértil. Excepcionalmente, esta avaliação é feita mais cedo caso haja conhecimento de patologias prévias de algum dos elementos do casal, ciclos menstruais irregulares, bem como em caso de idade avançada da mulher (Mitwally e Abuzeid, 2008; NICE, 2013).

Um fator importante na abordagem do casal infértil é a componente psicológica. A infertilidade é muitas vezes associada a grandes alterações emocionais, tais como ansiedade, depressão, raiva e discórdia conjugal (Frey e Patel, 2004). Estas perturbações podem potenciar fatores de infertilidade pré-existentes, sendo fundamental o apoio psicológico (DGS, 2010).

A avaliação etiológica dos casais inférteis deve ser realizada segundo orientações da Direção Geral da Saúde (DGS), centrada no casal e dirigida às causas mais comuns de infertilidade. Esta abordagem deve ser eficaz, rentável e bem-sucedida, tudo dentro de um período de tempo aceitável. Ao longo da investigação, ocorre a transição entre diferentes níveis de cuidados, cada vez mais complexos e específicos (DGS, 2010). Os cuidados de saúde primários, cujo responsável é o Médico de Medicina Geral e Família, englobam uma avaliação pré-concepcional, que inclui a história médica, reprodutiva e sexual e ainda exames físicos e análises de cada um dos membros, de modo a observar evidências de doença sistémica, anomalias genéticas ou disfunções hormonais (Whitman-Elia e Baxley, 2001). Numa primeira consulta, é necessária a presença do casal, dado que ambos são parte fundamental do processo de diagnóstico e terapêutica (DGS, 2011). Apesar disso, cada elemento do casal deve ser tratado como uma unidade e analisado individualmente como potencial origem da infertilidade (Frey e Patel, 2004). Um diagnóstico completo e cuidado da infertilidade é um pré-requisito que permite a identificação das causas deste problema que, por sua vez, levam a uma investigação mais profunda e ao desenvolvimento de um plano de tratamento adequado (Mitwally e Abuzeid, 2008; Bayer e Alper, 2012). A segunda etapa inclui os cuidados Hospitalares de 1ª linha, executados pelo Ginecologista/Obstetra, onde podem decorrer tratamentos médicos e cirúrgicos através de uma consulta de infertilidade. Por fim, o casal é referenciado para os cuidados hospitalares de 2ª linha, contactando com um especialista em Infertilidade e Medicina da Reprodução, nos Centros de PMA (DGS, 2010).

2.4. Avaliação do Casal Infértil – Causas de Infertilidade

A infertilidade é influenciada por variados fatores, que serão descritos ao longo deste tópico. Como tal, a anamnese deve ser exaustiva e centrar-se inicialmente na história reprodutiva, na sexualidade, no risco ocupacional e no estilo de vida (DGS, 2010). Na **história reprodutiva**, importa saber se houve maternidade ou paternidade em relações anteriores, se já houve infertilidade prévia de algum dos membros e os tratamentos utilizados, a duração da infertilidade atual e ainda os antecedentes de ITS (Mitwally e Abuzeid, 2008; Vasconcelos *et al.*, 2014). No que diz respeito à **sexualidade**, é necessário avaliar o padrão das relações sexuais: frequência, ocorrência durante o período fértil e a função erétil (DGS, 2010). Adicionalmente é questionada a utilização de lubrificantes, que podem ser tóxicos para os espermatozoides, e os métodos contraceptivos utilizados (Frey e Patel, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2014). É ainda fundamental pedir ao casal testes para marcadores infecciosos e para rastreio de ITS (HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana, hepatite B e hepatite C) (NICE, 2013).

A ocupação profissional é também um ponto importante da anamnese, uma vez que permite avaliar situações de **risco ocupacional** e de exposição a agentes físicos e químicos que possam estar associados a redução da fertilidade e aumento do risco de abortamento espontâneo (Bayer, 2012a; Vasconcelos *et al.*, 2014). A exposição a estes agentes pode ocorrer tanto no local de trabalho como no meio ambiente (Bayer, 2012a). Destacam-se os solventes e outros agentes químicos, toxinas, pesticidas, radiações e ainda o calor (Lass, 2005). O sexo masculino é mais suscetível a este tipo de riscos, uma vez que a espermatogénese é um processo contínuo e dinâmico (Bayer, 2012a). Para além disso, o trabalho físico intenso ou por turnos, o exercício físico em excesso e o *stress* podem também ser prejudiciais (Vasconcelos *et al.*, 2014).

Relativamente ao **estilo de vida** praticado, existem cada vez mais evidências de que este pode causar diminuição da fertilidade (Macaluso *et al.*, 2010). O **tabaco** é o fator que tem mais impacto na fertilidade (Macklon *et al.*, 2009). Nas mulheres, o tabaco está associado a diminuição da taxa de fecundabilidade, disfunções ovulatórias e falência ovárica prematura (FOP) (Macaluso *et al.*, 2010; Bayer, 2012a). Estão ainda descritas alterações dos movimentos ciliares da trompa, que interferem na captação do ovócito e na migração do zigoto, podendo levar a uma maior incidência de gravidez ectópica (ASRM, 2012a). O consumo de tabaco é também responsável por riscos durante a gravidez, tais como abortamento, nascimento prematuro e baixo peso do

recém-nascido (Macklon *et al.*, 2009). No homem fumador verifica-se uma redução na qualidade espermática acompanhada por redução do volume do ejaculado, menor densidade de espermatozoides e morfologias mais baixas, apesar da relação com a infertilidade não ser evidente (Lass, 2005; Macaluso *et al.*, 2010). O consumo de **álcool** acentua dificuldades das hipóteses de gravidez e aumenta o risco teratogénico, recomendando-se limites máximos de ingestão semanal (Gaspar e Carvalho, 2014). Nos homens, enquanto o consumo moderado aparenta não ter influência na taxa de conceção, a ingestão excessiva é prejudicial à qualidade espermática, podendo os efeitos ser reversíveis (Hirsh, 2005; NICE, 2013). Nas mulheres, é possível a ocorrência de disfunções ovulatórias com o consumo elevado (Gulekli *et al.*, 2009). Durante a gravidez, é desaconselhado o consumo de álcool, uma vez que o feto pode sofrer anomalias de crescimento, defeitos estruturais e problemas a nível cognitivo (Hickman *et al.*, 2008). As **drogas** e a **cafeína** também interferem com a fertilidade de ambos os membros do casal (Bayer, 2012a; NICE, 2013). O consumo substancial de cafeína tem sido associado não só à infertilidade, mas ainda ao aumento do risco de abortamento (Hickman *et al.*, 2008). Os **hábitos alimentares** refletem-se no peso de cada um, podendo levar a dois extremos, o baixo peso e a obesidade (NICE, 2013). Mulheres com um peso reduzido (Índice de Massa Corporal (IMC) inferior a 19) possuem um risco elevado para disfunções hipotalâmicas (Bayer, 2012a). Por outro lado, uma mulher com um IMC superior a 29 sofre de obesidade, associada a uma maior dificuldade na obtenção de uma gravidez devido a disfunções ovulatórias e menstruais (Macaluso *et al.*, 2010). A obesidade é igualmente associada a dificuldades na implantação, aumento do risco de abortamento, pré-eclâmpsia¹ e macrossomia fetal² (Meldrum, 2007; Hickman *et al.*, 2008). À semelhança das mulheres, o sexo masculino sofre alterações na sua fertilidade devido à obesidade, sendo esta responsável por disfunção erétil, decréscimo na produção de androgénios e redução da qualidade espermática (Gulekli *et al.*, 2009; Macaluso *et al.*, 2010).

2.4.1. Fatores Não Patológicos

2.4.1.1. Frequência das Relações Sexuais

Quando um casal apresenta dificuldades na obtenção de uma gravidez, é essencial estabelecer uma frequência adequada das relações sexuais, tendo em conta

¹ Pré-eclâmpsia corresponde a uma doença que ocorre na gravidez em que a gestante desenvolve hipertensão (Lynch *et al.*, 2002).

² Macrossomia fetal é uma doença que se caracteriza pelo excesso de peso do feto (Gaudet *et al.*, 2014).

a sua ocorrência durante o período fértil bem como os tempos de sobrevivência dos gametas, já referidos no capítulo anterior (Lass, 2005; Bayer, 2012a). Como tal, a relação sexual deve ocorrer a cada 2 a 3 dias, principalmente entre 5 dias antes até 1 dia depois da ovulação para aumentar as probabilidades de concepção (Tate, 2012a; NICE, 2013).

2.4.1.2. Idade

Ao longo dos últimos 20 anos tem-se assistido a um aumento da idade média para ter filhos (Roupa *et al.*, 2009). A carreira e aspirações profissionais, juntamente com o aumento da esperança média de vida e do uso universal de contraceptivos, são os responsáveis por esta subida e pelo decréscimo da capacidade reprodutiva (Kovac *et al.*, 2013). A frequência de relações sexuais muitas vezes decresce com a idade, potenciando a contribuição para a dificuldade de concepção. Contudo, o fator que mais compromete a capacidade de casais mais velhos obterem uma gravidez com sucesso é a **idade materna**. A fertilidade da mulher atinge o pico por volta dos 24 anos, período a partir do qual começa a diminuir até sofrer uma aceleração a partir dos 37 anos (Figura 12) (Bayer, 2012a). As mulheres com esta idade apresentam uma diminuição do número de ovócitos (Mitwally e Abuzeid, 2008). Adicionalmente, também a qualidade ovocitária fica comprometida, estando associada a anomalias cromossómicas como resultado de não-disjunções (Whitman-Elia e Baxley, 2001; Bayer, 2012a). Um estudo demonstrou que os mecanismos de regulação responsáveis pelo fuso meiótico ficam significativamente alterados em mulheres mais velhas, conduzindo a uma maior prevalência de aneuploidias (Battaglia *et al.*, 1996). Estes desequilíbrios a nível cromossómico são os maiores responsáveis pelo aumento das taxas de abortamento espontâneo e recém-nascidos com anomalias nos casos de idade materna avançada (Mitwally e Abuzeid, 2008; Bayer, 2012a).

À semelhança do que acontece na mulher, também a **idade paterna** tem influência na fertilidade. A partir dos 40 anos começa a verificar-se uma diminuição na função testicular e na produção de testosterona (Kovac *et al.*, 2013). Para além disso, os parâmetros seminais sofrem alterações de volume, motilidade e morfologia, havendo ainda um aumento da taxa de fragmentação do DNA espermático (Bayer, 2012a; Ferraz, 2014). Apesar disto, a redução da fertilidade nos homens é considerada subtil comparativamente com o impacto que se verifica nas mulheres (Mitwally e Abuzeid, 2008).

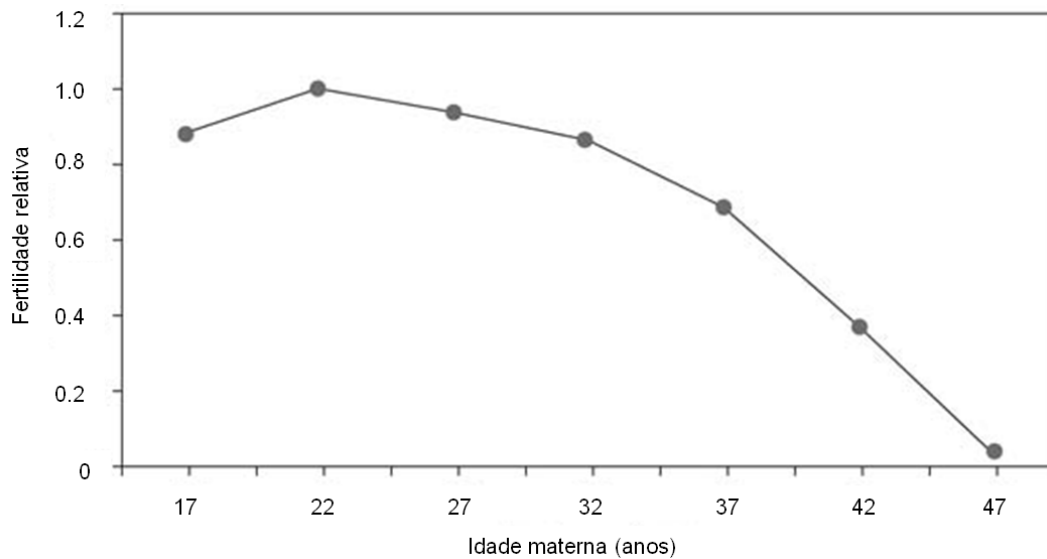


Fig. 12 – Fertilidade relativa de acordo com a idade materna. Uma probabilidade de 1.0 é atribuída ao grupo etário entre os 20 e os 24 anos, representativo da maior taxa de fertilidade. A partir deste período começa a verificar-se um decréscimo, que passa a ser mais acentuado após os 37 anos. Adaptado de Bayer (2012).

2.4.2. Fatores Patológicos Masculinos

Ao longo dos séculos, a infertilidade do casal era quase sempre atribuída à mulher. Só nas últimas décadas é que o fator masculino começou a ser considerado, maioritariamente pelos avanços na investigação que revelaram diversas condições masculinas causadoras de infertilidade bem como tratamentos eficazes para as ultrapassar (Comhaire e Mahmoud, 2008). A análise deve incluir a história médica e reprodutiva, um exame físico e duas análises de esperma com pelo menos 3 meses de intervalo. Em função das informações obtidas, podem ser utilizados meios de diagnóstico complementares, tais como avaliação endócrina, análise de urina pós-ejaculação, ecografias e avaliação genética (Ferraz, 2014).

Um dos primeiros aspetos a ter em conta no que diz respeito às causas de infertilidade masculinas são os **antecedentes cirúrgicos** do paciente, uma vez que uma cirurgia prévia testicular ou a uma hérnia inguinal podem ter originado lesões nos vasos deferentes (Frey e Patel, 2004; Bayer e Alper, 2012). Os **antecedentes de lesão testicular** e a criptorquidia³ são também fatores importantes dado que podem provocar obstrução dos ductos ejaculatórios e comprometer a função testicular, respetivamente (Whitman-Elia e Baxley, 2001; Bayer e Alper, 2012). A orquite⁴ e

³ Criptorquidia corresponde a uma condição médica onde não há descida de um ou de ambos os testículos para o escroto (Tate, 2012a).

⁴ Orquite trata-se de uma inflamação dos testículos, sendo a causa mais comum a parotidite (Trojan *et al.*, 2009).

outras inflamações dos testículos provocadas por infeções (incluindo as ITS) podem também ser responsáveis por sequelas na componente germinativa do elemento masculino do casal (Comhaire e Mahmoud, 2008; Ferraz, 2014).

A exposição da zona escrotal a **temperaturas elevadas**, em casos de utilização de roupa muito apertada, computadores portáteis no colo, prática excessiva de bicicleta e outros desportos relacionados, podem ser eventualmente prejudiciais (Southorn, 2002; Sheynkin *et al.*, 2005). Do mesmo modo, o recurso a saunas ou situações febris aumentam a temperatura da espermatogénese, que deve ocorrer nos 35°C, comprometendo a produção e a qualidade espermática (Bayer e Alper, 2012).

À semelhança do que acontece com o uso de drogas, álcool e tabaco, também a ingestão de certos **medicamentos** é capaz de comprometer a fertilidade masculina (Frey e Patel, 2004). Medicação para doenças crónicas contendo ansiolíticos, antidepressivos e bloqueadores β diminuem a função erétil, enquanto a presença de bloqueadores dos canais de cálcio podem prejudicar a capacidade fecundante dos espermatozoides (Vasconcelos *et al.*, 2014). Igualmente, componentes que fazem parte da medicação habitual, tais como cimetidina, ciclosporina, colquicina, espironolactona, sulfassalazina, e os esteroides anabolizantes são nocivos à fertilidade e à produção espermática (Bayer e Alper, 2012). Para além destes, há que salientar a iatrogenia na fertilidade em casos de cancro, como resultado de quimioterapia e radioterapia, com grande interferência na capacidade reprodutiva (Comhaire e Mahmoud, 2008; Macaluso *et al.*, 2010).

Outra condição que pode ser causa de infertilidade no homem é a chamada **infertilidade imunológica**, diagnosticada pela presença de anticorpos no líquido seminal (Whitman-Elia e Baxley, 2001). Quando a barreira hematotesticular é quebrada, o sistema imunológico produz anticorpos contra os espermatozoides, levando à redução da sua capacidade de fertilização, tanto pela redução da motilidade dos gâmetas masculinos como pela aglutinação que se verifica (Whitman-Elia e Baxley, 2001; Comhaire e Mahmoud, 2008). Não existe tratamento que leve à eliminação da formação destes anticorpos e que consiga restaurar a fertilidade (Comhaire e Mahmoud, 2008).

Apesar das **anomalias do eixo hormonal** estarem bem reportadas, a sua incidência como causa de infertilidade masculina é baixa (AUA, 2010). Normalmente, a avaliação endócrina é executada quando se verificam alterações dos parâmetros seminais, mais propriamente ao nível da concentração de espermatozoides (concentração inferior a 10 milhões de espermatozoides/ml) (ASRM, 2012b). Devem,

então, ser medidos os níveis de FSH e testosterona sérica. Se os níveis de testosterona forem baixos, é realizada uma avaliação mais extensiva, que inclui a testosterona livre bem como a LH e a prolactina (AUA, 2010). A relação entre os níveis de testosterona, FSH, LH e prolactina possibilita a identificação da condição clínica em causa (Tabela 1) (ASRM, 2012b). O hipogonadismo é caracterizado pelo comprometimento da função testicular, que pode afetar a espermatogénese e/ou a síntese de testosterona (EAU, 2015). O hipogonadismo gonadotrófico está associado a anosmia na síndrome de Kallmann⁵, onde há supressão na libertação de GnRH e/ou gonadotrofinas desde a puberdade (Whitman-Elia e Baxley, 2001). Pacientes com esta síndrome são normalmente tratados com sucesso através de injeções com as hormonas mencionadas anteriormente (NICE, 2013).

Tabela 1 – Níveis hormonais em vários estados clínicos. Adaptado de ASRM (2012b).

Condição Clínica	FSH	LH	Testosterona	Prolactina
Espermatogénese normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Hipogonadismo hipogonadotrófico	Baixa	Baixa	Baixa	Normal
Espermatogénese anormal ^a	Alta/normal	Normal	Normal	Normal
Falência testicular completa/hipogonadismo hipergonadotrófico	Alta	Alta	Normal/baixa	Normal
Tumor hipofisário produtor de prolactina	Normal/alta	Normal/baixa	Baixa	Alta

^aValores normais da FSH sérica não garantem uma espermatogénese normal. Porém, valores elevados desta hormona indicam claramente uma anomalia ao nível da formação de espermatozoides.

A **ejaculação retrógrada** ocorre quando há uma falha na separação entre o aparelho reprodutor e a bexiga, levando a que o líquido seminal seja transportado para a bexiga durante a ejaculação (Hirsh, 2005). As causas desta disfunção podem ser neurológicas, farmacológicas ou anatómicas (EAU, 2015). Quando o volume do líquido seminal é baixo ou quando ocorre orgasmo sem ejaculação, é aconselhável realizar uma análise de urina pós-orgasmo. A presença de espermatozoides nessa mesma urina confirma o diagnóstico de ejaculação retrógrada (AUA, 2010). É possível utilizar os espermatozoides recuperados da urina pós-orgasmo em tratamentos de infertilidade (Comhaire e Mahmoud, 2008).

Uma das patologias mais frequentes é o **varicocele**, com uma incidência de cerca de 15% na população em geral e de aproximadamente 40% nos homens inférteis (Bayer e Alper, 2012). O varicocele consiste numa dilatação anormal das

⁵ A síndrome de Kallmann é uma forma congénita de hipogonadismo hipogonadotrófico e caracteriza-se pela sua associação com um distúrbio olfativo (anosmia). É causada por um defeito da migração neuronal que envolve as células produtoras de GnRH e os neurónios dos bulbos olfativos (Martins *et al.*, 2012).

veias escrotais do plexo pampiniforme, situado no cordão espermático, e pode ser identificado através de uma examinação por parte do urologista (Ferraz, 2014). Crê-se que o seu impacto ao nível da fertilidade se deve à redução ou bloqueio do fornecimento de sangue arterial aos túbulos seminíferos e às células de Leydig, resultando em hipoxia, refluxo de metabolitos e hormonas supra-renais, aumento da pressão e da temperatura dos testículos, o que compromete a produção de espermatozoides (Whitman-Elia e Baxley, 2001; Comhaire e Mahmoud, 2008; Kroese *et al.*, 2012). Esta condição pode ser facilmente tratada com recurso a correção cirúrgica, apesar das evidências do seu impacto na fertilidade subsequente não serem conclusivas, uma vez que não leva à melhoria das taxas de gravidez (Macaluso *et al.*, 2010; Kroese *et al.*, 2012).

Outro fator masculino de infertilidade são as **causas genéticas**, com uma incidência de cerca de 30% (Whitman-Elia e Baxley, 2001). As anomalias genéticas podem causar infertilidade afetando tanto a produção como o transporte de espermatozoides (ASRM, 2012b). O aconselhamento genético deve ser providenciado sempre que uma anomalia genética é detetada. Para além disso, o casal deve ser informado sobre o risco de transmissão à descendência (AUA, 2010). Os três fatores genéticos mais comuns relacionados com a infertilidade são:

1. Mutações no gene da fibrose quística associadas a agenesia congénita dos vasos deferentes. Esta agenesia pode ser identificada por exame médico, sendo a causa mais comum uma mutação no gene que codifica a proteína reguladora do transporte transmembranar da fibrose quística (CFTR – *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) (Anguiano *et al.*, 1992; Chillon *et al.*, 1995). Para além da azoospermia obstrutiva, ou seja, da ausência de espermatozoide no ejaculado por bloqueio nos ductos, os pacientes com esta mutação podem apresentar um baixo volume de ejaculado, devido à maioria dos casos possuírem também uma agenesia das vesículas seminais (Hall e Oates, 1993).
2. Anomalias cromossómicas resultando no comprometimento da função testicular. Através de uma análise ao cariótipo, é possível detetar aneuploidias bem como anomalias estruturais que levam a alterações na espermatogénese (AUA, 2010). A transmissão paternal de defeitos ao nível de cromossomas aumenta o risco de abortamento e de crianças com alterações cromossómicas ou congénitas (ASRM, 2012b). A síndrome de Klinefelter (47, XXY) representa a anomalia cromossómica numérica mais comum em homens inférteis. Esta síndrome resulta de uma não-disjunção

meiótica do cromossoma X, cujos pacientes apresentam testículos de pequenas dimensões, níveis baixos de testosterona sérica e azoospermia (Whitman-Elia e Baxley, 2001).

3. Microdeleções no cromossoma Y associadas a falhas isoladas na espermatogénese. No braço longo do cromossoma Y (Yq11) estão presentes regiões com múltiplos genes necessários para a espermatogénese, os chamados Fatores de Azoospermia (AZF – *Azoospermia Factor*) (Krausz e Degl’Innocenti, 2006). Segundo Vog e colaboradores (1996), esta região encontra-se dividida em AZFa (proximal), AZFb (central) e AZFc (distal) (Vogt *et al.*, 1996). Deleções nestas zonas podem levar a azoospermias secretoras ou oligospermias graves (Pryor *et al.*, 1997).
 - i. Microdeleção AZFc – são as mais frequentes, estando muitas vezes associadas a microdeleções AZFb. Apresentam um fenótipo variável entre oligospermias graves e azoospermias (Oates *et al.*, 2002).
 - ii. Microdeleções AZFb – associadas a paragem na maturação, podendo existir espermatogénese completa em algumas “ilhotas” no testículo (Brandell *et al.*, 1998; Sá *et al.*, 2008).
 - iii. Microdeleções AZFa – são as mais raras, apresentando o fenótipo mais grave: ausência total de células germinativas, ou seja, Síndrome de Só Células de Sertoli (SCO – *Sertoli-Cell Only*) (Krausz *et al.*, 2000).

Adicionalmente, a **fragmentação do DNA** espermático pode também comprometer a fertilidade (Sakkas e Alvarez, 2010). Apesar de um espermatozoide com danos no seu DNA ser capaz de fertilizar um ovócito, verifica-se um aumento desse dano em espermatozoides de homens oligospermicos (Zini e Sigman, 2009; Sakkas e Alvarez, 2010). Consequentemente, diminuem as probabilidades de conceção natural e aumenta o risco de abortamento precoce (Lewis, 2013). As causas dos danos ao nível do DNA espermático são 1) apoptose durante o processo de espermatogénese; 2) quebra nas cadeiras de DNA durante a remodelação da cromatina espermática aquando da espermiogénese; 3) fragmentação pós-testicular do DNA induzida pelos radicais livres de oxigénio durante o transporte de espermatozoides ao longo dos túbulos seminíferos e do epidídimo; e 4) danos do DNA induzidos por radioterapia, quimioterapia e poluentes ambientais (Sakkas e Alvarez, 2010; ASRM, 2012b).

2.4.3. Fatores Patológicos Femininos

A análise das causas de infertilidade femininas é mais complexa do que no caso masculino, incluindo um exame físico alargado e uma citologia cervico-vaginal (teste de Papanicolau) (Frey e Patel, 2004). A história da paciente deve também ser avaliada, englobando a história reprodutiva (idade da menarca, frequência e duração do ciclo menstrual e presença de dismenorrea⁶), cirurgias prévias, medicação atual, história familiar (defeitos de nascença, atraso mental ou falhas na conceção) e ainda sintomas de doenças endócrinas (Hickman *et al.*, 2008). Deste modo, os dados obtidos constituem uma base fundamental para os exames complementares, que podem incidir sobre vários componentes da anatomia e da fisiologia reprodutiva feminina, permitindo a identificação de qualquer anomalia. A adequação anatómica e funcional é essencial para o sucesso da conceção (Roupa *et al.*, 2009).

As **disfunções ovulatórias** afetam consideravelmente a fertilidade feminina, através de variadas patologias responsáveis pela irregularidade dos ciclos menstruais e pela anovulação, sendo fundamental o registo completo da história menstrual da paciente (Bayer e Alper, 2012). A síndrome do ovário poliquístico (SOP) é a endocrinopatia mais frequente em mulheres em idade reprodutiva, sendo caracterizada pela presença de múltiplos quistos no ovário (Gaspar e Carvalho, 2014). Encontra-se também associada a altos níveis de androgénios no sangue, bem como a períodos menstruais irregulares ou ausentes (oligomenorrea ou amenorrea, respetivamente) (Fauser e Devroey, 2011). Mulheres com SOP produzem mais folículos quando estimuladas (Meldrum, 2007). A hiperprolactinemia é outra disfunção ovulatória, onde estão presentes níveis elevados de prolactina. Pode manifestar-se por galactorreia⁷, ciclos menstruais irregulares, oligo/anovulação e, por vezes, disfunção tiroideia (Gaspar e Carvalho, 2014). Também os defeitos da fase luteal são causa de infertilidade e abortamento recorrente. Nestes casos, a mulher pode ovular e ter ciclos menstruais regulares, mas a progesterona segregada durante a fase lútea é insuficiente para a maturação do endométrio, comprometendo a implantação (Bayer e Alper, 2012). Para além destes fatores, podem ainda verificar-se casos de amenorrea hipotalâmica e patologias da tiroide, ambas relacionadas diretamente com o eixo hormonal hipotálamo-hipófise anterior-ovários (Hickman *et al.*, 2008; Sowińska-Przepiera *et al.*, 2015). O aumento da função da tiroide é suscetível de causar disfunções no ciclo menstrual, enquanto a sua diminuição leva ao decréscimo da

⁶Dismenorrea é uma dor a nível pélvico que ocorre antes ou durante a menstruação (Fitz, 1999).

⁷Galactorreia refere-se à secreção mamária de um líquido leitoso fora do período pós-parto ou de lactação (Speroff, 1999b).

atividade sexual e/ou ao incremento do fluxo durante a menstruação, e mais raramente, a amenorreia secundária (Roupa *et al.*, 2009). Também a FOP, patologia que define uma mulher abaixo dos 40 anos com amenorreia com uma duração superior a 4 meses e níveis de FSH elevados, é uma causa de infertilidade. A etiologia varia consideravelmente, podendo ser anomalias genéticas/cromossómicas, fatores metabólicos/enzimáticos, autoimunidade, infeções ou toxinas ambientais (Ebrahimi e Asbagh, 2015).

Para auxiliar na identificação das disfunções ovulatórias existem dois testes. O primeiro teste é a **avaliação da ovulação**, que pode ser realizado de três modos: 1) doseamento da progesterona sérica – deve ser executado a meio da fase lútea, cerca de 7 dias antes do dia previsto para a menstruação (ao 21º dia de um ciclo de 28 dias) (DGS, 2011); 2) ecografia transvaginal seriada – torna possível observar o desenvolvimento folicular, o colapso do folículo ovulatório e o surgimento de líquido no fundo de saco (Hickman *et al.*, 2008); e 3) avaliação da LH – teste de previsão da ovulação útil em contexto de relações sexuais programadas (DGS, 2011). O segundo teste é a **determinação da reserva ovárica**, que pode ser avaliada pelo doseamento da FSH, LH e estradiol séricos entre o 2º e o 4º dia do ciclo e também pela observação do número de folículos antrais através de ecografia transvaginal (Fauser e Devroey, 2011; Bayer e Alper, 2012). Se os níveis de FSH se revelarem elevados, estamos perante uma reserva ovárica reduzida, podendo verificar-se falência ovárica. Por outro lado, caso o nível de FSH seja normal mas o nível de LH seja elevado pode tratar-se de um caso de SOP. O estradiol é indicativo da qualidade folicular (DGS, 2008).

O **fator tubo-peritoneal** representa a maior causa de infertilidade feminina, podendo ter origem em diversos fatores de risco (Roupa *et al.*, 2009). A doença inflamatória pélvica (DIP) é a maior responsável por danos nas trompas, uma vez que pode levar ao surgimento de cicatrizes ou adesões pélvicas que provoquem obstruções nestas estruturas (Hickman *et al.*, 2008). Uma das maiores causas de DIP são as ITS, mais propriamente por *Chlamydia trachomatis* e/ou *Neisseria gonorrhoea* (Hickman *et al.*, 2008; Macaluso *et al.*, 2010). A história clínica de cirurgias pélvicas anteriores (apendicectomia, tubária, abdominal ou outra), gravidez ectópica anterior, antecedentes de abortamentos de repetição ou interrupção voluntária da gravidez (IVG) aumentam igualmente a probabilidade de uma patologia tubo-peritoneal (DGS, 2008; Gaspar e Carvalho, 2014). Também a endometriose pode provocar infertilidade, juntamente com sintomas de dismenorreia, dispareunia⁸, dor pélvica crónica e

⁸Dispareunia é o termo médico utilizado para descrever a dor genital ou pélvica intensa durante a relação sexual (Speroff, 1999c).

irregularidades menstruais (Hickman *et al.*, 2008). Esta patologia é caracterizada pela presença de glândulas endometriais e estroma em localização ectópica, tanto a nível peritoneal, ovárico (endometriomas) e rectovaginal, sendo as formas mais graves as de localização extra pélvica. Existem diversas teorias acerca da origem da endometriose, sendo a mais aceite o refluxo menstrual retrógrado (Gaspar e Carvalho, 2014). Não estão documentadas evidências de que o tratamento médico desta doença aumente a fertilidade (Bayer e Alper, 2012).

Para todas estas patologias serem devidamente identificadas e tratadas, é necessário recorrer ao estudo da permeabilidade tubar. A **histerossalpingografia** (HSG) é o exame padrão mais utilizado, principalmente pelo seu carácter minimamente invasivo (Gaspar e Carvalho, 2014). Contudo, é desconfortável e por vezes doloroso (Hickman *et al.*, 2008). Deve ser realizado na fase proliferativa do ciclo menstrual, recorrendo à injeção de um contraste no útero através de um cateter intracervical, o que vai permitir, por radiologia, visualizar o contraste a percorrer a cavidade endometrial e as trompas e, eventualmente, a difundir-se para a cavidade peritoneal (Frey e Patel, 2004; DGS, 2011). A HSG fornece informações relativas à oclusão tubária e a patologias, tais como hidrossalpinges, salpingites ou pólipos tubares, não sendo fiável na deteção de adesões peritubares (Lass, 2005). Para além de ser uma ferramenta de diagnóstico, a HSG tem demonstrado um efeito terapêutico através do arrastamento de eventuais tampões celulares ou mucosos, da ativação ciliar ou da quebra de adesões intratubárias (Bayer e Alper, 2012). Outro dos exames realizados para avaliação da permeabilidade tubar é a **histerossonosalpingografia**, em que é utilizado soro fisiológico ou contraste, sob controlo ecográfico, evitando a exposição a raios-X (Gaspar e Carvalho, 2014). Apesar de necessitar de experiência na técnica, este é um procedimento rápido, bem tolerado e, à semelhança da HSG, com efeito terapêutico (Hickman *et al.*, 2008). Existe ainda um outro exame para o estudo do fator tubo-peritoneal, a **laparoscopia**, indicada no caso de suspeita de patologia (endometriose, cirurgia pélvica anterior, DIP) ou de HSG alterada (Frey e Patel, 2004). Devido ao facto de ser um teste invasivo e dispendioso, é normalmente executado em casos específicos (Bayer e Alper, 2012). Para além da sua utilidade no diagnóstico de obstrução tubar ou de adesões peritubares, a laparoscopia possui também uma componente terapêutica, sendo possível a realização de pequenos procedimentos cirúrgicos para o tratamento de patologias existentes (Lass, 2005; Fauser e Devroey, 2011).

O **fator cervical** representa uma percentagem pequena dos casos de infertilidade feminina (Hickman *et al.*, 2008). A capacidade dos espermatozoides

conseguirem acesso à parte superior do trato genital feminino é influenciada pelo muco presente no canal cervical, cuja secreção e características são hormonodependentes. As falhas nesta condição podem, então, ser devido a relações sexuais fora do período aconselhável, produção inadequada de muco cervical, pobre qualidade espermática e ainda a cirurgias anteriores à zona cervical, sendo também importante a questão acerca do uso de lubrificantes (Bayer e Alper, 2012). Um método de avaliação do fator cervical é o teste pós-coital, que fornece informações sobre a qualidade e a quantidade do muco cervical, as interações esperma/muco e a presença de anticorpos antiesperma (Glazener *et al.*, 2000). Apesar da importância histórica deste teste, o seu uso não é recomendado por não ter um efeito significativo nas taxas de gravidez (Oei *et al.*, 1998; NICE, 2013). Adicionalmente, uma vez que nunca foi uma ferramenta uniformizada, possui reprodutibilidade desconhecida, com resultados subjetivos e variabilidade intra e inter observador (Hickman *et al.*, 2008).

O **fator uterino** contribui também para as causas de infertilidade na mulher, onde as disfunções presentes podem evitar o estabelecimento de uma gravidez (Bayer e Alper, 2012). As anomalias uterinas, que incluem fibromiomas, pólipos, adesões e sinéquias intrauterinas, endometrites e anomalias uterinas congénitas, estão associadas a abortamento recorrente e espontâneo (Lass, 2005). As mulheres que apresentem este historial de abortamento, juntamente com hemorragias vaginais irregulares ou cavidades uterinas anormais observadas por HSG, devem ser indicadas para uma avaliação mais aprofundada da morfologia da cavidade uterina (Bayer e Alper, 2012). A ecografia ginecológica transvaginal faz parte da avaliação de base da mulher, uma vez que apresenta um baixo custo e é de fácil execução (Gaspar e Carvalho, 2014). É de grande utilidade a sua realização durante a fase folicular tardia para a eventual deteção de patologia intracavitária (DGS, 2011). A HSG, utilizada na avaliação do fator tubo-peritoneal, também fornece informações acerca da cavidade uterina, tais como anomalias uterinas, fibromiomas, pólipos endometriais e adesões intrauterinas (Hickman *et al.*, 2008). Devido às suas limitações, a HSG requer uma avaliação mais aprofundada através do recurso a outros métodos (Bayer e Alper, 2012). Outro exame que pode ser realizado é a **histerossonografia**, que possui uma grande acuidade diagnóstica para a cavidade uterina e é de fácil execução (Marikinti, 2005). Recorrendo à injeção de uma solução salina na cavidade uterina, utilizada como contraste ecográfico, é possível a caracterização de patologias intra-cavitárias (pólipos e fibromiomas), sinéquias e malformações (Hickman *et al.*, 2008; Fauser e Devroey, 2011). Apesar de todos os métodos mencionados anteriormente serem bastante úteis, a **histeroscopia** é considerada o *gold standard* na avaliação da

cavidade uterina (Bettocchi *et al.*, 2004). A sua realização envolve a introdução de um histeroscópio no útero, juntamente com a distensão controlada da cavidade uterina com CO₂ ou com solução salina, o que permite a visualização direta da cavidade no monitor de um modo rápido, eficiente e bem tolerado pela paciente (Hickman *et al.*, 2008). A histeroscopia possibilita o estudo de anomalias uterinas e o diagnóstico diferencial de patologia intra-cavitária, bem como a realização de tratamentos, tais como polipectomia e lise de sinéquias (Bettocchi *et al.*, 2004; DGS, 2011). Apesar de todas estas vantagens, a histeroscopia é apenas utilizada para avaliação e tratamento de anomalias detetadas por métodos menos invasivos e mais baratos (HSG e histerossonografia) (Hickman *et al.*, 2008).

À semelhança do fator masculino, as **causas genéticas** na mulher são similarmemente responsáveis por alterações na fertilidade. A síndrome de Turner⁹ é uma alteração cromossómica numérica (45, X), sendo a maior responsável pela FOP (Louro, 2014). O seu mecanismo de ocorrência deve-se a um anormal emparelhamento dos cromossomas sexuais durante a meiose materna ou paterna (Laranjeira *et al.*, 2010). Os pacientes afetados são caracterizados por amenorreia devido à disgenesia gonádica, enquanto os portadores de mosaicismo podem ser férteis, apresentando amenorreia primária e função ovárica satisfatória (Mukhopadhaya, 2005). As anomalias cromossómicas estruturais podem estar igualmente presentes, tanto no cromossoma X como nos autossomas, levando a disgenesia gonádica e, conseqüentemente, a FOP, e ainda a anomalias uterinas (Huang e Rosenwaks, 2014).

⁹Síndrome de Turner representa uma anomalia cromossómica em que há uma monossomia total ou parcial do cromossoma X, em que os indivíduos afetados apresentam baixa estatura, baixo quociente de inteligência (QI), defeitos cardíacos congénitos e disgenesia gonádica (Laranjeira *et al.*, 2010).

3. Colheita, Preparação e Seleção de Gâmetas

3.1. Análise da Amostra Seminal

A análise da amostra seminal, também conhecida como espermograma, é o *gold standard* na investigação inicial masculina, possuindo um carácter pouco dispendioso e não invasivo (Agarwal *et al.*, 2008; Ferraz, 2014). Este teste permite avaliar o potencial de fertilidade do homem, providenciando informações acerca do estado funcional dos túbulos seminíferos (espermatogénese) e epidídimo, da permeabilidade dos ductos e da atividade das glândulas anexas (Alrabeeah e Zini, 2015; Moazzam *et al.*, 2015). Contudo, não é capaz de prever a capacidade fecundante dos espermatozoides (NAFA e ESHRE-SIGA, 2002).

A suspeita de um fator de infertilidade masculino ocorre nos casos em que os resultados dos parâmetros avaliados são inferiores aos valores mínimos de referência, sendo indicados para exames adicionais. Apesar disso, deve ser tido em conta que os valores mínimos de referência não são sinónimo de valores mínimos necessários para a conceção, e que homens com parâmetros fora dos limites de referência podem ser férteis. Reciprocamente, pacientes em conformidade com os valores podem ser inférteis (Cooper *et al.*, 2009). É também importante ter em consideração o facto dos parâmetros analisados poderem variar no mesmo indivíduo, sendo aconselhável realizar, pelo menos, dois espermogramas com um intervalo de 3 meses entre eles, correspondente à duração de uma nova espermatogénese (Esteves, 2014).

A colheita da amostra seminal deve ser realizada no laboratório, com recurso a masturbação, numa sala adequada e reservada unicamente para este efeito, sendo recolhida num recipiente de plástico esterilizado e devidamente identificado (Silverberg e Turner, 2012). Alguns homens revelam dificuldades em obter uma amostra em laboratório. Nestes casos, a colheita pode ser realizada em casa através de masturbação (NAFA e ESHRE-SIGA, 2002). Adicionalmente, em circunstâncias excecionais, a amostra pode ser colhida durante a relação sexual, recorrendo a preservativos especiais não tóxicos para os espermatozoides (WHO, 2010). Em ambas as situações, a amostra deve ser transportada junto ao corpo, de modo a minimizar as variações de temperatura, e entregue no laboratório no espaço de uma hora (preferencialmente, em meia hora) (NAFA e ESHRE-SIGA, 2002; Vasconcelos *et al.*, 2014).

O paciente deve receber algumas recomendações fundamentais para a maximização dos resultados do espermograma (NAFA e ESHRE-SIGA, 2002). Um

ponto de grande relevância é o tempo de abstinência sexual que, segundo a OMS (2010), deve situar-se num intervalo máximo entre 2 a 7 dias. Contudo, é aconselhável que esse período seja entre 2 a 5 dias (ASRM, 2012b). Um outro aspeto é a importância de obter todo o ejaculado no recipiente, uma vez que uma perda de amostra, principalmente da porção inicial (rica em espermatozoides) pode comprometer os resultados, devendo ser reportada. Por esta razão, juntamente com o risco de contaminação bacteriológica da amostra seminal, a colheita por coito interrompido é desaconselhada (WHO, 2010).

Em condições normais, o frasco de colheita é mantido numa estufa a 37°C enquanto a amostra liquefaz. A análise deve iniciar-se após a liquefação estar completa, preferencialmente 30 minutos após a ejaculação (WHO, 2010). Se a colheita foi realizada fora do laboratório, deve ser aquecida na incubadora durante 5 a 10 minutos antes de se iniciar o espermograma (NAFA e ESHRE-SIGA, 2002). A análise da amostra seminal inclui a avaliação de parâmetros macroscópicos (aparência visual, liquefação, viscosidade, volume e pH) e também microscópicos (motilidade, vitalidade, concentração e morfologia), com base nas orientações da OMS (WHO, 2010).

3.1.1. Parâmetros Macroscópicos

3.1.1.1. Aparência Visual

A amostra seminal liquefeita deve ter uma aparência homogénea e opalescente de tom acinzentado e com um odor neutro (Elder e Dale, 2011). A amostra pode apresentar-se menos opaca se a concentração de espermatozoides for baixa (WHO, 2010). Relativamente à cor, uma amostra amarelada é indicativa do consumo de vitaminas ou drogas ou também de icterícia, enquanto uma cor vermelha-acastanhada pode significar a presença de eritrócitos no ejaculado (NAFA e ESHRE-SIGA, 2002).

3.1.1.2. Liquefação

A liquefação corresponde a uma alteração natural na consistência da amostra seminal, que passa de um estado semi-sólido para um estado líquido e homogéneo, com a conseqüente libertação e distribuição dos espermatozoide pela amostra (Silverberg e Turner, 2012). Após a ejaculação, a amostra seminal é formada por um coágulo, que liquefaz naturalmente até um período de 60 minutos à temperatura ambiente, podendo ficar completa depois de 15 minutos. Em alguns casos, a amostra não liquefaz completamente após o período máximo, sendo necessário induzir o processo de liquefação por digestão enzimática ou manipulação mecânica (WHO,

2010). Uma amostra seminal aquosa, sem a presença de um coágulo, pode indiciar a inexistência de ducto ejaculatório ou de vesículas seminais (Silverberg e Turner, 2012). Por outro lado, a falha na liquefação pode representar uma disfunção enzimática da próstata (Flint *et al.*, 2012).

3.1.1.3. Viscosidade

A viscosidade diz respeito à tendência da amostra liquefeita para formar gotas a partir da ponta de uma pipeta (Silverberg e Turner, 2012). Após aspiração, deixa-se a amostra seminal cair através da gravidade, sendo observado o seu comportamento. Se a amostra cair em gotas individualizadas, é considerada normal. Por outro lado, se essas gotas formarem um fio com mais de 2 cm de comprimento trata-se de uma amostra com viscosidade aumentada. Os métodos para reduzir a viscosidade são os mesmos utilizados no caso da liquefação incompleta (WHO, 2010). A viscosidade aumentada interfere com a motilidade e concentração dos espermatozoides, sendo ainda indicativo de disfunções na atividade funcional das vesículas seminais e da próstata (WHO, 2010; Flint *et al.*, 2012).

3.1.1.4. Volume

O volume da amostra seminal pode ser medido com recurso a uma pipeta serológica (Silverberg e Turner, 2012). O valor mínimo de referência corresponde a 1,5 ml (WHO, 2010). Um baixo volume seminal pode corresponder a disfunções glandulares, perda de amostra ou a condições patológicas, tais como ejaculação retrógrada, agenesia congénita dos vasos deferentes ou obstrução do ducto ejaculatório. Por outro lado, um grande volume pode ser indicativo de inflamação nas glândulas anexas (Flint *et al.*, 2012).

3.1.1.5. pH

O pH é medido com recurso a papel indicador de pH, possuindo um valor mínimo de referência correspondente a 7.2. Este parâmetro reflete o balanço entre os valores de pH das secreções das diferentes glândulas anexas, devendo ser medido no espaço máximo de 1 hora, momento a partir do qual começa a ser influenciado pela perda de CO₂ (WHO, 2010). Um baixo valor de pH pode indicar infeção dos ductos genitais (Elder e Dale, 2011). Por sua vez, valores acima de 8.0 podem significar disfunções nas vesículas seminais (Flint *et al.*, 2012).

3.1.2. Parâmetros Microscópicos

De um modo geral, os parâmetros microscópicos permitem a avaliação da espermatogénese (Agarwal *et al.*, 2008). Uma observação inicial da preparação a fresco providencia uma visão geral da amostra, permitindo identificar casos de azoospermia ou oligospermia grave, verificar a presença de agregação e aglutinação da amostra seminal e de outras células que não espermatozoides e ainda determinar a diluição necessária para a contagem da concentração. Em cada alíquota retirada para a avaliação dos diferentes parâmetros, a amostra deve ser bem misturada, de modo a garantir a homogeneidade e a reprodutibilidade dos dados (WHO, 2010).

3.1.2.1. Motilidade

A motilidade é uma das características com maior relevância na avaliação da função e qualidade espermática (Flint *et al.*, 2012; Partyka *et al.*, 2012). Este parâmetro encontra-se diretamente relacionado com a obtenção de fertilização e gravidez, uma vez que o espermatozoide tem de possuir uma motilidade satisfatória para percorrer o percurso desde que é depositado na vagina até ao interior do ovócito (Silverberg e Turner, 2012).

A motilidade deve ser analisada logo após liquefação, de forma a evitar os efeitos prejudiciais da desidratação, da alteração do pH ou de mudanças de temperatura. Para tal, é necessário proceder à preparação de uma lâmina com uma alíquota de 10 µl da amostra a fresco e homogeneizada, que é coberta com uma lamela de 22mm x 22mm, evitando a formação de bolhas (WHO, 2010). A lâmina é observada ao microscópio ótico de contraste de fase numa ampliação de 400x, sendo a contagem iniciada assim que haja paragem do arrastamento da amostra (NAFA e ESHRE-SIGA, 2002; Elder e Dale, 2011). Tanto as lâminas como o frasco de colheita com a amostra devem ser mantidos a 37°C com recurso a uma placa de aquecimento para garantir a correta identificação das diferentes categorias (WHO, 2010; Partyka *et al.*, 2012).

A contagem da motilidade deve englobar a classificação de 200 espermatozoides em, pelo menos, cinco campos distintos, diferenciando-os entre progressivos rápidos, progressivos lentos, móveis *in situ* e imóveis, contados segundo esta ordem (Tabela 2) (WHO, 2010). A motilidade deve ser avaliada numa nova preparação, de modo a detetar e minimizar erros. Se for verificada uma grande diferença na comparação dos valores de ambas as contagens, estas devem ser

repetidas (NAFA e ESHRE-SIGA, 2002). Os resultados devem ser reportados sob a forma de percentagem média de cada categoria (WHO, 2010).

Tabela 2 – Sistema de classificação das diferentes categorias de motilidade¹⁰. Adaptado de NAFA e ESHRE-SIGA (2002).

Categoria	Classe	Velocidade
Progressivos rápidos ^a	a	≥25 µm/s (ou o comprimento de 5 cabeças/s)
Progressivos lentos ^a	b	5-24 µm/s
Móveis <i>in situ</i> ^b	c	< 5 µm/s (ou < que o comprimento de 1 cabeça/s)
Imóveis ^c	d	-

^aMotilidade progressiva: os espermatozoides movem-se ativamente, tanto de forma linear como em grandes círculos, independentemente da velocidade; ^bMóveis *in situ*: inclui todos os padrões de motilidade com ausência de progressão (por exemplo, nadar em pequenos círculos ou apenas com movimento flagelar); ^cImóveis: ausência de movimento, sem atividade flagelar (WHO, 2010).

3.1.2.2. Vitalidade

O estudo da vitalidade permite avaliar a integridade da membrana celular dos espermatozoides (AUA, 2010). Apesar de ser realizada por rotina, esta análise é sobretudo importante em amostras com uma motilidade progressiva inferior a 40%, uma vez que possibilita a distinção dos espermatozoides imóveis em vivos e mortos. Este teste funciona ainda como uma verificação da motilidade, dado que a percentagem de células mortas não deve exceder a de células imóveis. Normalmente, a percentagem de espermatozoides vivos excede a de espermatozoides móveis (WHO, 2010). Existem dois métodos capazes de estudar a integridade da membrana.

O **método da eosina Y** é o método de coloração mais utilizado, baseado no princípio de que os espermatozoides não viáveis, cuja integridade da membrana está comprometida, são facilmente corados. Por outro lado, os espermatozoides viáveis, ao possuírem a membrana celular intacta, não permitem a entrada do corante (Agarwal *et al.*, 2008; ASRM, 2012b). Neste teste, são



Fig. 13 – Realização de um esfregaço. A alíquota da suspensão espermática (S) colocada numa extremidade da lâmina é espalhada no sentido da outra extremidade (na direção da seta) com recurso a outra lâmina. Adaptado de WHO (2010).

adicionados 10 µl do corante a uma alíquota de 10 µl da amostra homogeneizada, deixando atuar por 5 minutos. Após este período, realiza-se um esfregaço (Figura 13) com 10 µl da mistura anterior e procede-se à contagem de 200 espermatozoides ao

¹⁰Esta categorização da motilidade está de acordo com o descrito na edição anterior do manual da OMS (4ª edição, 1999). Na nova atualização (5ª edição, 2010), as classes a e b foram combinadas na chamada 'motilidade progressiva'. Apesar de esta modificação ter sido concebida para tornar a avaliação da motilidade mais objetiva, acaba por revelar uma menor precisão e um efeito pouco claro do impacto na fertilidade masculina (Agarwal *et al.*, 2008).

microscópio ótico de campo brilhante com uma ampliação de 400x, distinguindo-os entre vivos (cor branca) e mortos (corados de rosa escuro ou vermelho) (Adaptado de WHO, 2010). A presença de uma grande proporção de células vivas mas imóveis pode indicar defeitos estruturais no flagelo, enquanto uma grande percentagem de espermatozoides imóveis e não viáveis (necrozoospermia) pode ser indicativo de patologia nos epidídimos (WHO, 2010).

O **método da hipoosmolaridade** tem por base a semi-permeabilidade da membrana plasmática intacta de uma célula. Os espermatozoides são expostos a uma solução hipoosmótica, causando turgescência nos que estão viáveis, dado que todas as células vivas são permeáveis à água (Silverberg e Turner, 2012). Enquanto os espermatozoides mortos não apresentam alterações, as células vivas são identificadas pelo enrolamento do flagelo (Figura 14) (Flint *et al.*, 2012). Para esta alteração ser detetada num microscópio ótico de contraste de fase (400x), adiciona-se 90 µl de solução hipoosmótica a uma alíquota de 10 µl da amostra seminal homogeneizada e incuba-se a 37°C durante 30 minutos. Após este período, é colocada uma alíquota de 10 µl da mistura sobre uma lâmina e coberta com uma lamela de 22mm x 22mm, procedendo-se à contagem de 200 espermatozoides, distinguindo-os entre vivos (flagelo enrolado) e mortos (flagelo esticado) (Adaptado de WHO, 2010). Uma das aplicações deste método passa pela seleção de espermatozoides viáveis para ICSI, especialmente em casos onde todos os espermatozoides são imóveis (Silverberg e Turner, 2012).

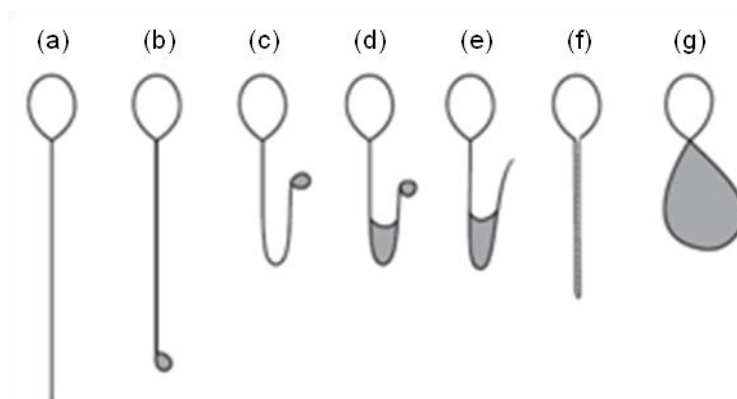


Fig. 14 – Representação esquemática das alterações morfológicas típicas em espermatozoides humanos sujeitos ao teste da hipoosmolaridade. A turgescência está representada a cinzento. (a) Sem alteração; (b)-(g) Vários tipos de alterações no flagelo. Adaptado de WHO (2010).

Para ambos os métodos, os resultados correspondem à proporção de espermatozoides viáveis, apresentados sob a forma de percentagem, devendo ser próximos um do outro (NAFA e ESHRE-SIGA, 2002; WHO, 2010). O valor mínimo de referência é de 58% (WHO, 2010).

3.1.2.3. Concentração

A concentração da amostra seminal é definida como o número de espermatozoides em milhões por unidade de volume da amostra. Este parâmetro não deve ser confundido com o número total de espermatozoides, que corresponde ao número de espermatozoides presente no ejaculado (WHO, 2010). Estes dois termos estão relacionados com a previsão da fertilização e as taxas de gravidez (Flint *et al.*, 2012).

A concentração deve ser determinada com recurso a diluições volumétricas e a um hemocitómetro, sendo a câmara de contagem de Neubauer o *gold standard* da contagem de espermatozoides (Agarwal *et al.*, 2008). Esta câmara apresenta duas câmaras de contagem, onde cada uma delas é dividida em 9 grelhas. A grelha central possui 25 quadrados grandes, cada um contendo 16 quadrados pequenos, ambos rodeados por linhas triplas (Figura 15) (WHO, 2010).

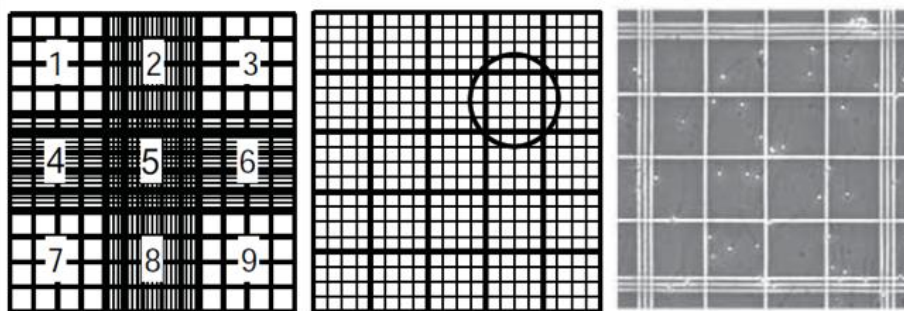


Fig. 15 – Esquemas da grelha de contagem da câmara de Neubauer. Esta câmara apresenta duas câmaras de contagem, onde cada uma possui uma grelha de 3mm x 3mm, e requer uma lamela de espessura especial, suportada 0,1 mm acima da base. Cada área de contagem é dividida em nove grelhas de 1mm x 1mm cada (à esquerda). A grelha central consiste em 25 quadrados grandes rodeados por linhas triplas (ao centro), onde cada um desses quadrados contém 16 quadrados pequenos, também eles rodeados por linhas triplas (à direita). Com uma ampliação de 400x, apenas é possível observar um quadrado grande no mesmo campo de visão. Adaptado de WHO (2010).

Para a avaliação da concentração, são adicionados 50 µl da amostra seminal homogeneizada a um determinado volume de solução fixadora, de acordo com o fator de diluição estabelecido durante a visualização da amostra a fresco (Tabela 3) (WHO, 2010). De modo a garantir a exatidão da diluição, é obrigatório o uso de pipetas de deslocamento positivo (Mortimer e Mortimer, 2005). Após montagem da câmara de Neubauer, esta é carregada com uma alíquota de 10 µl da diluição preparada e colocada numa câmara húmida à temperatura ambiente durante 30 minutos, de modo a ocorrer a sedimentação dos espermatozoides na grelha (WHO, 2010).

Tabela 3 – Determinação do fator de diluição necessário para avaliação da concentração, de acordo com o número de espermatozoides observados na amostra a fresco (não diluída) na ampliação de 400x. Adaptado de WHO (2010).

Espermatozoides por campo (ampliação x400)	Diluição	Amostra seminal (µl)	Fixador (µl)
>101	1:20 (1+19)	50	950
16-100	1:5 (1+9)	50	200
<15	1:2 (1+1)	50	50

Existem regras rigorosas na contagem de espermatozoides em hemocitómetros, de modo a assegurar a precisão dos resultados (Mortimer e Mortimer, 2005). A contagem deve ser realizada ao microscópio ótico de contraste de fase (400x), sendo necessário determinar o número de quadrados que devem ser contados. Esta determinação é obtida através da contagem do primeiro quadrado da grelha e do número de espermatozoides contabilizados, segundo os critérios da tabela 4. A intenção é contar, pelo menos, 200 espermatozoides em cada grelha (NAFA e ESHRE-SIGA, 2002). São contados todos os espermatozoides no interior do quadrado, bem como aqueles cujas cabeças se encontram no limite das linhas triplas. De modo a evitar a contagem dos mesmos espermatozoides em quadrados adjacentes, selecionam-se sempre as mesmas margens para contagem. Apenas os espermatozoides completos devem ser contados, sendo excluídos os que possuem apenas flagelo (*pinheads*) ou cabeças sem flagelo (WHO, 2010).

Tabela 4 – Determinação do número de quadrados que devem ser contados e do fator de conversão para o cálculo da concentração, sendo este fator dependente da diluição prévia e do número de quadrados contados. Para a determinação precisa de amostras com baixa concentração de espermatozoides, é recomendada a contagem dos 25 quadrados da grelha. Adaptado de NAFA e ESHRE-SIGA (2002).

Nº espermatozoides no 1º quadrado	Nº de quadrados a contar	Diluição			
		1:2	1:5	1:10	1:20
<10	25	100	40	20	10
10-40	10	40	16	8	4
>40	5	20	8	4	2

O cálculo da concentração, em milhões/ml (10^6 /ml), é obtido através da divisão da média das duas contagens realizadas pelo fator de conversão adequado (Tabela 4), tendo um valor mínimo de referência de 15×10^6 /ml. Relativamente ao número total de espermatozoides (10^6 /ejaculado), resultado do produto da concentração e do volume da amostra seminal, possui um valor mínimo de referência de

39x10⁶/ejaculado. As amostras com valores abaixo destes limites são indicativos de casos de criptozoospermia e de suspeita de azoospermia¹¹ (WHO, 2010).

3.1.2.4. Morfologia

A morfologia é um parâmetro bastante útil no prognóstico da fertilidade, na medida em que existe uma relação entre a percentagem de formas espermáticas normais e as taxas de fertilização e de gravidez (WHO, 2010). Por outro lado, não existem evidências de que uma morfologia anormal esteja associada a um aumento das taxas de abortamento espontâneo (Agarwal *et al.*, 2008). Apesar da variabilidade morfológica dos espermatozoides humanos tornar a sua avaliação difícil, o estudo de espermatozoides recuperados a partir do trato genital feminino, particularmente em muco cervical pós-coital, e também a partir da superfície da ZP, ajudou a definir a aparência de um espermatozoide “ideal” (com potencial de fertilização), apresentado na figura 16 (WHO, 2010). Este parâmetro pode ser de grande importância na decisão do tratamento a aplicar ao casal infértil, uma vez que formas anormais são mais propensas a possuírem a motilidade comprometida bem como falhas na ligação à ZP (Flint *et al.*, 2012; Silverberg e Turner, 2012).

A avaliação da morfologia implica a realização de um esfregaço com uma alíquota de 10 µl da amostra homogeneizada (o volume pode ser ajustado de acordo com a concentração) (NAFA e ESHRE-SIGA, 2002). A lâmina é deixada a secar ao ar, sendo fixada com metanol e depois corada com recurso aos corantes Papanicolau e Shorr. Devem ser contados pelo menos 200 espermatozoides ao microscópio ótico de campo claro usando a objetiva de óleo de imersão (1000x), com base em critérios de classificação (WHO, 2010). Entre os vários sistemas de classificação morfológica, o recomendado pelo manual da OMS (2010) é o critério estrito de Tygerberg, descrito em 1986 por Kruger e colaboradores, que recomenda uma simples distinção entre forma normal ou anormal, podendo ainda incluir a localização específica da anomalia (Figuras 17, 18 e 19). É, então, necessário o espermatozoide possuir as seguintes características morfológicas:

- Cabeça – lisa, de contorno regular e forma oval, com um acrossoma bem definido que compreende entre 40 a 70% da área da cabeça (WHO, 2010).

¹¹Em casos de suspeita de azoospermia é importante as amostras serem centrifugadas. Uma amostra só é considerada azoospermica quando não são observados espermatozoides no *pellet* resultante da centrifugação (WHO, 2010). Nestas situações, procede-se apenas à avaliação dos parâmetros macroscópicos e à realização de um esfregaço para a morfologia após centrifugação.

A região do acrossoma, que não deve conter vacúolos grandes nem mais do que dois vacúolos pequenos, surge corada com um tom mais pálido (azul claro), enquanto a região posterior apresenta-se mais escura (azul escuro) (NAFA e ESHRE-SIGA, 2002; WHO, 2010).

- Peça intermédia – delgada, regular e aproximadamente do mesmo comprimento da cabeça, possuindo uma espessura ligeiramente superior ao flagelo (WHO, 2010; Silverberg e Turner, 2012). O seu eixo principal deve estar alinhado com o eixo principal da cabeça. Os restos citoplasmáticos não devem exceder 1/3 do tamanho da cabeça (WHO, 2010).
- Cauda – uniforme, mais fina do que a peça intermédia e com um comprimento aproximado de 45 μm . Pode ser enrolada sobre si mesma, desde que não haja um ângulo agudo indicativo de quebra flagelar (WHO, 2010).

Apenas os espermatozoides intactos (com cabeça e cauda) devem ser incluídos na contagem. A presença de células germinativas imaturas bem como de leucócitos deve ser reportada. Cada espermatozoide sem qualquer defeito morfológico é definido como normal (Figura 16). Todos os desvios às características descritas anteriormente são representativos de formas anormais, podendo ser expressos em percentagem para a região em causa (NAFA e ESHRE-SIGA, 2002). O valor mínimo de referência para formas normais é de 4% (WHO, 2010).



Fig. 16 – Microfotografia de um espermatozoide morfolologicamente normal. Adaptado de WHO (2010).

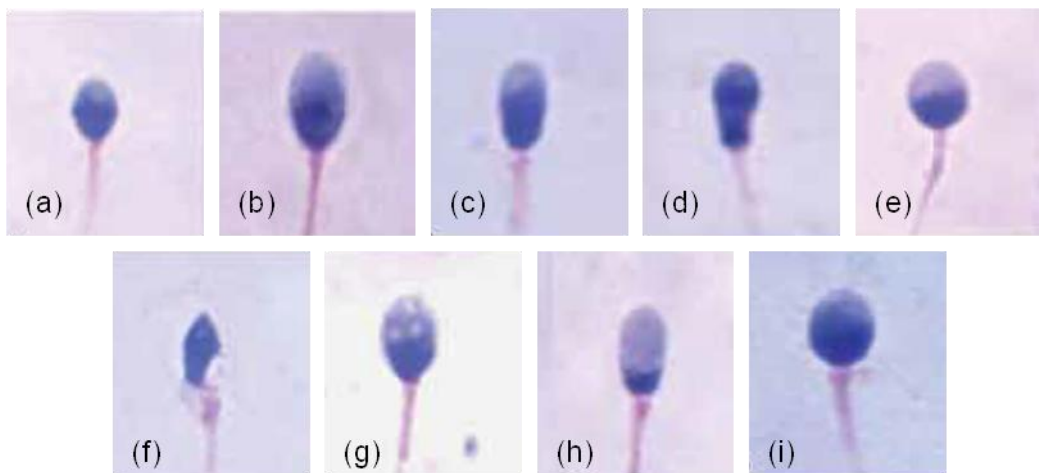


Fig. 17 – Microfotografias de espermatozoides apresentando anomalias da cabeça. (a) Microcefalia; (b) Macrocefalia; (c) Afunilada; (d) Piriforme; (e) Redonda; (f) Amorfa; (g) Vacuolizada (com mais de dois vacúolos ou mais de 20% da área da cabeça ocupada por vacúolos); (h) Acrossoma grande (>70% do tamanho da cabeça); e (i) Acrossoma pequeno (<20% do tamanho da cabeça). Adaptado de WHO (2010).

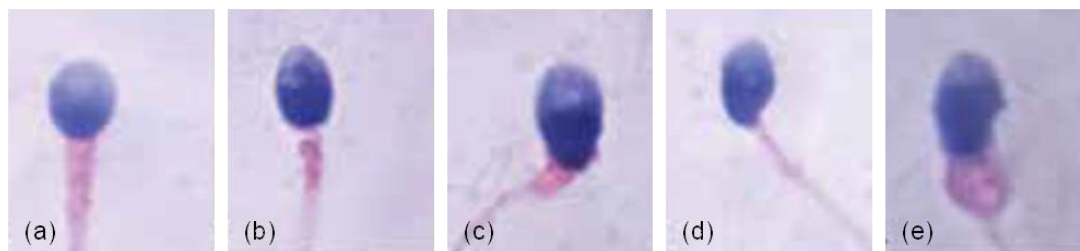


Fig. 18 – Microfotografias de espermatozoides apresentando anomalias da peça intermédia. (a) Espessa; (b) Irregular; (c) Dobrada; (d) Inserção anómala; e (e) Restos citoplasmáticos. Adaptado de WHO (2010).



Fig. 19 – Microfotografias de espermatozoides apresentando anomalias da cauda. (a) Enrolada; (b) Dobrada, e (c) Dupla. Adaptado de WHO (2010).

3.1.2.5. Outras Células que não Espermatozoides

Por norma, a amostra seminal possui outros elementos celulares para além dos espermatozoides, tais como células epiteliais do trato genital, células germinativas imaturas (espermatócitos e espermátides) e ainda leucócitos (Figura 20). Por vezes surgem também eritrócitos, bactérias e protozoários (Mortimer e Mortimer, 2005).

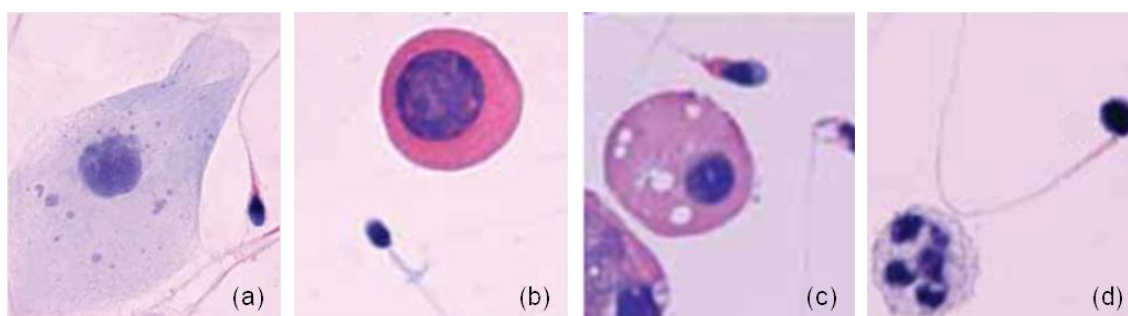


Fig. 20 - Microfotografias de outros elementos celulares que não espermatozoides. (a) Célula epitelial do trato genital masculino; (b) Espermatócito; (c) Espermátide; e (d) Leucócito. Adaptado de WHO (2010).

A presença de algumas destas células pode ser clinicamente relevante (WHO, 2010). Os leucócitos são as células mais comuns e significativas dentro dos elementos celulares não espermáticos (Silverberg e Turner, 2012). Uma concentração superior a 10^6 leucócitos/ml pode indiciar uma infeção na uretra ou nas glândulas anexas, que

causa um aumento na produção de metabolitos tóxicos que, por sua vez, levam ao surgimento de *stress* oxidativo. Este estado tem um impacto negativo na qualidade espermática, particularmente ao nível da motilidade, de danos na membrana acrossómica e de defeitos no flagelo, contribuindo para a diminuição da fertilidade (Silverberg e Turner, 2012; Moazzam *et al.*, 2015). Nestes casos, deve ser realizada uma cultura da amostra de modo a identificar o organismo causador da infeção bem como o tratamento apropriado (Silverberg e Turner, 2012). Também o surgimento de eritrócitos em grande quantidade pode ser indicativo de infeção, inflamação ou obstrução nos ductos (Agarwal *et al.*, 2008). Por sua vez, a presença de células espermáticas imaturas pode sugerir dano testicular, devendo ser contadas e classificadas durante a avaliação morfológica. O resultado deve ser expresso em número de células imaturas/100 espermatozoides (WHO, 2010).

3.1.2.6. Anticorpos Anti-espermatozoides

Uma examinação inicial da amostra seminal permite a deteção de aglutinação. A aglutinação de espermatozoides, com ligações entre si de cabeça-cabeça, flagelo-cabeça ou flagelo-flagelo, pode ser indicativa da presença de anticorpos na amostra (Silverberg e Turner, 2012). Casos de aglutinação em grande quantidade podem afetar a avaliação da motilidade e concentração espermáticas. Esta condição não deve ser confundida com a agregação¹² (WHO, 2010).

O início de uma resposta imune contra os espermatozoides pode iniciar-se se houver uma quebra na barreira hematotesticular, causada por vasectomia, reparação do varicocele, biópsia testicular, torção testicular, trauma ou infeção (ASRM, 2012b). Também no trato genital feminino pode ocorrer formação de anticorpos anti-espermatozoides (Mortimer e Mortimer, 2005). Em ambas as situações, pode haver interferência no processo de transporte e fertilização, principalmente ao nível da ligação à ZP e da reação acrossómica em casos em que os anticorpos se ligam à cabeça dos espermatozoides (NAFA e ESHRE-SIGA, 2002; Mortimer e Mortimer, 2005).

Os anticorpos anti-espermatozoides presentes na amostra seminal pertencem quase exclusivamente a duas classes de imunoglobulinas (Ig): IgA e IgG (WHO). A

¹²A agregação é caracterizada pela adesão de espermatozoides imóveis uns aos outros ou de espermatozoides móveis ao muco, a células não espermáticas ou a detritos celulares; não é associada à presença de anticorpos (WHO, 2010).

sua deteção pode ser realizada com recurso a dois métodos, o teste MAR (*Mixed Antiglobulin Reaction*) e o teste IBT (*Immunobead Test*). Eles diferem ligeiramente na abordagem e metodologia, mas a sua interpretação baseia-se na identificação de espermatozoides móveis com esferas cobertas por imunoglobulinas ligadas a si (Elder e Dale, 2011). Enquanto o teste MAR não deteta especificamente as classes de imunoglobulinas em causa, as esferas de látex do teste IBT permitem distinguir o tipo de anticorpo envolvido (IgA ou IgG) e ainda a localização específica da ligação da esfera ao espermatozoide (Silverberg e Turner, 2012).

3.1.3. Valores Mínimos de Referência

Os resultados da análise da amostra seminal devem ser comparados com os valores de referência da OMS, apresentados na tabela 5 (WHO, 2010). A análise deve ser executada criteriosamente, de modo a auxiliar no planeamento da estratégia terapêutica do casal infértil. O desenvolvimento de novos marcadores de fatores de infertilidade masculina (testes de função espermática), que permitam detetar a causa exata da disfunção espermática, seria vantajoso na complementação do processo de diagnóstico e tratamento (Moazzam *et al.*, 2015).

Tabela 5 – Valores mínimos de referência para os parâmetros analisados na amostra seminal. Adaptado de WHO (2010).

Parâmetros	Valores mínimos de referência
Volume do ejaculado	1,5 ml
Cor	Amarelo/Branco grisalho
Cheiro	<i>sui generis</i>
Viscosidade	Normal
Liquefação	Completa aos 60 minutos
pH	7.2
Concentração	15 x 10 ⁶ /ml
Número total de espermatozoides	39 x 10 ⁶ /ejaculado
Motilidade	
• Progressiva (rápida + lenta) + móveis <i>in situ</i>	40%
• Progressiva (rápida + lenta)	32%
Vitalidade	58%
Hipoosmolaridade	58%
Morfologia	4%
Leucócitos	<1 x 10 ⁶ /ml
Células da linha germinativa	
• Espermatogónias	<3/100 espermatozoides
• Espermatócitos primários	<3/100 espermatozoides
• Espermatócitos secundários	<3/100 espermatozoides
• Espermátides	<3/100 espermatozoides
Aglutinação	Ausente

3.1.4. Nomenclatura

A nomenclatura descrita na tabela 6 é utilizada para descrever os desvios aos valores mínimos de referência, recorrendo a termos específicos em vez de números. Esta nomenclatura apenas classifica a qualidade da amostra seminal, não possuindo qualquer causa biológica.

Tabela 6 – Nomenclatura relativa aos diversos parâmetros de análise da amostra seminal e seus desvios dos valores mínimos de referência. O sufixo ‘-spermia’ refere-se ao ejaculado, enquanto o sufixo ‘-zoospermia’ é direcionado aos espermatozoides. Adaptado de WHO (2010).

Nomenclatura	Descrição
Aspermia	Ausência de amostra seminal
Astenozoospermia	% de motilidade progressiva abaixo do valor mínimo de referência
Azoospermia	Ausência de espermatozoides no ejaculado
Criptozoospermia	Ausência de espermatozoides no ejaculado, mas presentes no <i>pellet</i> após centrifugação (<100 000 de espermatozoides no ejaculado)
Hemospermia (Hematospermia)	Presença de eritrócitos no ejaculado
Hipospermia	Volume do ejaculado abaixo do valor mínimo de referência
Leucospermia (Piospermia)	Presença de leucócitos no ejaculado
Necrozoospermia	% baixa de espermatozoides vivos e % alta de espermatozoides imóveis no ejaculado
Normozoospermia	Concentração (ou nº total de espermatozoides) e % de motilidade progressiva e de morfologia \geq ao valor mínimo de referência
Oligozoospermia	Concentração (ou nº total de espermatozoides) abaixo do valor mínimo de referência
Teratozoospermia	% de morfologia normal abaixo do valor mínimo de referência

3.2. Métodos de Colheita da Amostra Seminal

Os espermatozoides necessários para tratamento dos casais inférteis podem ser obtidos de variadas formas (Agarwal *et al.*, 2008). Para homens clinicamente saudáveis, a masturbação é o método base de colheita, devendo ser seguidas as mesmas indicações referidas na secção 3.1. (Jeyendran e Niederberger, 2003). Sob certas circunstâncias, a masturbação por si só pode revelar-se insuficiente para a obtenção de espermatozoides, sendo importante recorrer a técnicas e procedimentos clínicos, de acordo com as necessidades dos pacientes (Nani e Jeyendran, 2003).

Em casos de pacientes que sofreram lesões na espinal medula deve ser utilizada a estimulação vibratória peniana ou a eletroejaculação. A estimulação

envolve a colocação de um vibrador forte na cabeça do pénis que leva à estimulação e consequente ejaculação. Por sua vez, na eletroejaculação ocorre a libertação de impulsos elétricos a partir de uma sonda colocada no reto, junto à próstata, promovendo a ejaculação (ASRM, 2015). Ejaculados obtidos através destes dois métodos tendem a ter altas concentrações, com motilidade diminuída e contaminação por eritrócitos (Bossert e De Jonge, 2007).

A ocorrência de disfunções ejaculatórias, principalmente de ejaculação retrógrada ou de anejaculação, também implica a utilização de métodos alternativos. Na ejaculação retrógrada, caracterizada pela ausência total ou parcial de ejaculado como resultado da passagem do fluxo seminal para a bexiga durante o orgasmo, os gâmetas masculinos podem ser recuperados a partir da urina pós-orgasmo (EAU, 2015). Nestes casos, recorre-se à alcalinização e processamento da amostra por centrifugação, sendo os espermatozoides obtidos utilizados em técnicas de PMA (Lazarou, 2012). Por outro lado, a anejaculação envolve a ausência total de ejaculado devido à falha total da emissão da amostra seminal para a uretra (EAU, 2015). Esta incapacidade pode resultar de lesões na espinal medula, problemas neurológicos, diabetes ou tratamento de cancro testicular (Schoor *et al.*, 2003). A anejaculação deve ser eficientemente diferenciada da ejaculação retrógrada recorrendo ao teste de urina pós-orgasmo, que se deve apresentar não viscosa e sem a presença de espermatozoides e frutose (Nani e Jeyendran, 2003).

Para alguns pacientes, apesar da ocorrência de ejaculação ser possível, a amostra pode revelar azoospermia, sendo necessário recorrer a métodos mais invasivos (Jeyendran e Niederberger, 2003). Esta ausência de gâmetas no ejaculado pode ser devido a causas obstrutivas ou não obstrutivas (Schoor *et al.*, 2003). A azoospermia obstrutiva (AO – *obstructive azoospermia*) deve-se a um bloqueio nos ductos genitais, nomeadamente ao nível do ducto ejaculatório, dos ductos deferentes ou do epidídimo (Brannigan, 2003). As causas desta patologia podem ser adquiridas (vasectomia, infeções, traumas testiculares ou cirurgias prévias nas regiões afetadas) ou, então, congénitas (fibrose quística, agenesia congénita dos vasos deferentes, quistos prostáticos ou do ducto ejaculatório) (Esteves e Verza Jr., 2012). Homens com OA podem manter a produção normal de espermatozoides, constituindo bons candidatos para a correção cirúrgica da obstrução ou, caso a OA seja irreversível, para a recuperação de espermatozoides diretamente a partir do trato genital masculino (Jeyendran e Niederberger, 2003). Por sua vez, a azoospermia não obstrutiva (NOA – *nonobstructive azoospermia*) é derivada de falha ao nível testicular, causada por hipogonadismo, paragem na espermatogénese ou SCO (Hirsh, 2005). Nestes

casos, a recuperação de espermatozoides pelo mesmo método da OA é menos provável (Schoor *et al.*, 2003).

O desenvolvimento de técnicas cirúrgicas para recuperar espermatozoides diretamente a partir do epidídimo e dos testículos tornou possível que pacientes com OA e NOA pudessem ser submetidos a tratamentos de PMA (Elder e Dale, 2011). Os espermatozoides podem ser obtidos através do epidídimo com recurso a dois métodos, utilizados em casos de OA (Pereira, 2014):

- Aspiração microcirúrgica de espermatozoides no epidídimo (MESA – *Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration*): após exposição do epidídimo por incisão escrotal, um túbulo dilatado do epidídimo é microdissecado e aberto, de modo a permitir a aspiração de fluido contendo espermatozoides (Shin e Turek, 2013).
- Aspiração percutânea de espermatozoides no epidídimo (PESA – *Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration*): o epidídimo é estabilizado enquanto uma agulha, inserida nesta estrutura através da pele escrotal, faz a recolha do fluido contendo espermatozoides por pressão negativa (Leung *et al.*, 2014).

A extração testicular de espermatozoides é atualmente usada por rotina em casos de OA, principalmente quando as técnicas descritas anteriormente não são bem-sucedidas, sendo ainda essencial para homens com falha testicular (NOA) (Shin e Turek, 2013). Existem também dois métodos distintos:

- Aspiração testicular de espermatozoides (TESA – *Testicular Sperm Aspiration*): é inserida percutaneamente uma agulha no testículo após a sua estabilização. A pressão negativa criada pela seringa, juntamente com o movimento da agulha, permite o rompimento dos túbulos seminíferos e a recolha de fragmentos de tecido testicular de diferentes áreas. Apresenta uma baixa eficácia de recuperação de gâmetas em NOA (Esteves *et al.*, 2011).
- Extração testicular de espermatozoides (TESE – *Testicular Sperm Extraction*): após anestesia local e estabilização do testículo, é executada uma incisão até à túnica albugínea, de modo a expor o tecido testicular e a permitir a obtenção de um fragmento (Leung *et al.*, 2014). Podem ser retirados mais fragmentos da mesma incisão ou a partir de outros pontos usando múltiplas incisões, importante em casos de espermatogénese

pontual em indivíduos com NOA, sendo o método preferencial e com maior eficiência nestas situações (Esteves *et al.*, 2011; Pereira, 2014).

Tanto na TESA como na TESE, os fragmentos obtidos são dissecados ao microscópio em meio de lavagem aquecido (Elder e Dale, 2011). Deste modo, é possível investigar a presença de espermatozoides na suspensão e proceder à sua posterior utilização em técnicas de PMA (Bossert e De Jonge, 2007).

3.3. Processamento da Amostra Seminal

Após a análise e obtenção da amostra seminal e/ou de espermatozoides, é necessário realizar o seu processamento para que possam ser efetivamente utilizados em procedimentos de PMA (Jeyendran, 2003). Este processamento deve mimetizar as funções fisiológicas do aparelho reprodutor feminino, com o objetivo de obter uma amostra rica em espermatozoides móveis e funcionalmente competentes (Jeyendran e Zhang, 2003). Para tal, é fundamental a eliminação do plasma seminal, espermatozoides mortos, restos celulares e outras células, tais como bactérias e leucócitos. Esta técnica deve ainda eliminar fatores prejudiciais à capacitação e fertilização e também substâncias tóxicas, onde se destacam as espécies reativas de oxigénio (Bossert e De Jonge, 2007).

A preparação da amostra deve ser executada numa câmara de fluxo laminar e em condições de assepsia, reduzindo o risco de contaminação durante a cultura de ovócitos e embriões (Mitchell, 2005). Assim que a liquefação estiver completa, a amostra de espermatozoides deve ser analisada e processada. Uma alíquota de 10 µl é retirada após homogeneização para verificar a motilidade e a concentração da amostra (Bourne *et al.*, 2012). Se esta se revelar inesperadamente de baixa qualidade, deve ser requerida uma segunda amostra ao paciente (Bossert e De Jonge, 2007).

Por norma, o método de seleção de espermatozoides utilizado é a centrifugação por gradientes de densidade descontínuos, com recurso a partículas de sílica coloidal cobertas com silano, seguida de *swim up* (Bourne *et al.*, 2012). É baseado na capacidade dos espermatozoides móveis 'nadarem' ativamente através do material dos gradientes e formarem um *pellet* no fundo do tubo na direção da força de centrifugação. O processamento da amostra inicia-se com a preparação de dois

gradientes, de 1 ml cada¹³: um de 40% (v/v), que fica sobre um outro de 80% (v/v). A amostra é, então, homogeneizada e colocada no topo dos gradientes, sendo seguidamente centrifugada a 1200 rpm durante 25 minutos a 35°C (WHO, 2010). Da centrifugação resulta um *pellet* rico em espermatozoides móveis e normais, as partículas mais densas (Mitchell, 2005). O plasma seminal permanece no topo do tubo, enquanto os restos celulares, os espermatozoides imóveis e/ou com anomalias (cabeças amorfas e restos citoplasmáticos) e os outros tipos celulares se acumulam na interface dos dois gradientes e no gradiente de 40% devido à sua baixa densidade (Figura 21) (Elder e Dale, 2011; Mortimer e Mortimer, 2013). Assim, remove-se a maior parte do sobrenadante, sendo o *pellet* formado transferido para um novo tubo e ressuspenso em 2 ml de meio de cultura previamente aquecido a 37°C (Mortimer e Mortimer, 2005). Se inicialmente forem usados mais do que um gradiente para a mesma amostra, quer pelo grande volume ou pela boa qualidade da amostra, combinam-se os diferentes *pellets* num só tubo.

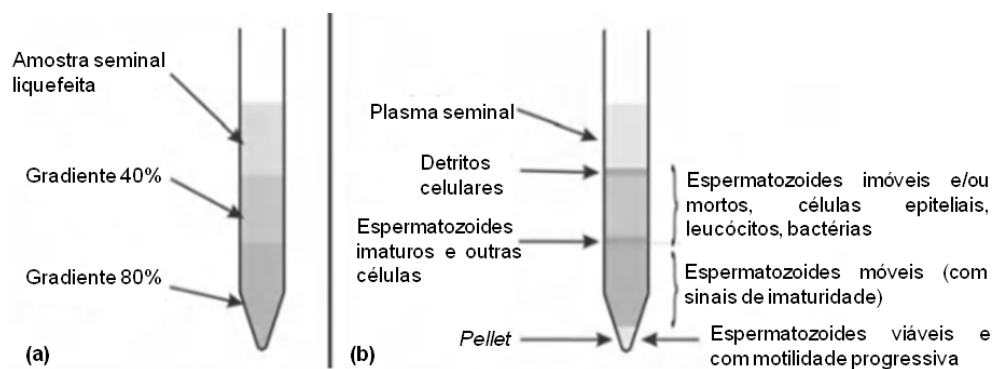


Fig. 21 – Centrifugação por gradientes de densidade descontínuos. (a) Posição dos gradientes de 40% e 80% e da amostra seminal antes da centrifugação; (b) Após a centrifugação, os espermatozoides móveis e normais acumulam-se no fundo do tubo (*pellet*), enquanto os espermatozoides imaturos e imóveis localizam-se na interface dos dois gradientes e no gradiente de 40%. O plasma seminal permanece no topo dos gradientes (Mortimer e Mortimer, 2013).

O novo tubo é centrifugado a 1200 rpm durante 10 minutos a 35°C para lavagem do *pellet*, assegurando a remoção dos gradientes de densidade (Bossert e De Jonge, 2007). O sobrenadante é novamente aspirado e descartado, ficando o menor volume possível de meio acima do *pellet*. Sem perturbar o sedimento, são adicionados até um máximo de 0,5 ml de meio de cultura, dependendo da concentração e da técnica a utilizar, para *swim up*. Esta segunda fase do processamento envolve a colocação do tubo com os espermatozoides já preparados

¹³Por rotina, prepara-se um volume final de 1ml para cada gradiente. Contudo, se a amostra apresentar oligozoospermia ou hipospermia, esse volume pode ser reduzido para metade, podendo ainda proceder-se à lavagem de espermatozoides apenas com meio de cultura (Elder e Dale, 2011).

numa estufa a 37°C, 6% CO₂ e 5% O₂, em posição inclinada (ângulo de 45°), durante cerca de 30 minutos para permitir a migração dos espermatozoides com motilidade progressiva para a superfície. A tampa do tubo não deve ser totalmente fechada, de modo a permitir as trocas gasosas e o equilíbrio da amostra (Elder e Dale, 2011).

3.4. Estimulação Ovária

A estimulação ovária controlada é uma componente essencial das técnicas de PMA, possibilitando a obtenção de múltiplos folículos por ciclo. O aumento do número de folículos e, conseqüentemente, do número de ovócitos colhidos, leva a maiores taxas de gravidez nas mulheres em ciclo, graças a um incremento no número de embriões disponíveis e também à possibilidade de prolongar a cultura de embriões e de selecionar os que possuem melhor qualidade para transferência (Drakopoulos *et al.*, 2016). Existem diferentes estimuladores ovários, que são utilizados de acordo com o caso clínico e com o objetivo do tratamento (Tabela 7) (Oskowitz, 2012).

Tabela 7 – Medicação mais comum para a estimulação ovária. Adaptado de Shoham e Howles (2009) e Santbrink e Fauser (2008).

Nome	Indicações	Mecanismo de ação
Citrato de clomifeno (CC)	Disfunções ovulatórias Oligomenorreia Amenorreia	Interfere com o <i>feedback</i> negativo do estrogénio ao nível hipotálamo-hipófise, inibindo-o e causando um aumento na libertação de GnRH e gonadotrofinas
Inibidores da aromatase (Letrozole)	Disfunções ovulatórias	Inibe a atividade da aromatase ^a , levando à redução da síntese de estrogénio e ao impedimento do <i>feedback</i> negativo por ele criado ao nível hipotálamo-hipófise, que resulta na libertação de GnRH e gonadotrofinas
Gonadotrofinas (hMG, FSH, LH)	Resistência ao CC Disfunções hipotalâmicas	Estimulação direta da dominância e crescimento de múltiplos folículos até à fase pré-ovulatória, por ação das gonadotrofinas exógenas

hMG – gonadotrofina menopáusic humana

^aA aromatase é uma enzima que catalisa a conversão de androgénios em estrogénios.

Uma das desvantagens da estimulação ovária passa por não impedir o pico de LH, implicando a aplicação de agonistas ou antagonistas de GnRH para prevenir a ocorrência espontânea da ovulação e o controlo do ciclo (ASRM, 2015). Os agonistas de GnRH são análogos desta hormona que se ligam aos seus recetores na hipófise. A administração contínua de agonistas causa, inicialmente, a libertação de FSH e LH seguida de dessensibilização da hipófise, o que minimiza a libertação das

gonadotrofinas e previne o pico de LH. Por sua vez, os antagonistas de GnRH ligam-se reversivelmente aos recetores desta hormona e previnem a libertação de FSH e LH, suprimindo de imediato o surgimento de LH (Alper, 2012). O uso de antagonistas tem vindo a apresentar mais vantagens em relação aos agonistas, possuindo um tempo de administração mais curto e com menor risco de ocorrência de Síndrome de Hiperestimulação Ovárica (SHO)¹⁴ (Reichman e Rosenwaks, 2014).

A estimulação ovárica deve ser monitorizada com recurso a ecografia vaginal, determinando o número e o tamanho dos folículos (Lunenfeld *et al.*, 2000). Quando pelo menos três folículos apresentarem 17mm ou mais de diâmetro, é administrada hCG para indução da ovulação (Alper, 2012). Esta hormona possui uma ação semelhante à LH, essencial para o amadurecimento final dos ovócitos (Pimentel e Plancha, 2014). Após a injeção de hCG, a ovulação ocorrerá 36 a 40 horas mais tarde, devendo a colheita dos ovócitos ser realizada cerca de 34 a 36 horas depois da administração hormonal (Shoham e Howles, 2009; ASRM, 2015).

3.5. Punção Folicular

A aspiração folicular do ovário para colheita de ovócitos é realizada por punção transvaginal dos folículos sob controlo ecográfico de uma sonda com uma agulha acoplada (Huang e Rosenwaks, 2014). Este procedimento deve ser efetuado sob anestesia (Alper, 2012). A aspiração por vácuo permite a recolha do líquido folicular em tubos de poliestireno colocados num bloco metálico de suporte, aquecido a 37°C (Brinsden, 2005). Todos os folículos de ambos os ovários devem ser puncionados (Alper, 2012).

No final da punção, os tubos são transportados para o laboratório de embriologia. Numa bancada de fluxo laminar de superfície aquecida a 37°C e com recurso a um estereomicroscópio, o líquido folicular de cada tubo é transferido para uma placa de Petri, onde se procede à triagem dos CCO presentes (Huang e Rosenwaks, 2014). Após triagem, os CCO são lavados em meio tamponado para remoção de restos celulares e vestígios de sangue e posteriormente colocados em meio de cultura numa placa de 4 poços previamente aquecida a 37°C (Maggiulli *et al.*, 2012). Os ovócitos são incubados a 37°C, 6% de CO₂ e 5% de O₂.

¹⁴A SHO é um possível efeito secundário do tratamento com recurso à estimulação ovárica controlada, na qual os ovários se tornam dilatados devido ao desenvolvimento de muitos folículos. Esta síndrome é dolorosa, podendo ocorrer acumulação de fluido no abdómen e peito (ASRM, 2015).

3.6. Avaliação da Maturidade Ovocitária

Nesta fase, a avaliação da maturidade ovocitária é apenas possível com base no aspeto morfológico do CCO e na expansão das células do *cumulus* e da coroa radiata (Ebner, 2012a). Esta observação constitui uma ferramenta útil para a seleção de ovócitos quando não é possível a sua avaliação direta (Maggiulli *et al.*, 2012). Os CCO podem ser considerados:

- **Imaturos:** as células circundantes não apresentam expansão, estando firmemente compactadas à volta do ovócito (Figura 22a) (Elder e Dale, 2011). O *cumulus* surge denso e escuro (Herrler e Beier, 2000). A presença de coágulos de sangue e aglomerados amorfos é também indicativa de fraco amadurecimento (Elder e Dale, 2011). Nestes casos, os ovócitos encontram-se em estado de vesícula germinativa (VG) (profase I) ou em metafase I (MI) (Elder e Dale, 2011; Rienzi *et al.*, 2012).

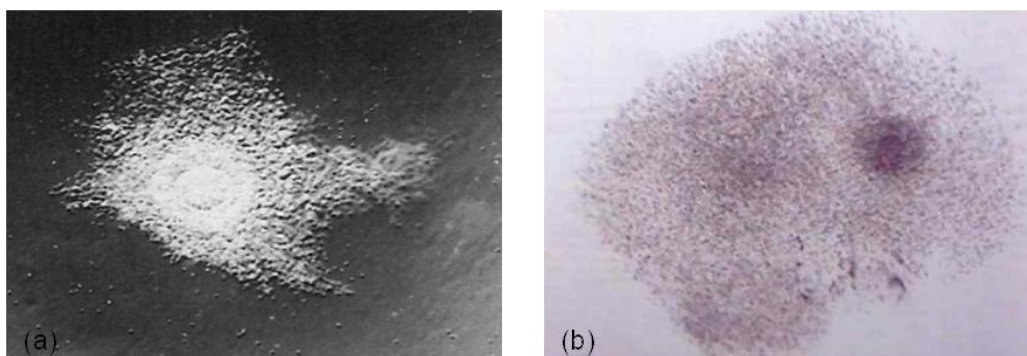


Fig. 22 – Complexos *cumulus*-ovócito em diferentes estados de maturação. (a) CCO imaturo – as células circundantes apresentam-se compactas; (b) CCO maduro – as células circundantes encontram-se expandidas. Adaptado de Elder (2005).

- **Maduros:** as células do *cumulus* apresentam-se expandidas numa ampla rede de filamentos da matriz, conferindo um aspeto “macio/leve” (Herrler e Beier, 2000; Rienzi e Ubaldi, 2012). As células da coroa radiata devem estar difundidas, apesar de se poderem manifestar mais compactas devido à estimulação ovárica (Figura 22b) (Rienzi *et al.*, 2012). Nestes casos, os ovócitos encontram-se em MII (Huang e Rosenwaks, 2014).

Apesar da hipótese de que o desenvolvimento do ovócito está dependente das células que o rodeiam, este tipo de avaliação pode ser subjetiva e imprecisa, não correspondendo ao verdadeiro estado de maturidade dos gâmetas femininos (Elder e Dale, 2011; Maggiulli *et al.*, 2012).

3.7. Desnudação

A desnudação refere-se à remoção das camadas circundantes do ovócito. Esta preparação dos gâmetas femininos é um passo fundamental em casos de ICSI, uma vez que permite uma avaliação inequívoca do estado de maturidade nuclear, da morfologia do citoplasma e do aspeto das estruturas extracitoplasmáticas bem como uma manipulação mais facilitada durante a microinjeção (Maggiulli *et al.*, 2012).

O processo de desnudação consiste na utilização de métodos enzimáticos e mecânicos realizados sob um estereomicroscópio numa câmara de fluxo laminar de superfície aquecida. É recomendado um período de incubação mínimo de 3 horas entre a colheita dos ovócitos e a desnudação (Granot e Dekel, 2012). Este tempo pode ser necessário para alguns ovócitos atingirem a maturidade citoplasmática, aumentando as taxas de fertilização e a qualidade embrionária (Maggiulli *et al.*, 2012). O procedimento implica a preparação de uma placa de 4 poços – um poço com 70µl da enzima hialuronidase¹⁵ e os restantes com meio tamponado. Todos os poços são cobertos com óleo – cujas funções são prevenir a evaporação do meio e minimizar flutuações de pH e temperatura – e a placa é incubada a 37°C durante 30 a 60 minutos¹⁶ (Elder e Dale, 2011). Após este período, os CCO são colocados na gota de enzima e repetidamente aspirados durante 30-40 segundos, começando a observar-se a dissociação inicial das células (Granot e Dekel, 2012). Tanto a concentração como o tempo de exposição à enzima devem ser limitados devido ao facto de poderem causar ativação de partenogénese por parte dos gâmetas femininos (Van Steirteghem, 2007). De seguida, os ovócitos são transferidos para os poços com meio tamponado para a desnudação mecânica. Neste passo, os ovócitos sofrem aspirações sucessivas com pipetas de desnudação de diâmetro adequado ao longo dos poços, de modo a remover a totalidade das células circundantes e dos vestígios de enzima. Este procedimento tem de ser executado com bastante cuidado a fim de evitar danos mecânicos nos ovócitos (Granot e Dekel, 2012). Por último, os ovócitos desnudados são avaliados quanto à maturidade e qualidade ao microscópio invertido, sendo posteriormente incubados a 37°C, 5% de O₂ e 6% de CO₂, por um período mínimo de 1 hora, até à realização da ICSI (Elder e Dale, 2011).

¹⁵A hialuronidase é uma enzima que degrada o ácido hialurónico, o maior componente da matriz extracelular dos ovócitos (Ebner, 2012a).

¹⁶O meio tamponado tem de ser equilibrado numa estufa a 37°C sem a presença de CO₂, dado que a exposição a uma atmosfera com CO₂ causa a descida do pH (Elder e Dale, 2011).

3.7.1. Avaliação da Maturidade Ovocitária após Desnudação

A desnudação permite, então, avaliar o estado de maturidade nuclear dos ovócitos ao microscópio ótico (Rienzi *et al.*, 2012), de acordo com a tabela 8 e a figura 23.

Tabela 8 – Estados de maturidade nuclear do ovócito. Esta avaliação é realizada de acordo com a presença e/ou ausência do 1º GP no espaço perivitelino (EPV) e da VG. Adaptado de Rienzi *et al.* (2012) e Gosden (2014).

Estado	1º glóbulo polar no EPV	Vesícula Germinativa	Maturidade	Incidência
Metáfase II	Presente	Ausente	Maduro	85%
Metáfase I	Ausente	Ausente	Imaturo	5%
Profase I	Ausente	Presente	Imaturo	10%



Fig. 23 – Avaliação da maturidade ovocitária após desnudação. (a) Ovócito imaturo em profase I, com a presença da VG; (b) Ovócito imaturo em MI – o reinício da meiose levou ao desaparecimento da VG, mas o 1º GP está ainda ausente; (c) Ovócito maduro em MII, com a extrusão do 1º GP. Adaptado de Granot e Dekel (2009).

Como apenas os ovócitos maduros, em MII, se encontram no estado haploide, são os únicos a serem utilizados para ICSI (Gosden, 2014). Os restantes são incubados para potencial maturação *in vitro* até à extrusão do 1º GP (Granot e Dekel, 2012). A maioria dos ovócitos em MI atinge a maturidade entre 1 a 24 horas de cultura, enquanto alguns dos ovócitos em profase I chegam a MII cerca de 26 a 29 horas após colheita (Gosden, 2014). Os ovócitos que atingem a maturidade *in vitro* podem ser microinjetados, apesar das baixas taxas de fertilização associadas (Rienzi e Ubaldi, 2012).

3.7.2. Avaliação da Qualidade Ovocitária

A maturidade nuclear, por si só, não é suficiente para determinar a qualidade ovocitária, sendo necessário completar a avaliação com a maturidade citoplasmática e a morfologia do ovócito (Granot e Dekel, 2012; Rienzi *et al.*, 2012).

A morfologia “ideal” de um ovócito corresponde a uma estrutura esférica delimitada por uma ZP uniforme, com um citoplasma translúcido e uniforme, livre de

inclusões, e com um EPV pequeno contendo um único GP de tamanho apropriado (Alpha SiRM e ESHRE SIGE, 2011; Rienzi e Ubaldi, 2012). Contudo, a maioria dos ovócitos colhidos após estimulação ovárica apresenta uma ou mais variações a estes critérios (Maggiulli *et al.*, 2012). Assim, é importante compreender quais as irregularidades morfológicas que comprometem a capacidade de desenvolvimento dos ovócitos (Rienzi *et al.*, 2012).

Os fatores incluídos na avaliação da qualidade dos gâmetas femininos, para além da análise do CCO, são o tamanho e a forma do ovócito e as anomalias intra e extracitoplasmáticas. De um modo geral, não é evidente uma relação direta entre a morfologia do ovócito e a sua capacidade de desenvolvimento, à exceção dos casos dos ovócitos gigantes e dos agregados de retículo endoplasmático liso (AREL) (Alpha SiRM e ESHRE SIGE, 2011; Rienzi *et al.*, 2012).

3.7.2.1. Tamanho e Forma do Ovócito

A morfologia do ovócito pode refletir anomalias genéticas. É o caso dos ovócitos gigantes, que possuem o dobro do volume de um ovócito normal devido ao facto de serem tetraploides (Figura 24) (Rienzi *et al.*, 2012). O uso destes gâmetas é potencialmente perigoso, dado que os embriões resultantes seriam anormais a nível cromossómico, apesar de terem uma clivagem e um desenvolvimento até blastocisto normais (Maggiulli *et al.*, 2012). Ovócitos com variadas anomalias ao nível da forma são fertilizados e podem dar origem a recém-nascidos saudáveis (Rienzi *et al.*, 2012).

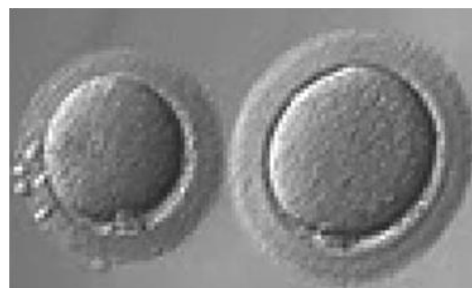


Fig. 24 – Comparação de um ovócito de tamanho normal com um ovócito gigante (à direita). Adaptado de Rienzi *et al.* (2012).

3.7.2.2. Anomalias Intracitoplasmáticas

O aspeto do citoplasma deve ser homogéneo, apesar de uma ligeira heterogeneidade corresponder apenas a variabilidade morfológica (Figura 25a) (Alpha SiRM e ESHRE SIGE, 2011). A **granulosidade** do citoplasma não se encontra bem definida na literatura, apesar de poder estar associada a uma qualidade embrionária baixa (Figura 25b) (Maggiulli *et al.*, 2012; Rienzi *et al.*, 2012). Estes desvios morfológicos devem ser distinguidos de **inclusões**, como os agregados de organelos (Figura 25c) e os corpos refráteis (Figura 25d), associados a baixas taxas de implantação (Rienzi *et al.*, 2012).

A influência dos **vacúolos** nos ovócitos depende do seu tamanho: vacúolos pequenos (5-10 μm de diâmetro) não aparentam ter consequências biológicas, enquanto vacúolos de maiores dimensões (>14 μm de diâmetro) estão associados a falhas na fertilização (Figura 25e). Nos ovócitos fertilizados em que há persistência dos vacúolos pode ocorrer interferência nos planos de clivagem, resultando numa menor taxa de obtenção de blastocistos (Alpha SiRM e ESHRE SIGE, 2011).

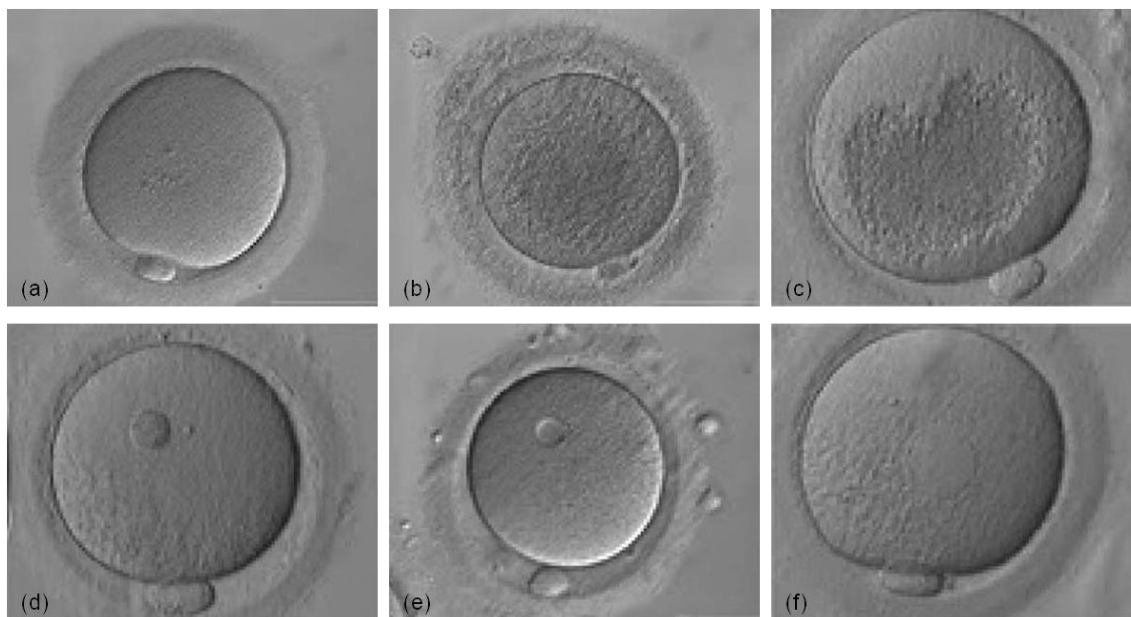


Fig. 25 – Anomalias intracitoplasmáticas. (a) Ovócito com citoplasma normal homogêneo; (b) Ovócito com granulosidade no citoplasma; (c) Ovócito com uma área central granulosa típica de presença de agregação de organelos; (d) Ovócito com um grande corpo refrátil no citoplasma; (e) Ovócito com um único vacúolo de pequenas dimensões; (f) Ovócito com disco de AREL no centro do citoplasma. Todos os ovócitos apresentados encontram-se em MII. Adaptado de Rienzi *et al.* (2012).

A anomalia intracitoplasmática com maior impacto negativo corresponde aos **agregados de retículo endoplasmático liso (AREL)** (Figura 25f). Estas estruturas translúcidas semelhantes a vacúolos estão associadas a consequências graves e significativas, nomeadamente morte fetal prematura e recém-nascidos com distúrbios. Por estas razões, a não inseminação destes ovócitos é altamente recomendada (Alpha SiRM e ESHRE SIGE, 2011; Rienzi *et al.*, 2012).

3.7.2.3. Anomalias Extracitoplasmáticas

De acordo com os Consensos de Istambul (Alpha SiRM e ESHRE SIGE, 2011), as anomalias extracitoplasmáticas correspondem na maioria dos casos a simples variações fenotípicas.

Quaisquer alterações na aparência da **zona pelúcida** (ZP) podem ser causadas por problemas na secreção e modelação da matriz de glicoproteínas (Rienzi *et al.*, 2012). Apesar de não existirem evidências suficientes do efeito do espessamento da ZP na fertilização e no desenvolvimento embrionário, devem ser registadas observações de espessura e cor excepcionais (Figura 26a). Quanto ao **espaço perivitelino** (EPV), a presença de inclusões é considerada anómala, embora não existam provas satisfatórias para suportar qualquer prognóstico associado a esta observação (Alpha SiRM e ESHRE SIGE, 2011). Um EPV aumentado, indicador de pós-maturidade, pode estar correlacionado negativamente com as taxas de fertilização e a qualidade embrionária (Figura 26b) (Rienzi *et al.*, 2012). As alterações no **1º glóbulo polar** (GP) podem incluir o tamanho anómalo, a degeneração e a fragmentação (Figura 26c) (Maggiulli *et al.*, 2012). Ovócitos com o GP exageradamente grande não devem ser utilizados devido ao risco de aneuploidia (Figura 26d) (Alpha SiRM e ESHRE SIGE, 2011).

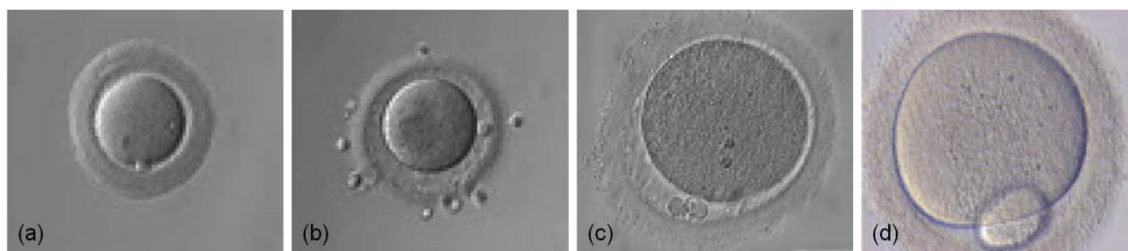


Fig. 26 – Anomalias extracitoplasmáticas. (a) Ovócito com uma ZP espessa; (b) Ovócito com EPV aumentado; (c) Ovócito com o 1º GP fragmentado; (d) Ovócito com o 1º GP gigante (5-6 vezes maior que o normal). Todos os ovócitos apresentados encontram-se em MII. Adaptado de Rienzi *et al.* (2012).

4. Inseminação Intrauterina

A inseminação intrauterina (IIU) foi implementada em 1962, sendo um dos tratamentos de infertilidade mais comumente utilizado¹⁷ (ESHRE, 2009). É uma técnica de primeira linha simples, de baixo custo e não invasiva, envolvendo a deposição de uma amostra seminal processada na cavidade uterina (Allahbadia e Merchant, 2012). A fundamentação da IIU é aumentar as taxas de concepção do casal ao aumentar a probabilidade de um grande número de espermatozoides viáveis atingirem o local de fertilização, dado que é ultrapassada a barreira muco-cervical e são removidas toxinas e bactérias presentes no plasma seminal (Bayer, 2012b; Kim *et al.*, 2014).

A IIU tem sido indicada em situações de fator masculino moderado e disfunções ejaculatórias (Bayer, 2012b), fator cervical – hostilidade ou inadequação do muco, endometriose mínima a moderada, causas imunológicas, infertilidade inexplicada/idiopática e casais sero-discordantes (Marcus, 2005; Angell *et al.*, 2008). A IIU é também a melhor abordagem nos casos em que se recorre a amostra de dador devido a fator masculino grave. Deste modo, a seleção dos pacientes para IIU deve ser cuidadosa (Marcus, 2005). É obrigatória a confirmação prévia da permeabilidade tubária, sendo a IIU contraindicada em mulheres com atresia cervical, cervicite, endometrite ou obstrução bilateral das trompas e também na maioria dos casos de amenorreia ou oligozoospermia grave (ESHRE, 2009).

O procedimento para a IIU inicia-se com a monitorização da ovulação, que pode ser realizada em ciclo natural ou com estimulação ovárica com recurso a CC ou a gonadotrofinas (ESHRE, 2009). O controlo do crescimento folicular é efetuado com recurso a análises sanguíneas ou a ecografia (Pimentel e Plancha, 2014). Esta monitorização é fundamental, uma vez que evita complicações – como a gravidez múltipla ou a SHO – e permite determinar a indução da ovulação pela administração de hCG (Allahbadia e Merchant, 2012). A IIU é realizada 32 a 36h após a injeção de hCG (ESHRE, 2009). Nesse dia, a amostra seminal é colhida em laboratório, sendo avaliada quanto à motilidade e concentração, e seguidamente processada de acordo com o descrito na secção 3.3. (Marcus, 2005). Apesar de não haver um consenso para os limites mínimos da qualidade seminal para IIU, as taxas de gravidez serão baixas com a utilização de uma amostra com número total <10 milhões de espermatozoides e com valores entre os 3 a 10 milhões de espermatozoides móveis (ESHRE, 2009).

¹⁷A IIU não é classificada como uma técnica de PMA, dado que estas técnicas implicam a manipulação de ambos os gametas ou embriões *in vitro* para obtenção de gravidez (Zegers-Hochschild *et al.*, 2009).

A execução da IIU, realizada pelo ginecologista, inicia-se com a introdução de um espéculo na vagina, permitindo que o colo do útero seja examinado e limpo com uma compressa. Entretanto, o embriologista carrega uma seringa com a amostra processada em laboratório, verificando uma alíquota para avaliação da amostra final. Seguidamente, esta seringa é acoplada ao cateter de inseminação¹⁸, já introduzido na cavidade uterina através do canal cervical, sendo a amostra gradualmente libertada (Figura 27) (Marcus, 2005; Allahbadia e Merchant, 2012). É apenas carregado um volume de 0,3–0,5 ml na seringa de modo a evitar refluxo através do canal cervical para a vagina (Pried *et al.*, 2000). A paciente é aconselhada a ficar em repouso durante 15 a 20 minutos, período após o qual pode retomar a sua atividade normal. O teste de gravidez deve ser agendado para 14 dias após a IIU (Allahbadia e Merchant, 2012; Bayer, 2012b).

A taxa de sucesso da IIU está dependente de variados fatores, destacando-se a causa e a duração da infertilidade, a idade da mulher e os parâmetros da amostra seminal (Kim *et al.*, 2014). Assim, casais em que o elemento feminino tem uma idade inferior a 35 anos, com um curto período de infertilidade e com fator masculino moderado beneficiam desta técnica (Allahbadia e Merchant, 2012). Podem ser realizados entre 4 a 6 ciclos, mas são raras as gravidezes após 4 IIU sem sucesso (Angell *et al.*, 2008; DGS, 2011). Após este período, deve ser executada uma reavaliação do caso e uma discussão sobre novas opções de tratamento, como FIV e ICSI (Marcus, 2005).

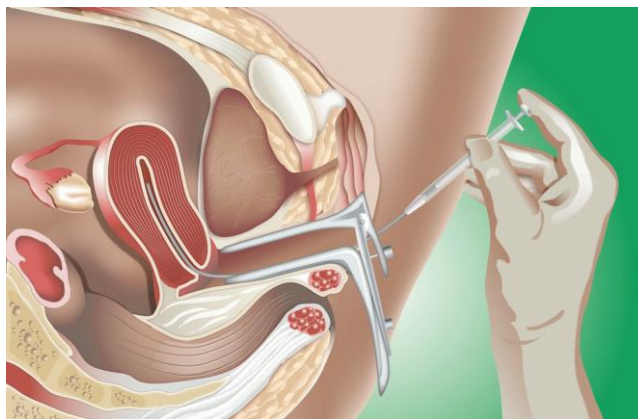


Fig. 27 – Representação de uma IIU. Na imagem pode observar-se o espéculo inserido na vagina e o cateter de inseminação, acoplado à seringa que contém os espermatozoides, no interior da cavidade uterina. Retirada de <http://americanpregnancy.org/infertility/intrauterine-insemination/>, acedido a 11/07/2016

¹⁸É importante que o material do cateter não tenha um efeito tóxico nos gâmetas. Para além disso, deve ter uma certa rigidez, mas ao mesmo tempo alguma flexibilidade na parte distal para não danificar o endométrio (Pried *et al.*, 2000).

5. Fertilização *in vitro*

A fertilização *in vitro* (FIV) é um dos avanços mais significativos na área da medicina da reprodução. Louise Brown, o primeiro humano a nascer como resultado de FIV em 1978, foi o culminar da investigação de Patrick Steptoe e Robert Edwards (Alper, 2012).

A FIV consiste na fertilização extra-corporal dos ovócitos pelos espermatozoides em laboratório (Pimentel e Plancha, 2014). Ao longo dos anos, todos os passos envolvidos neste processo foram acompanhados de um aperfeiçoamento contínuo que resultou numa das técnicas de PMA com maior sucesso no tratamento da infertilidade (Nel-Themaat *et al.*, 2012). Esta técnica é indicada em situações de fator tubário bilateral, fator masculino significativo mas não grave, disfunções ovulatórias, infertilidade idiopática superior a 3 anos, endometriose grave e idade materna avançada (DGS, 2011; Huang e Rosenwaks, 2014).

A primeira etapa deste processo engloba a estimulação ovárica controlada e punção folicular, de acordo com o descrito nas secções 3.4. e 3.5., respetivamente (Nel-Themaat *et al.*, 2012). Os CCO são mantidos em meio de cultura a 37°C numa atmosfera de 6% CO₂ e 5% O₂ até ao momento da inseminação (Huang e Rosenwaks, 2014). Também a colheita e preparação da amostra seminal são executadas segundo as secções 3.2. e 3.3., respetivamente. Preferencialmente, a amostra é obtida por masturbação no dia da punção (Pimentel e Plancha, 2014). Os requisitos mínimos dos parâmetros seminais para FIV incluem uma concentração superior a 5×10⁶ espermatozoides/ml, uma motilidade superior a 5% de espermatozoides progressivos e uma morfologia superior a 4%. Valores abaixo destes limites são considerados como tendo um mau prognóstico (Huang e Rosenwaks, 2014).

Cerca de 4 a 6 horas após punção, os ovócitos são inseminados com uma concentração de aproximadamente 50 000 a 100 000 espermatozoides móveis/ml (ou 25 000/ovócito) (Elder e Dale, 2011; Huang e Rosenwaks, 2014). Para tal, são necessários alguns passos fundamentais:

- Determinar o volume de suspensão espermática necessário para a inseminação com a concentração pretendida (Elder, 2005). Para esse fim, é colocada uma alíquota de 10 µl na câmara de Neubauer, sendo contados os espermatozoides móveis em 5 quadrados.

- Numa placa de 4 poços, adicionar o volume determinado da amostra seminal ao meio de cultura¹⁹ dos poços onde se encontram os ovócitos (Rabe *et al.*, 2000). Não devem estar mais de 5 CCO por poço. Este passo é realizado sob o estereomicroscópio e em bancada de superfície aquecida.
- Por fim, observar a placa ao microscópio para verificar se o número de espermatozoides é suficiente (Rabe *et al.*, 2000).

Após inseminação, os ovócitos são incubados *overnight* juntamente com os espermatozoides nas mesmas condições anteriores (Elder e Dale, 2011). No dia seguinte, cerca de 17 ± 1 horas, é avaliado o resultado da fertilização pela presença dos dois pró-núcleos e pela extrusão do 2º GP (Alpha SiRM e ESHRE SIGE, 2011). Esta observação é possível após a lavagem e desnudação mecânica dos ovócitos (Nel-Themaat *et al.*, 2012). Neste passo, não é necessário recorrer a enzimas dado que a maioria das células do *cumulus* e da coroa radiata dispersam com a atividade dos espermatozoides (Rabe *et al.*, 2000). Os pré-zigotos são, então, colocados numa placa de 4 poços com meio de clivagem previamente aquecido e equilibrado, ficando em cultura a 37°C numa atmosfera de 6% CO₂ e 5% O₂ até ao momento da transferência.

Para ultrapassar problemas de falhas de fertilização na FIV, foram desenvolvidos procedimentos de fertilização assistida baseados na micromanipulação de gâmetas, que culminaram na ICSI (Van Steirteghem, 2007).

¹⁹É importante que o meio de cultura em que os espermatozoides são processados e onde ocorre a inseminação contenha uma fonte proteica, como a albumina, garantindo a capacitação dos espermatozoides (Balaban *et al.*, 2014).

6. Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides

A injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) é o método mais atual e com maiores taxas de sucesso em casos de falha de fertilização ou de casais com um fator masculino grave, ambos representativos de limitações da FIV (Neri *et al.*, 2012). Com o propósito de ultrapassar este problema e aumentar a expectativa de um melhor prognóstico nestes casos, foram estabelecidas técnicas de micromanipulação de gâmetas (De Vos e Van Steirteghem, 2005).

A micromanipulação irrompeu em meados de 1980 com o *drilling* da ZP (ZD). Este procedimento envolve a criação de uma abertura circunscrita na ZP pela utilização de tampão ácido de *Tyrode* (pH 2) aplicado com uma micropipeta de vidro (Figura 28) (Palermo *et al.*, 2012a). Contudo, isto permite a entrada de mais do que um espermatozoide para o EPV, e o pH ácido do meio demonstrou ser prejudicial aos ovócitos (Palermo *et al.*, 2009). Deste modo, a disseção parcial da ZP (PZD) tornou-se rapidamente na técnica mais utilizada, uma abordagem que envolve uma disrupção mecânica na ZP com uma micropipeta de vidro de modo a que os espermatozoides obtenham acesso direto ao EPV (Figura 28) (Van Steirteghem, 2007). Esta técnica, para além das taxas de sucesso moderadas, apresenta uma incidência inaceitável de polispermia e implica que os espermatozoides tenham motilidade progressiva e tenham sofrido reação acrossómica. Adicionalmente acarreta um risco substancial de danificação do ovócito (Palermo *et al.*, 2012a). Uma outra abordagem desenvolvida foi a injeção subzonal de espermatozoides (SUZI), que permite a inserção mecânica de espermatozoides diretamente no EPV com recurso a uma pipeta de injeção (Figura 28) (Van Steirteghem, 2007). Esta técnica provou ser mais eficaz do que o ZD e a PZD, particularmente após indução da reação acrossómica. As limitações da SUZI passam pela incapacidade de ultrapassar as anomalias acrossómicas e as disfunções no processo de fusão espermatozoide-membrana citoplasmática do ovócito, resultando em baixas taxas de fertilização (Palermo *et al.*, 2012a).

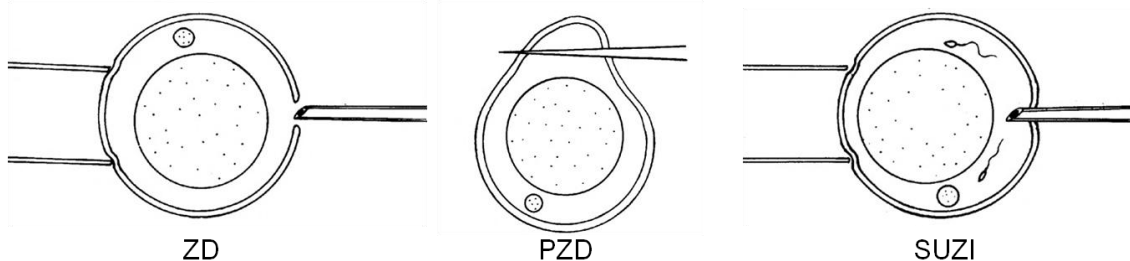


Fig. 28 – Técnicas de micromanipulação. São apresentadas representações do *drilling* da ZP (ZD), da disseção parcial da ZP (PZD) e da injeção subzonal de espermatozoides (SUZI). Adaptado de Elder e Dale (2011)

A introdução destas técnicas de micromanipulação não proporcionou uma melhoria substancial nas taxas de sucesso (Elder e Dale, 2011). Em 1992, Palermo e colaboradores reportaram o primeiro nascimento em humanos com recurso a ICSI, que representou um grande avanço na PMA e se revelou superior em termos de taxas de fertilização, número de embriões obtidos e taxas de implantação (Mansour, 1998; Van Steirteghem, 2007).

A ICSI envolve a inserção direta de um único espermatozoide no citoplasma do ovócito, ultrapassando as barreiras criadas pela ZP e pela membrana citoplasmática do ovócito (Neri *et al.*, 2012). Este tratamento tem sido usado com sucesso em casos de infertilidade devido a fator masculino grave, como oligozoospermia, astenozoospermia, teratozoospermia ou ainda azoospermia causada por falha testicular ou obstrução dos ductos, em que há recolha de espermatozoides a partir do epidídimo e do testículo (Palermo *et al.*, 2015). Adicionalmente, a ICSI é também o método preferencial em casos de falhas na fertilização em ciclos prévios de FIV, de baixo número de ovócitos puncionados, de uso de ovócitos criopreservados e de aplicação de diagnóstico genético pré-implantação (DGPI) (na secção 7.3.) (Palermo *et al.*, 2012b).

6.1. Equipamento de Micromanipulação

A ICSI é a técnica laboratorial mais complexa, implicando a necessidade de equipamento especializado: um microscópio invertido equipado com um sistema de micromanipuladores e micropipetas (Figura 29) (Joris *et al.*, 1998). O objetivo de um bom sistema de micromanipulação é garantir a tradução eficiente, suave e confiante dos movimentos do operador para os gâmetas em observação (Barnes, 2012). Para tal, é essencial que o equipamento esteja estável. Qualquer vibração pode interferir gravemente com o procedimento de microinjeção (Elder e Dale, 2011).

Um dos pré-requisitos do microscópio invertido é possuir objetivas que permitam uma ampliação de 200× e 400×, fundamental para procedimentos precisos como a ICSI (Van Steirteghem, 2007). A inclusão de um sistema ótico de contraste de Hoffman providencia um grande realce de imagem quando são utilizadas placas de Petri de plástico (Mansour, 1998). Uma outra condição é a incorporação de uma parte central aquecida na platina que permite um desempenho laboratorial a 37°C (Joris *et al.*, 1998), dado que os ovócitos são sensíveis à descida de temperatura, podendo esta causar danos irreversíveis no fuso mitótico (De Vos e Van Steirteghem, 2005).

Dois sets idênticos de micromanipuladores estão montados no microscópio, permitindo a manipulação das pipetas *holding* e ICSI nos lados esquerdo e direito, respetivamente (Joris *et al.*, 1998). Ambos permitem movimentos tridimensionais (De Vos e Van Steirteghem, 2005). Um dos micromanipuladores é mecânico e é usado maioritariamente para o posicionamento das micropipetas e para movê-las acima ou abaixo (Joris *et al.*, 1998). O segundo set de micromanipuladores funciona por controlo hidráulico através de um *joystick*, utilizado para movimentos suaves e exatos (Joris *et al.*, 1998; Barnes, 2012). Cada set é completado com microinjetores, cuja função é fixar e libertar o ovócito com a pipeta *holding* ou aspirar e injetar o espermatozoide com a pipeta ICSI (Figura 29) (Joris *et al.*, 1998). Este sistema consiste numa seringa de vidro hermética ligada ao suporte das micropipetas através de um tubo de plástico flexível (De Vos e Van Steirteghem, 2005). Todos estes componentes encontram-se preenchidos pelo mesmo óleo da cultura de embriões, sendo importante evitar a presença de bolhas de ar neste sistema (Joris *et al.*, 1998). As bolhas interferem com a sensibilidade no controlo de movimentos precisos (Elder e Dale, 2011).

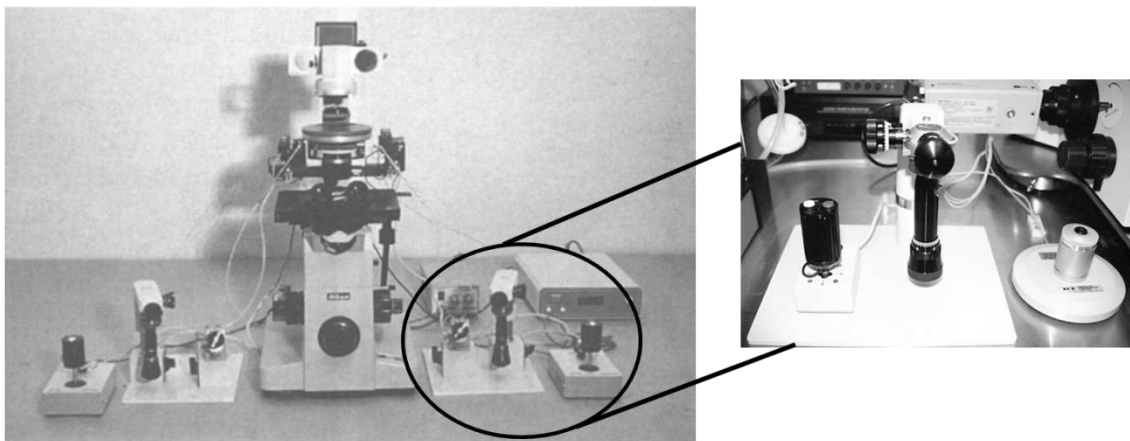


Fig. 29 – Equipamento necessário para a injeção intracitoplasmática de espermatozoides. O microscópio invertido é equipado com um contraste óptico de Hoffman, uma superfície aquecida na platina e dois sets idênticos de micromanipuladores e injetores. O set da esquerda é utilizado para a manipulação da pipeta *holding*, enquanto o da direita permite o controlo da pipeta ICSI. À direita encontra-se uma ampliação do micromanipulador e respetivo microinjetor, que permite a aspiração ou rejeição de gâmetas e meio. Adaptado de Joris *et al.* (1998) e Barnes (2012).

Por sua vez, as micropipetas de vidro são inseridas nos respetivos suportes de micromanipulação incluídos no microscópio invertido (Palermo *et al.*, 2012b). Existem dois tipos de micropipetas, a pipeta de sustentação ou *holding* – responsável por segurar e imobilizar o ovócito – e a pipeta de microinjeção ou ICSI – responsável por imobilizar, aspirar e injetar espermatozoides. Ambas devem ser corretamente alinhadas e possuírem um ângulo de 30° na sua extremidade distal a fim de facilitar o posicionamento horizontal e o ajustamento das micropipetas em relação à placa de microinjeção (Elder e Dale, 2011).

6.2. Procedimento e Aspetos Técnicos da Microinjeção

O procedimento inicial para a ICSI é bastante semelhante ao descrito para a FIV, com algumas etapas em comum: estimulação ovárica controlada seguida de punção folicular e triagem dos CCO (Pimentel e Plancha, 2014). Nesta técnica, contudo, os ovócitos têm de ser desnudados (secção 3.7.) de modo a permitir a avaliação da maturidade nuclear e da qualidade ovocitária bem como uma melhor visualização e manuseamento do ovócito durante a microinjeção (De Vos, 2000; Van Steirteghem, 2007). Este processo é realizado, pelo menos, 3h após a punção folicular (Mansour, 1998). Relativamente aos gâmetas masculinos, estes são colhidos e preparados pelos métodos descritos nas secções 3.2. e 3.3., respetivamente. Uma alíquota da amostra é observada para confirmação da concentração, motilidade e morfologia (De Vos e Van Steirteghem, 2005). Nos casos em que apenas estão disponíveis espermatozoides imóveis, é importante selecionar aqueles que são viáveis recorrendo ao teste de hipoosmolaridade (De Vos, 2000).

A placa de microinjeção é preparada cerca de 20 a 30 minutos antes da sua utilização, de acordo com a figura 30 (Elder e Dale, 2011). Na região mais à direita da placa de Petri colocam-se pequenas gotas de meio tamponado (cerca de 5 μ l) previamente aquecido a 37°C. Na região da esquerda colocam-se 2 gotas de meio PVP²⁰ (aproximadamente 10 μ l), que se espalham na placa com a ajuda da ponta da micropipeta, formando duas linhas lado a lado. Após a sua preparação, a placa é coberta de imediato com óleo, de modo a evitar a evaporação das gotas e a manter as condições ótimas aquando da micromanipulação, e colocada na estufa a 37°C até à sua utilização (Elder e Dale, 2011). Momentos antes da microinjeção, os gâmetas são adicionados à placa. Uma alíquota – cujo volume é dependente da concentração – dos espermatozoides preparados é colocada na periferia da primeira gota de PVP, enquanto os ovócitos em MII são colocados individualmente nas gotas de meio tamponado (Mansour, 1998).

Após todo este processo de preparação, a placa de ICSI é colocada na platina do microscópio, que se encontra a 37°C, para se iniciar a microinjeção. Os micromanipuladores mecânicos são utilizados para descer as micropipetas previamente focadas (Elder e Dale, 2011). A pipeta de microinjeção é baixada para a gota mais periférica de PVP, sendo esta focada. É, então, selecionado e aspirado um espermatozoide de acordo com a sua morfologia (Mansour, 1998). Esse

²⁰O PVP é uma solução viscosa usada para reduzir a motilidade dos espermatozoides, facilitando a sua manipulação (Elder e Dale, 2011). Previne também a adesão dos espermatozoides à pipeta (Mansour, 1998).

espermatozoide é transferido para a gota adjacente de PVP, onde é colocado numa posição perpendicular relativamente à pipeta de microinjeção, facilitando a sua imobilização. A imobilização envolve o esmagamento da cauda do espermatozoide – na zona abaixo da peça intermédia – entre a pipeta e o fundo da placa de Petri através de um golpe seco (De Vos e Van Steirteghem, 2005). Este passo provoca danos na membrana citoplasmática do espermatozoide, com a consequente libertação de fatores citosólicos bastante importantes na ativação do ovócito, o que se traduz no melhoramento das taxas de fertilização. Se, durante a imobilização, a cauda for danificada ou torcida, o espermatozoide deve ser descartado e o procedimento repetido com outro espermatozoide (Neri *et al.*, 2012).

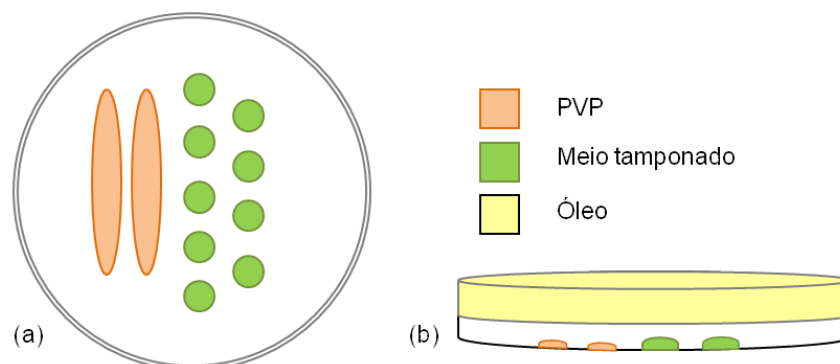


Fig. 30 – Representação esquemática da placa de microinjeção. (a) Vista superior: as gotas de PVP espalhadas, onde serão colocados os espermatozoides, situam-se à esquerda, enquanto as gotas de meio tamponado, onde serão colocados os ovócitos, encontram-se à direita; (b) Vista frontal: gotas de PVP e de meio tamponado cobertas pelo óleo, responsável pela manutenção das condições de temperatura durante a microinjeção.

O espermatozoide imobilizado é aspirado pela cauda e posicionado na extremidade da pipeta ICSI, imediatamente colocada sobre a gota do ovócito a microinjetar (Elder e Dale, 2011). O ovócito é posicionado com o GP às 6 ou às 12 horas e fixado através de uma ligeira sucção por parte da pipeta *holding*. Esta localização específica do GP permite minimizar a possibilidade de danos no fuso meiótico (De Vos e Van Steirteghem, 2005).

Antes da microinjeção, a pipeta ICSI é aproximada do ovócito e posicionada às 3 horas, sendo importante confirmar que o plano equatorial do ovócito, a abertura interna da pipeta *holding* e a extremidade da pipeta ICSI se encontram no mesmo plano de focagem (Figura 31a). Esta última é, então, empurrada muito lentamente de modo a perfurar a ZP e a membrana citoplasmática do ovócito, que oferece alguma resistência (Mansour, 1998). Normalmente, a rotura da membrana ocorre quando a pipeta atinge o centro do ovócito (Figura 31b) (Neri *et al.*, 2012). Após a pipeta atingir a superfície interna da membrana às 9 horas, aspira-se lentamente uma pequena quantidade de citoplasma que é novamente injetada no ovócito juntamente com o

espermatozoide, promovendo a ativação do ovócito e a miscigenação do gâmeto masculino com os organelos do citoplasma (Palermo *et al.*, 2012b). O procedimento termina com a retirada lenta da pipeta ICSI – para evitar a saída do espermatozoide – e a libertação do ovócito da pipeta *holding* (Figura 31c). Todo este processo é repetido até que todos os ovócitos maduros tenham sido microinjetados (Elder e Dale, 2011).

Após terminada a microinjeção de todos os ovócitos, sobem-se as pipetas e a placa de Petri é colocada na câmara de fluxo laminar de superfície aquecida. Numa placa de 4 poços previamente preparada, procede-se à lavagem dos ovócitos e à sua colocação em meio de cultura. A placa é incubada *overnight* a 37°C, 6% de CO₂ e 5% de O₂ (Elder e Dale, 2011). Tal como na FIV, cerca de 17±1 horas, é avaliado o resultado da fertilização pela presença dos dois pró-núcleos e pela extrusão do 2º GP (Alpha SiRM e ESHRE SIGE, 2011). Os pré-zigotos são novamente colocados em cultura nas mesmas condições anteriores até ao momento da transferência.

As taxas de insucesso na ICSI variam entre 1 a 3% quando é microinjetado um baixo número de ovócitos. Estas falhas podem dever-se a uma combinação de falha da fertilização, fertilização anormal (com 1 ou 3 PN) ou degeneração do ovócito. Mais raramente, a fertilização pode falhar com um número adequado de ovócitos e de espermatozoides devido à ausência de sincronismo entre a maturação nuclear e citoplasmática do ovócito e também à morfologia dos espermatozoides (Palermo *et al.*, 2015). As taxas de gravidez são negativamente relacionadas com a idade materna, que prejudica a qualidade dos ovócitos e/ou dos embriões (Neri *et al.*, 2012). Apesar de tudo, a ICSI resulta na produção de um grande número de embriões com altas taxas de implantação, que culminam no nascimento de milhares de crianças em todo o mundo (Elder e Dale, 2011).

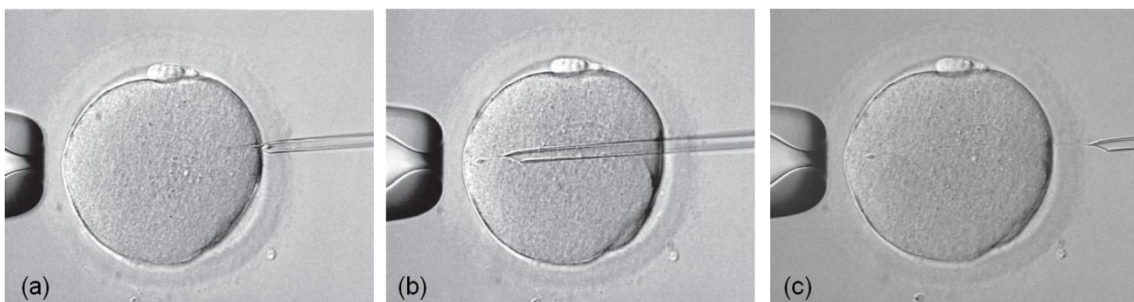


Fig. 31 – Processo de microinjeção. De notar a posição do GP às 12h. (a) Antes da entrada no ovócito, o espermatozoide é aproximado da abertura da pipeta de microinjeção; (b) Quando a pipeta de microinjeção atinge o centro do ovócito, observa-se a rotura da membrana plasmática do ovócito. O espermatozoide é depositado junto à superfície interna da membrana do ovócito (às 9 horas); (c) Após a retirada da pipeta, é observada a rotura da membrana plasmática do ovócito, em forma de cone com o vértice no centro do ovócito. Adaptado de Neri *et al.* (2012).

7. Cultura Embrionária

A cultura de embriões, apesar de aparentar ser um procedimento simples, é uma tarefa complexa que implica um rigoroso controlo de qualidade. Deste modo, é necessária a manutenção de certas condições para um desenvolvimento *in vitro* estável e o mais semelhante às condições fisiológicas. Um sistema de cultura de embriões engloba uma estufa capaz de manter os valores de temperatura, CO₂ e O₂ estabelecidos, um meio de cultura com uma composição capaz de cumprir os requisitos fisiológicos do embrião, material de cultura não citotóxico, uma boa qualidade do ar do laboratório e a própria experiência do embriologista (Gardner e Lane, 2012).

A cultura embrionária pode ser mantida até ao 2º, 3º ou 5º dia do desenvolvimento. Contudo, é importante notar que, *in vivo*, embriões em fase de clivagem estariam ainda nas trompas de Falópio e não no útero. Tal facto pode estar relacionado com menores taxas de implantação e gravidez comparativamente com a transferência ao 5º dia (Gardner e Lane, 1997). A cultura de blastocistos possui a vantagem de permitir um melhor sincronismo entre o embrião e o estado do endométrio, bem como eliminar embriões que não se desenvolvem após a ativação do genoma do zigoto, quer devido a defeitos genéticos ou metabólicos (Elder e Dale, 2011). Funciona também como ferramenta na seleção dos embriões mais viáveis com a conseqüente redução do número de embriões transferidos e correspondentes gestações múltiplas (Hardarson *et al.*, 2012). Apesar deste sistema permitir a seleção de embriões de qualidade superior, existem algumas preocupações relativamente à segurança da cultura prolongada e ao risco de potenciais modificações epigenéticas durante o desenvolvimento *in vitro*, bem como o risco de nascimentos prematuros e malformações congénitas (Elder e Dale, 2011; Machtinger e Racowsky, 2013). A cultura prolongada implicou o desenvolvimento de meios de cultura capazes de cumprir as necessidades fisiológicas do estado de blastocisto (Gardner e Lane, 1997).

A formulação de meios de cultura tem de ter em consideração a fisiologia do embrião, que divide o período pré-implantação em duas fases: pré e pós compactação (Gardner e Lane, 1997). Esta abordagem envolve uma cultura sequencial, na qual o meio necessita de ser trocado ao 3º dia de cultura, tornando os sistemas de cultura dinâmicos (Gardner e Lane, 2012). No entanto, de um ponto de vista prático, a carga de trabalho laboratorial requerida levou ao desenvolvimento de um meio de cultura contínuo – monocultura – no período pré-implantação (Elder e Dale, 2011). Contudo,

estas duas abordagens apresentam algumas diferenças fundamentais. A monocultura é baseada no princípio de deixar o embrião escolher aquilo que necessita durante o seu desenvolvimento, de acordo com a disponibilidade do meio. Por outro lado, a cultura sequencial foi desenvolvida para acomodar a dinâmica nutricional do embrião e mimetizar as condições do trato genital feminino (Gardner e Lane, 2012).

Posto isto, a cultura *in vitro* de embriões é realizada numa estufa a 37°C, 6% CO₂ e 5% O₂ até ao momento da transferência, que pode ser ao 2º, 3º ou 5º dia, numa placa de 4 poços com meio de cultura coberto com óleo. As placas são retiradas da estufa no primeiro dia para avaliação da fertilização e diariamente para avaliação da qualidade embrionária, em sistema de monocultura, e também para a transferência para uma nova placa com novo meio de cultura equilibrado, no caso do sistema de cultura sequencial. Esta avaliação deve ser executada o mais rapidamente possível, de modo a minimizar a variação das condições de cultura.

7.1. Avaliação da Fertilização

Uma série de eventos dinâmicos e complexos são despoletados após a interação espermatozoide-ovócito que, sequencialmente, levam à fertilização e à formação do zigoto. As características morfológicas do pré-zigoto, avaliadas cerca de 17±1 horas após inseminação, são um indicador inerente tanto da qualidade dos gâmetas como do potencial de implantação e gravidez (Alpha SiRM e ESHRE SIGE, 2011).

O ovócito fertilizado 'ideal' deve ser esférico e possuir dois GP, com dois PN localizados centralmente e justapostos que devem ser do mesmo tamanho e com membranas distintas. Os PN devem conter um número equivalente de corpos precursores do nucléolo (CPN) do mesmo tamanho e idealmente alinhados equatorialmente na região de justaposição da membrana (Alpha SiRM e ESHRE SIGE, 2011). Deste modo, a avaliação deve ser efetuada ao nível do número, tamanho e posição dos PN, dos padrões de distribuição dos CPN e da aparência do citoplasma (Scott, 2003).

7.1.1. Avaliação dos Pronúcleos

O pré-zigoto deve apresentar 2 PN (Figura32a). Anomalias neste número são indicativas de falha na fertilização. A presença de apenas 1 PN (Figura32b) pode ter

origem partenogénica, com a presença de apenas 1 GP, ou em erros no processo de fertilização por assincronismo na formação ou fusão dos PN (Ebner, 2012b). Neste caso, podem estar presentes os 2GP e os pré-zigotos serem diploides. Os embriões resultantes podem ser transferidos, apesar de revelarem uma maior incidência de aneuploidias. O pré-zigoto pode também apresentar um número de PN ≥ 3 (Figura 32c), como resultado de falha no bloqueio da polispermia ou na citocinese, utilização de ovócitos gigantes ou penetração por parte de espermatozoides binucleados (Papale *et al.*, 2012).

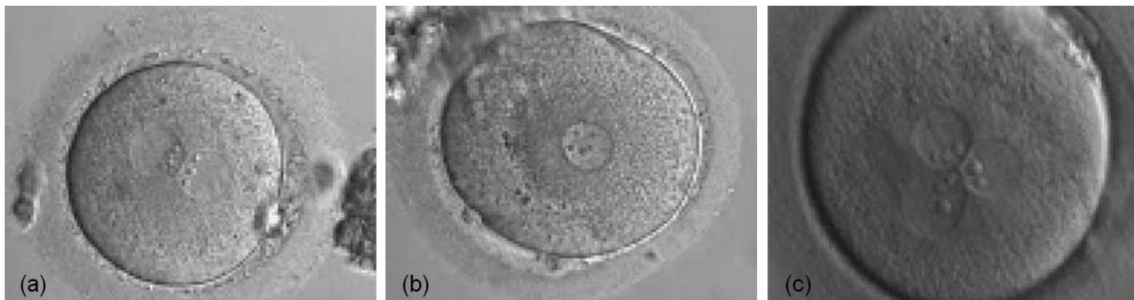


Fig. 32 – Avaliação do número de PN em pré-zigotos. (a) Pré-zigoto com os CPN perfeitamente alinhados na junção central e justaposta dos PN. Os GP estão fragmentados e encontram-se no eixo longitudinal dos PN. Parecem estar presentes restos celulares no EPV e o halo citoplasmático; (b) Pré-zigoto com apenas 1PN e dois GP distanciados; (c) Pré-zigoto com 3PN como resultado de ICSI num ovócito gigante. Um dos 3PN é ligeiramente maior que os outros. Adaptado de Papale *et al.* (2012).

O tamanho dos PN está dependente de fatores relacionados com os gâmetas, devendo possuir o mesmo tamanho²¹ (Papale *et al.*, 2012). Se apresentarem diferenças significativas entre eles, os embriões resultantes possuem pouco potencial de desenvolvimento e um alto grau de aneuploidia, não devendo ser transferidos (Scott, 2003).

O alinhamento e o posicionamento dos PN são também avaliados. Quando ocorre a extrusão do 2º GP, é estabelecido um eixo polar. O correto alinhamento dos PN neste eixo é importante para a singamia e subsequente divisão e desenvolvimento. A presença de PN afastados, localizados periféricamente ou não alinhados em relação aos GP resulta numa morfologia e clivagem anormais e ainda na paragem do desenvolvimento. Contudo, a implantação pode ocorrer no caso de transferência destes embriões (Papale *et al.*, 2012).

²¹Por vezes, o PN feminino pode ser ligeiramente menor que o masculino (Papale *et al.*, 2012).

Segundo os critérios descritos anteriormente, os Consensos de Istambul permitiram desenvolver um sistema de classificação de PN em três categorias, de acordo com a tabela 9 (Alpha SiRM e ESHRE SIGE, 2011).

Tabela 9 – Sistema de classificação de PN segundo os Consensos de Istambul. Adaptado de Alpha SiRM e ESHRE SIGE (2011).

Categoria	Classificação	Descrição
1	Simétrico	Equivalente ao Z1 ou Z2
2	Assimétrico	Todos os outros arranjos, incluindo a posição periférica dos PN
3	Anormal	PN com apenas 1 ou nenhum CPN

Z1/Z2 – correspondente ao *Z-scoring* (ver Tabela 10).

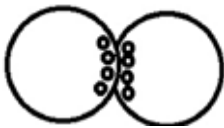
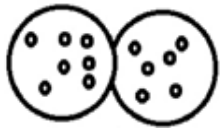


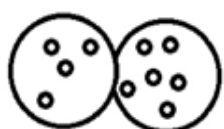
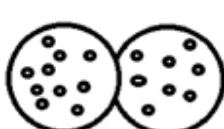


7.1.2. Avaliação dos Corpos Precusores dos Nucléolos

No interior dos núcleos de todas as células mitoticamente ativas encontram-se os nucléolos (Scott, 2003). Os nucléolos são locais de síntese de pré-rRNA e a sua disponibilidade é extremamente importante a partir do momento em que é necessária a síntese de rRNA para os processos de tradução aquando da ativação do genoma embrionário (Papale *et al.*, 2012). Estes formam-se a partir de centros funcionais, os CPN (Scott *et al.*, 2007). Apesar dos CPN não formarem nucléolos funcionalmente ativos durante a fase de zigoto, eles são utilizados como um método indireto da localização e do grau de condensação no interior dos PN, funcionando ainda como fator preditivo da viabilidade do embrião (Papale *et al.*, 2012). Foi desenvolvida uma classificação, designada *Z-scoring*, que avalia o número, tamanho e alinhamento dos CPN, e ainda o tamanho e a orientação dos PN (Tabela 10) (Scott, 2003).

Os pré-zigotos com um tamanho e número igual de CPN alinhados na zona da junção dos dois PN são considerados ‘ideais’, estando correlacionados com um aumento da competência embrionária (Papale *et al.*, 2012). A igualdade de número sem o alinhamento é também aceitável. Por outro lado, qualquer irregularidade no tamanho, número ou no padrão de alinhamento é associada a um desenvolvimento anómalo (Scott, 2003). No entanto, pode ocorrer implantação (Papale *et al.*, 2012).

A morfologia dos CPN é influenciada pela idade e pela técnica utilizada. Deste modo, a avaliação dos PN e dos CPN deve ser realizada segundo os critérios descritos, tendo em consideração as alterações temporais inerentes à técnica de inseminação utilizada, a própria técnica de PMA aplicada e ainda as características dos pacientes (Papale *et al.*, 2012). Todos os dados recolhidos auxiliam na seleção de embriões e no aumento do sucesso da implantação (Scott *et al.*, 2007).

Tabela 10 – Sistema de classificação *Z-scoring*. Os pré-zigotos com igual número de CNP alinhados na junção dos pronúcleos são designados Z1; os que possuem um número igual mas não alinhados são designados Z2; os que possuem desigualdade no número ou no alinhamento dos CNP são designados Z3; os pré-zigotos com PN com um tamanho muito desigual ou que não se encontram em posição central são designados Z4. Adaptado de Scott (2003).

Score	Representação	Descrição
Z1		CPN de igual tamanho e número, alinhados na junção dos PN (nº máximo de 6)
Z2		CPN de igual tamanho e número, mas dispersos nos PN (nº máximo de 6)
Z3-1		1 ou 2 CNP não alinhados num PN, 4 a 6 CNP dispersos no outro PN
Z3-2		CPN alinhados num PN e dispersos no outro
Z3-3		CPN em número desigual entre os 2 PN (diferença > 2)
Z3-4		CPN de pequeno tamanho e em grande número (>8) dispersos pelos PN
Z4-1		PN afastados
Z4-2		PN de tamanho muito diferente
Z4-3	–	PN localizados na periferia do ovócito

7.1.3. Avaliação do Citoplasma

À semelhança dos ovócitos, é esperado que o pré-zigoto possua também um citoplasma homogéneo. Embora alguns estudos relatem o efeito negativo de anomalias citoplasmáticas no desenvolvimento e implantação do embrião, não existem evidências suficientes para suportar este facto. Do mesmo modo, a presença de dismorfismos menores, como restos celulares no EPV ou corpos refrácteis, não possuem um prognóstico comprovado na implantação (Papale *et al.*, 2012). Por outro

lado, a presença de AREL e de agregados de organelos em ovócitos fertilizados pode estar relacionada com aneuploidias, não devendo ser transferidos (Alpha SiRM e ESHRE SIGE, 2011; Papale *et al.*, 2012). O surgimento do halo²² – citoplasma translúcido na periferia – está associado a uma melhor qualidade embrionária, aumento da formação de blastocistos ao 5º dia e a uma maior taxa de gravidez (Ebner, 2012b).

A presença de pequenos vacúolos não está associada a consequências biológicas detetáveis, enquanto grandes vacúolos em ovócitos fertilizados podem interferir com os planos de clivagem, resultando na falha de formação de blastocistos. Por esta razão, normalmente não são considerados para transferência (Papale *et al.*, 2012).

7.2. Avaliação da Qualidade Embrionária

Um dos pontos-chave no laboratório de PMA, tendo em vista o sucesso da implantação, é a seleção de embriões. Como tal, é necessário, durante a cultura embrionária, proceder à sua categorização de acordo com parâmetros distintos, de modo a selecionar os melhores embriões para transferência (ASEBIR, 2015; Bronet *et al.*, 2015). Uma vez que o desenvolvimento embrionário segue *timings* específicos (Tabela 11), uma sequência coordenada de eventos – velocidade de divisão e parâmetros morfológicos – providencia as duas medidas morfológicas essenciais do sistema de classificação da qualidade embrionária. Deste modo, a seleção de embriões para transferência é dependente da avaliação dos parâmetros mencionados anteriormente, sob o microscópio invertido, desde o estado de PN até blastocisto (Machtinger e Racowsky, 2013). De um modo geral, independentemente do dia da transferência, tais critérios parecem apresentar um valor preditivo de viabilidade embrionária quando avaliados individualmente ou coletivamente.

7.2.1. Singamia e Divisão Precoce

Ao 1º dia de desenvolvimento, para além da avaliação da fertilização, podem ainda ser observados outros dois parâmetros. Ao fim de 23 ± 1 horas após inseminação, ocorre um processo designado por **singamia**, que corresponde à

²²A formação de uma zona cortical transparente – halo – é causada pelos movimentos e rotações dos PN durante o seu alinhamento no centro do ovócito (Scott, 2003; Papale *et al.*, 2012).

conclusão da fertilização e à fusão dos PN. O resultado é a formação de um zigoto diploide que irá ser submetido à primeira divisão mitótica (Elder e Dale, 2011). Esta divisão, conhecida como **divisão precoce**, pode ocorrer 26 ± 1 horas, no caso de ICSI, ou 28 ± 1 horas, no caso de FIV, dando origem a um embrião de duas células. O *timing* da divisão precoce está correlacionado com uma boa qualidade embrionária, com o desenvolvimento até à fase de blastocisto e ainda com taxas de gravidez elevadas (Prados *et al.*, 2012). Após este passo, o zigoto continua a dividir-se por mitose, entrando na fase de clivagem (Elder e Dale, 2011).

Tabela 11 – *Timings* de observação de ovócitos fertilizados e de embriões e respetivo estado de desenvolvimento expectável. Adaptado de Alpha SiRM e ESHRE SIGE (2011).

Tipo de observação	Horas após inseminação	Estado de desenvolvimento esperado
Fertilização	17 ± 1	Estado pronuclear
Singamia	23 ± 1	50% em singamia (até 20% em estado de 2 células)
Divisão precoce	ICSI: 26 ± 1 FIV: 28 ± 1	Estado de 2 células
Embrião Dia 2	44 ± 1	Estado de 4 células
Embrião Dia 3	68 ± 1	Estado de 8 células
Embrião Dia 4	92 ± 1	Mórula
Embrião Dia 5	116 ± 1	Blastocisto

7.2.2. Fase de Clivagem

O sistema de classificação de embriões em fase de clivagem é baseado na avaliação do número de células (blastómeros), sua simetria, tamanho e forma, do grau de fragmentação e da presença de multinucleação (Machtinger e Racowsky, 2013).

De todas as características morfológicas normalmente avaliadas em estado de clivagem, o **número de blastómeros** permanece o indicador mais importante na viabilidade do embrião (Figura 33) (Machtinger e Racowsky, 2013). Um embrião normal progride segundo uma linha temporal previsível, desde o estado de 1 célula até ao estado de 16 células, com divisões celulares a ocorrer a cada 18-20 horas. Embriões de boa qualidade apresentam uma cinética e sincronismo de divisão apropriados (Prados *et al.*, 2012). Por outro lado, embriões que se dividem quer muito rapidamente ou muito lentamente tendem a possuir um potencial de implantação reduzido (Alpha SiRM e ESHRE SIGE, 2011). Foi demonstrado que, ao 3º dia,

embriões com um número de células ≤ 6 ou ≥ 9 apresentam maiores taxas de aneuploidias do que os embriões com 7 ou 8 blastómeros (Finn *et al.*, 2010).

A **simetria** define o **tamanho e forma dos blastómeros** em embriões em fase de clivagem (Machtinger e Racowsky, 2013). Um embrião com divisões simétricas e sincronizadas apresenta 2, 4, 8 ou 16 células de tamanho idêntico. Por outro lado, quando as divisões são simétricas, mas assíncronas, o embrião apresenta células de tamanhos diferentes devido ao facto da fase de clivagem não estar completa. A exceção na desigualdade de tamanho está relacionada exclusivamente com divisões assimétricas (ASEBIR, 2015). Isto pode resultar numa distribuição desigual das moléculas do citoplasma, relacionada com uma maior incidência de multinucleação e aneuploidias e com uma menor taxa de implantação (Prados *et al.*, 2012).



Fig. 33 – Embriões em diferentes estados de clivagem. (a) Embrião em fase de 2 células, após divisão precoce; (b) Embrião em estado de 4 células; (c) Embrião em estado de 8 células. De notar que todos os embriões apresentados constituem embriões ‘ideais’, sem a presença de fragmentação nem de multinucleação. Adaptado de Prados *et al.* (2012).

Muito frequentemente, a mitose leva à externalização de partes do citoplasma celular, resultando na presença de fragmentos anucleados rodeados por membrana plasmática, a chamada **fragmentação** (Prados *et al.*, 2012). A avaliação do grau de fragmentação é incluída em quase todos os sistemas de classificação de embriões, havendo três graus relativos: suave ($<10\%$), moderado ($10-25\%$) e severo ($>25\%$) (Alpha SiRM e ESHRE SIGE, 2011). Enquanto o primeiro grau não tem impacto no potencial de desenvolvimento do embrião, os outros dois graus correlacionam-se negativamente com a formação de blastocistos, taxas de implantação e gravidez (Prados *et al.*, 2012).

A observação dos núcleos dos blastómeros é um procedimento de grande importância na avaliação morfológica de embriões. Idealmente, cada blastómero deve possuir um único núcleo, constituindo um bom preditor do potencial de implantação (ASEBIR, 2015). No entanto, pode surgir outro estado de nucleação, a **multinucleação**, caracterizada pela presença de mais do que um núcleo em pelo

menos um blastómero do embrião. Pode ser avaliada aos dias 1, 2 ou 3 do desenvolvimento, apesar de no 3º dia se tornar mais difícil devido à necessidade de observar um maior número de células de menor tamanho (Prados *et al.*, 2012). A multinucleação está associada a uma diminuição do potencial de implantação e a uma maior incidência de anomalias cromossómicas e, conseqüentemente, aumento do risco de abortamento espontâneo, sendo os embriões com esta característica geralmente excluídos da transferência (Alpha SiRM e ESHRE SIGE, 2011).

Outras características morfológicas, como a granulosidade do citoplasma e a presença de agregados de organelos e de vacúolos, podem também ser avaliadas durante a fase de clivagem (Prados *et al.*, 2012). Contudo, não existem evidências claras que suportem um efeito biológico claro destas características no potencial de implantação (Alpha SiRM e ESHRE SIGE, 2011).

Posto isto, e segundo os Consensos de Istambul (Alpha SiRM e ESHRE SIGE, 2011), um embrião ‘ideal’ em fase de clivagem deve apresentar as características descritas seguidamente, tendo sido ainda desenvolvido um sistema de classificação, apresentado na tabela 12.

- Dia 2 (avaliado 44 ± 1 horas após inseminação) – 4 blastómeros mononucleados do mesmo tamanho numa disposição tridimensional tetraédrica e com uma fragmentação <10%.
- Dia 3 (avaliado 68 ± 1 horas após inseminação) – 8 blastómeros mononucleados de igual tamanho, com uma fragmentação <10%.

Tabela 12 – Sistema de classificação de embriões em fase de clivagem. Adaptado de Alpha SiRM e ESHRE SIGE, (2011).

Grau	Classificação	Descrição
1	Bom	<10% de fragmentação Tamanho das células correspondente à fase de desenvolvimento Ausência de multinucleação
2	Razoável	10-25% de fragmentação Maioria das células com tamanho específico da fase de desenvolvimento Sem multinucleação
3	Mau	Fragmentação severa (>25%) Tamanho das células não corresponde à fase de desenvolvimento Evidências de multinucleação

7.2.3. Compactação Celular – Mórula

Após o embrião atingir o estado de 8 células, os blastómeros começam a apresentar um aumento na adesão célula-célula devido ao surgimento de junções intercelulares, correspondente ao início da **compactação** (Prados *et al.*, 2012). Ao 4º dia de desenvolvimento (92 ± 1 horas após inseminação), o embrião acaba por surgir como uma massa de células compacta e de difícil distinção ao nível dos limites dos blastómeros, a chamada **mórula** (ASEBIR, 2015). Uma mórula de boa qualidade é composta por 16 a 32 blastómeros e todos eles devem ser incluídos no processo de compactação (Figura 34) (Tao *et al.*, 2002).



Fig. 34 – Diferentes estados de compactação. (a) Embrião de 8 células apresentando compactação moderada. A distinção individual dos blastómeros começa a ser difícil; (b) Mórula de boa qualidade. Todos os blastómeros são incluídos no processo de compactação, não sendo evidentes células individuais; (c) Mórula de má qualidade com diversas células e fragmentos excluídos da massa compacta de células. Adaptado de Prados *et al.* (2012).

Uma correta compactação é indicativa de ativação do genoma embrionário, correspondendo a um bom prognóstico da capacidade de desenvolvimento do embrião. Adicionalmente, a ocorrência de compactação precoce, ao 3º dia de desenvolvimento, possui também um aumento do potencial de implantação. Em contrapartida, se alguns blastómeros são excluídos deste processo, o embrião pode possuir um potencial reduzido para se tornar um blastocisto normal (Prados *et al.*, 2012). Deste modo, os Consensos de Istambul (Alpha SiRM e ESHRE SIGE, 2011) desenvolveram um sistema de classificação para avaliação do estado de mórula, apresentado na tabela 13.

Tabela 13 – Sistema de classificação de embriões em estado de mórula. Adaptado de Alpha SiRM e ESHRE SIGE, (2011).

Grau	Classificação	Descrição
1	Bom	Atinge a 4ª fase de clivagem Evidências de compactação envolvendo o volume total do embrião
2	Razoável	Atinge a 4ª fase de clivagem Compactação envolvendo a maioria do volume do embrião
3	Mau	Compactação desproporcional envolvendo menos de metade do embrião, com 2 ou 3 blastómeros que permanecem distintos

7.2.4. Blastocisto

Ao 5º dia de desenvolvimento (116±1 horas após inseminação) o embrião atinge a fase de blastocisto (Alpha SiRM e ESHRE SIGE, 2011). A extensão da cultura embrionária até este estado implicou a criação de sistemas de classificação morfológica capazes de proporcionar uma seleção cuidada de blastocistos e obter elevadas taxas de implantação. O sistema de classificação atualmente utilizado, desenvolvido nos Consensos de Istambul (Alpha SiRM e ESHRE SIGE, 2011), é baseado maioritariamente num outro criado em 1999 por Gardner e Schoolcraft e encontra-se descrito na tabela 14. Os blastocistos são, então, avaliados de acordo com o seu grau de expansão, a morfologia da trofoectoderme (TE) e da MCI (Hardarson *et al.*, 2012).

A formação de um blastocisto inicia-se quando, na fase de mórula, ocorre a acumulação de fluido entre as células, levando ao surgimento do blastocélio. É esta acumulação de líquido que vai definindo o grau de expansão do blastocisto, distribuído por 4 graus, segundo nos Consensos de Istambul (Figuras 35 e 36). À medida que o blastocisto se expande, é possível avaliar com maior rigor a TE e MCI, cuja classificação engloba 3 graus, segundo os Consensos de Istambul, dependendo do número de células, da forma e da coesão entre elas (Tabela 14) (Hardarson *et al.*, 2012).

Tabela 14 – Sistema de classificação de embriões em fase de blastocisto. O sistema de classificação de blastocistos é uma combinação do grau de expansão, da MCI e da TE; por exemplo, um blastocisto expandido com uma MCI boa e uma TE razoável é classificado como 3-1-2. Adaptado de Alpha SiRM e ESHRE SIGE, (2011).

Parâmetro	Grau	Classificação	Descrição
Grau de expansão	1		Inicial
	2		Em expansão
	3		Expandido
	4		Em eclosão/eclodido
MCI	1	Bom	Proeminente, facilmente distinguível e com muitas células compactadas e aderidas firmemente
	2	Razoável	Facilmente distinguível e com muitas células pouco agrupadas
	3	Mau	Difícil de distinguir e com poucas células
TE	1	Bom	Epitélio coesivo com muitas células
	2	Razoável	Epitélio pouco coeso com poucas células
	3	Mau	Muito poucas células

O blastocisto 'ideal' encontra-se totalmente expandido ou em eclosão, com uma MCI proeminente, facilmente distinguível e consistente, com a presença de muitas células compactadas e firmemente aderidas umas às outras, e com uma TE que inclui muitas células a formar um epitélio coesivo (Figura 35c). Apesar da MCI possuir uma grande importância no prognóstico da implantação e do desenvolvimento fetal, uma TE funcional é também essencial (Alpha SiRM e ESHRE SIGE, 2011).

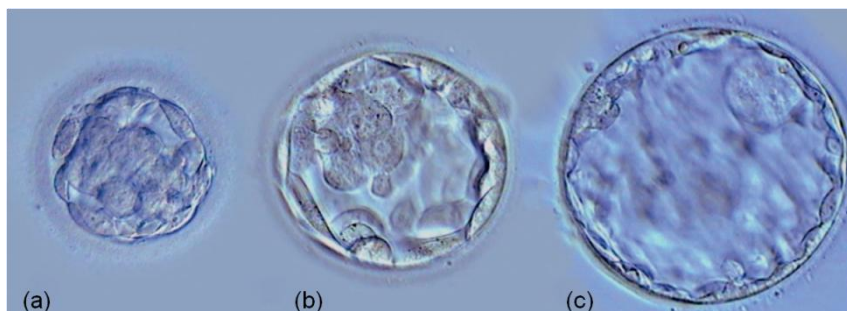


Fig. 35 – Diferentes graus de expansão dos blastocistos. (a) Blastocisto inicial; (b) Blastocisto em expansão; (c) Blastocisto expandido com uma MCI e TE de boa qualidade (3-1-1). Adaptado de ASEBIR (2015).

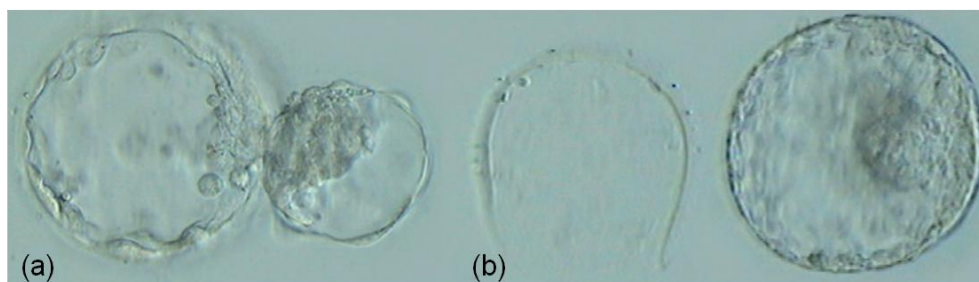


Fig. 36 – Blastocistos e eclosão. (a) Blastocisto em eclosão, a libertar-se da ZP; (b) Blastocisto eclodido, com a ZP à sua esquerda. Adaptado de ASEBIR (2015).

7.2.5. O Avanço na Avaliação da Qualidade Embrionária – *time-lapse*

A classificação de embriões baseada apenas em aspetos morfológicos estáticos, apesar das taxas de sucesso, pode revelar-se limitada devido à dependência dos tempos de observação. Para além disso, a constante entrada e saídas das estufas, local que mimetiza as condições fisiológicas, pode afetar o desenvolvimento embrionário, uma vez que podem ocorrer alterações ao nível da temperatura e pH, bem como nas percentagens de CO₂ e O₂, limitando o tempo e o número de observações (Montag *et al.*, 2011; Desai *et al.*, 2014). Contudo, estas desvantagens podem ser ultrapassadas através da utilização de uma tecnologia recente, o *time-lapse*, que permite uma monitorização contínua da cultura (Kirkegaard *et al.*, 2015). Deste modo, é possível estudar todo o processo de progressão e não apenas pontos isolados, permitindo, assim, avaliar os parâmetros morfocinéticos do

embrião (Wirka *et al.*, 2014; Bronet *et al.*, 2015). Numerosos estudos sugerem que o *timing* de alguns eventos específicos – formação dos pronúcleos, singamia, divisão precoce, intervalos da divisão celular, sincronismo da divisão celular e início da formação de blastocisto – são indicadores do potencial de desenvolvimento e de implantação do embrião, com grande utilidade na seleção dos melhores embriões para transferência (Desai *et al.*, 2014). Ao contrário do método convencional de observações diárias isoladas, este novo método providencia a aquisição de centenas de imagens e permite determinar os *timings* destes eventos-chave no desenvolvimento embrionário. Um *software* acoplado a este sistema transforma as imagens recolhidas num vídeo do desenvolvimento progressivo do embrião (Best, 2015).

Existem diversos aparelhos de *time-lapse* disponíveis comercialmente, que diferem no seu *design* e funcionamento (Best, 2015). Podem consistir no acoplamento de uma estufa a um microscópio convencional, na inserção de um microscópio no interior de uma estufa convencional ou ainda na combinação dos dois sistemas integrados no mesmo equipamento. Esta técnica não invasiva permite, então, a monitorização dos embriões de um modo seguro, sem os remover das condições de temperatura e gases desejáveis (Herrero e Meseguer, 2013). Concluindo, todas estas vantagens, juntamente com a sua fácil adoção por parte das clínicas de PMA, tornam a tecnologia *time-lapse* adequada para a seleção dos embriões com maior qualidade e maior potencial de implantação (Wirka *et al.*, 2014). No entanto, como a aquisição desta tecnologia envolve um investimento significativo, não se encontra ao alcance de todos os laboratórios de PMA.

Um dos sistemas de monitorização disponível é o **Primo Vision** (Vitrolife, Suécia), um sistema modular que é colocado no interior de uma estufa convencional e é ligado a uma unidade exterior para a monitorização contínua do desenvolvimento embrionário. É necessário uma unidade para cada paciente. Dependendo das dimensões da estufa, podem ser colocadas diversas unidades na mesma estufa. O sistema *Primo Vision* consiste num microscópio invertido digital compacto que recorre ao contraste de Hoffman integrado e acoplado a uma iluminação LED verde que possibilita a recolha de imagens ao longo de 3 a 11 planos focais. O seu sistema modular permite a expansão com microscópios adicionais a qualquer momento. Na sua totalidade, o sistema possibilita a utilização de 6 microscópios numa monitorização total de 96 embriões provenientes de 6 pacientes. Cada placa pode suportar até 16 embriões. O *software Primo Vision* captura, analisa e apresenta imagens para uma revisão manual, tornando possível a comparação e análise do desenvolvimento embrionário (Best, 2015).

O sistema **Eeva** (*Early Embryo Viability Assessment*, Auxogyn, Estados Unidos da América) é também um sistema modular que é inserido no interior de uma estufa convencional pré-existente no laboratório. O *Eeva* utiliza campo escuro para capturar imagens de alta resolução num único plano focal, com intervalos de 5 minutos. Os embriões são colocados numa placa de poços múltiplos, num máximo de 9 embriões, permitindo que estes sejam analisados individualmente enquanto partilham a mesma gota de meio de cultura. As imagens obtidas são utilizadas para produzir um vídeo *Eeva* para cada embrião (Wirka *et al.*, 2014). Este sistema usa o *software Auxogyn* para analisar o desenvolvimento embrionário inicial e fornecer dados acerca do potencial de desenvolvimento de cada embrião até ao estado de blastocisto (Best, 2015).

Por último, o sistema de *time-lapse EmbryoScope* (*FertiliTech*, Dinamarca) consiste numa estufa de três gases equipada com um microscópio (com contraste de Hoffman) e uma câmara de alta definição, possibilitando uma monitorização contínua do desenvolvimento embrionário. A estufa tem uma capacidade para 72 embriões, distribuídos por 6 placas (*EmbryoSlide*) com 12 embriões cada (Desai *et al.*, 2014). As imagens são adquiridas com recurso a uma iluminação LED vermelha, até um máximo de 9 planos focais, a cada 15 minutos. As imagens obtidas são transferidas para o *software EmbryoViewer*, onde são armazenadas e avaliadas com um sistema de análise e seleção de embriões (Desai *et al.*, 2014; Best, 2015).

7.3. Diagnóstico Genético Pré-Implantação

O diagnóstico genético pré-implantação (DGPI) é uma técnica laboratorial desenvolvida há mais de 20 anos e que constitui uma forma precoce de diagnóstico pré-natal (Harper, 2011). O seu principal objetivo é o estudo genético de embriões obtidos *in vitro*, permitindo distinguir os embriões saudáveis dos afetados por anomalias genéticas (Regateiro, 2007; Wells e Fragouli, 2012).

Cerca de 25% dos casais que recorrem a DGPI possuem um ou mais filhos afetados por uma doença de causa genética ou por uma malformação, enquanto uma percentagem ainda mais elevada já sofreu abortamentos espontâneos ou realizou IVG após diagnóstico genético pré-natal (Regateiro, 2007). Deste modo, o DGPI está maioritariamente indicado para as seguintes situações:

- Estudo dos embriões obtidos de casais portadores de mutação associada a doença monogénica grave, possuindo um risco elevado de herdar a mutação e desenvolver a doença em causa (Regateiro, 2007);
- Estudo dos embriões obtidos de casais em que um dos elementos seja portador de uma alteração cromossómica estrutural equilibrada (Regateiro, 2007);
- Estudo dos embriões obtidos de casais portadores de doenças relacionadas com a repetição de tripletos (Harper, 2011).
- Detecção de complementos cromossómicos anormais em embriões obtidos de casais em que a mulher tenha mais de 35 anos (Hens *et al.*, 2013);
- Estudo dos embriões obtidos de casais em que tenham ocorrido abortamentos de repetição ou falhas repetidas de implantação (por possível presença de aneuploidias nos embriões) (Hens *et al.*, 2013);
- Determinação do sexo genético em embriões obtidos de casais portadores de doenças ligadas ao cromossoma X (Regateiro, 2007).

A técnica preferencial para este tipo de diagnóstico é a ICSI, a fim de evitar contaminação por espermatozoides ligados à ZP (Thornhill *et al.*, 2005) ou por células da granulosa.

A biópsia embrionária é um processo de micromanipulação idêntico ao da ICSI, que engloba 2 passos. O primeiro corresponde à penetração ou remoção de parte da ZP, enquanto o segundo se refere à remoção de uma ou mais células através de uma pipeta de biópsia (no lugar da pipeta de microinjeção) (Thornhill *et al.*, 2005). O meio em que é realizada a biópsia não deve conter Ca^{2+} nem Mg^{2+} , sabendo que esta

condição permite uma remoção mais fácil das células, acompanhada de uma menor taxa de lise celular e de um tempo mais reduzido para a execução do procedimento. Subsequentemente, o potencial de desenvolvimento do embrião não é afetado (Dumoulin *et al.*, 1998).

A criação de uma abertura na ZP é alcançada preferencialmente com recurso a laser, apesar de, quando este não se encontra disponível, se poder recorrer a métodos mecânicos (PZD) ou químicos (ZD) (Thornhill *et al.*, 2012).

A biópsia pode ser realizada em 3 estados de desenvolvimento diferentes:

- a) Ovócito/Pré-zigoto: biópsia sequencial ou simultânea do 1º e 2º GP. A análise genética deste método é restrita a mutações maternas (Iwarsson *et al.*, 2011).
- b) Embrião em fase de clivagem: biópsia de 1 ou 2 blastómeros ao 3º dia de desenvolvimento (Figura 37a) (Oliva Teles, 2011). Apresenta a vantagem dos blastómeros conterem o material genético de ambos os progenitores (Iwarsson *et al.*, 2011).
- c) Blastocisto: biópsia de 5 a 10 células da TE ao 5º dia de desenvolvimento (Figura 37b) (Dahdouh *et al.*, 2015).

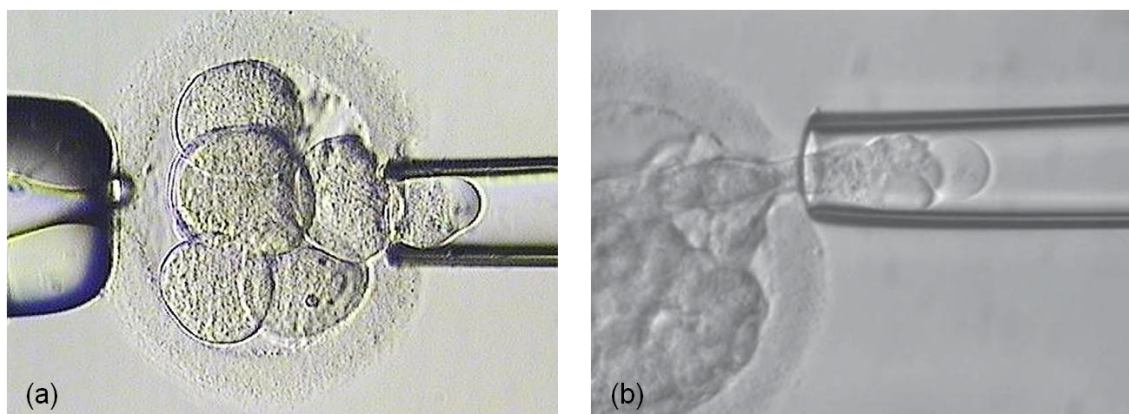


Fig. 37 – Diagnóstico genético pré-implantação. (a) Biópsia embrionária em fase de clivagem apresentando a remoção de 1 blastómero (Adaptado de Iwarsson *et al.* 2011); (b) Biópsia embrionária em fase de blastocisto apresentando a remoção de células da TE (Adaptado de Thornhill *et al.* 2012).

A biópsia em fase de clivagem é o processo mais utilizado (Regateiro, 2007). Estudos que analisaram o efeito da biópsia embrionária no estado de 8 células demonstraram que a remoção de duas células não é prejudicial ao metabolismo e desenvolvimento do embrião, com uma sobrevivência superior a 90% (Harper, 2011). Por sua vez, a biópsia da TE é pouco usada devido ao facto de nem todos os embriões atingirem esta fase e da possível existência de divergência genética entre as

células da TE e a MCI, resultando num mosaicismo que pode ser responsável por falsos positivos (Regateiro, 2007; Dahdouh *et al.*, 2015). Adicionalmente, implica a vitrificação dos embriões (Harper, 2011). Apesar das desvantagens, este método possibilita uma maior segurança dos resultados e não envolve a remoção de células embrionárias (Regateiro, 2007; Oliva Teles, 2011).

A técnica de biópsia embrionária deve ser realizada por um embriologista experiente, enquanto o diagnóstico deve ser executado por um geneticista (Harper, 2011). Para o estudo da doença genética em causa pode recorrer-se a:

- Reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polimerase Chain Reaction*): permite o diagnóstico de doenças monogénicas, repetição de tripletos ou determinação do sexo do embrião (Harper, 2011).
- Hibridização fluorescente *in situ* (FISH): possibilita a deteção de anomalias cromossómicas, nomeadamente translocações, doenças ligadas ao cromossoma X e aneuploidias, sendo para esta última recomendada a utilização de sondas para os cromossomas 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22, X e Y (Thornhill *et al.*, 2005).

Apesar de serem largamente utilizadas durante as últimas duas décadas, estas técnicas apresentam algumas desvantagens (Wells e Fragouli, 2012). No PCR existe um possível risco de contaminação e de *allele drop-out* (amplificação preferencial de um dos alelos) (Thornhill *et al.*, 2005). Por outro lado, a FISH apresenta limitações significativas em termos de rigor e de quantidade de informação obtida, uma vez que permite avaliar um máximo de 12 cromossomas por embrião. Isto levou ao surgimento de técnicas que possibilitam a avaliação do número de cópias de todos os cromossomas, entre as quais se destacam o *real-time* PCR, a hibridização genómica comparativa (HGC) com recurso a *arrays* e também a deteção de polimorfismos de nucleótido único (SNP) (Wells e Fragouli, 2012).

A obtenção dos resultados do DGPI não deve demorar mais de 48 horas (Oliva Teles, 2011). Após este período, os embriões que apresentam resultados negativos são avaliados e selecionados para transferência (Dahdouh *et al.*, 2015). No caso de biópsia em fase de blastocisto, tem de ocorrer desvitrificação para haver transferência. Estima-se que, com a utilização do DGPI, se consiga reduzir até 95% o risco de transmissão de determinada doença genética grave de um casal portador à descendência (Oliva Teles, 2011).

8. Transferência de Embriões

A transferência de embriões é um dos fatores mais importantes na PMA devido à sua relação direta com as taxas de implantação e gravidez (Balaban *et al.*, 2014). O sucesso da implantação está dependente da seleção de embriões de boa qualidade para transferência e da recetividade do endométrio (Gianaroli *et al.*, 2012). Esta recetividade está diretamente ligada ao chamado suporte da fase lútea, no qual ocorre administração de progesterona após a punção folicular com a finalidade de garantir a maturidade do endométrio para a implantação (Alper, 2012).

A transferência de embriões pode ser realizada ao 2º, 3º ou 5º dia de desenvolvimento, estando a escolha dependente das características de cada caso e da qualidade embrionária (Gianaroli *et al.*, 2012). Segundo o Conselho Nacional de PMA, o número de embriões a transferir deve ser de 1 ou 2, de modo a diminuir a incidência de gravidez múltipla (DGS, 2011). Existem situações excepcionais em que são transferidos 3 embriões, tais como idade materna avançada, baixa qualidade embrionária e alguns fatores de infertilidade (Gianaroli *et al.*, 2012).

No dia da transferência, é preparada uma placa de 4 poços com meio de carregamento e meio de cultura para lavagem, que é colocada na estufa a 37°C, 6% CO₂ e 5% O₂ pelo menos 5 horas antes do procedimento. Os embriões em cultura são, então, avaliados, de modo a selecionar os que possuem melhor qualidade. Os embriões selecionados são colocados durante 15 minutos em meio de carregamento. Este meio, designado como meio de adesão, é uma solução viscosa que se assemelha às propriedades naturais das secreções uterinas, tendo como vantagens reduzir a probabilidade de expulsão dos embriões após transferência e facilitar a aposição e adesão do embrião ao endométrio (Balaban *et al.*, 2014).

Durante o período em que os embriões estão no meio de adesão, procede-se à preparação da paciente. Com a paciente deitada, é introduzido um espécuro na vagina para permitir a examinação e limpeza do colo do útero com uma compressa. Enquanto este procedimento é executado pelo ginecologista na sala de transferência, o embriologista faz o carregamento dos embriões no laboratório. O carregamento dos embriões é executado com recurso a um cateter de transferência. O cateter é acoplado a uma seringa com meio de cultura, procedendo-se à sua lavagem (Brinsden, 2005). O carregamento propriamente dito envolve a aspiração segundo esta ordem: meio de carregamento – bolha de ar – meio de carregamento com os

embriões – bolha de ar – meio de carregamento. É fundamental que o volume de meio aspirado seja muito reduzido para não prejudicar a implantação (Balaban *et al.*, 2014).

O cateter é, por fim, levado para a sala de transferência e entregue ao ginecologista, que o manobra suavemente através do canal cervical até atingir o útero (Brinsden, 2005). Este procedimento deve ser guiado com ecografia abdominal, permitindo que os embriões sejam depositados a 1 a 2 cm do fundo uterino (Figura 38) (Alper, 2012). Após a expulsão dos embriões, aguarda-se um momento até à retirada lenta e cuidadosa do cateter, que é levado de novo para o laboratório para ser inspecionado para a presença de embriões retidos. Caso isto aconteça, os embriões devem ser novamente carregados num novo cateter e imediatamente transferidos. No final de todo o procedimento, a paciente deve repousar durante 30 minutos até retomar a sua atividade normal (Brauer e Schattman, 2014). Os embriões excedentários de boa qualidade devem ser criopreservados segundo consentimento do casal (Gianaroli *et al.*, 2012).

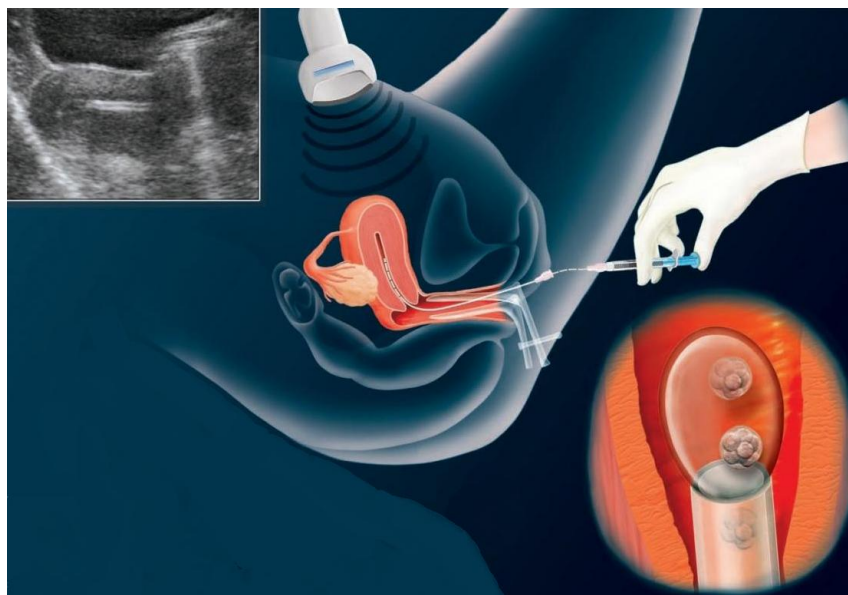


Fig. 38 – Representação de uma transferência de embriões. Na imagem pode observar-se o espéculo inserido na vagina e o cateter de transferência, onde se encontram os embriões, acoplado a uma seringa, no interior da cavidade uterina. No canto superior esquerdo observa-se uma imagem resultante da visualização ecográfica. Retirada e adaptada de <http://www.ivfconnections.com/forums/content.php/569-After-IVF-Embryo-Transfer-What-You-Need-to-Know>, acedido a 24/07/2016.

Complicações que podem levar a uma transferência com menor taxa de sucesso incluem trauma endometrial, indução de contrações uterinas, danos nos embriões ou deposição dos embriões numa localização subótima (Brauer e Schattman, 2014). Também as características dos cateteres são fundamentais para o sucesso deste procedimento, estando o uso de cateteres flexíveis associado a melhores resultados (Gianaroli *et al.*, 2012).

8.1. Eclosão Assistida

A eclosão do blastocisto é um passo fundamental numa sequência de eventos fisiológicos que culminam na implantação (ASRM e SART, 2014). A eclosão da ZP é alcançada através de processos mecânicos – ciclos de contração e expansão do blastocisto – e ação enzimática – lisinas libertadas pelo embrião e pelo útero – que permitem a sua rotura (Veiga e Belil, 2012). A falha da eclosão pode ser um dos fatores responsáveis pelas baixas taxas de implantação em embriões resultantes de técnicas de PMA (Petersen *et al.*, 2005). Estas falhas podem dever-se ao espessamento ou endurecimento da ZP, a alterações na secreção das lisinas ou a modificações nos ciclos de contração-expansão do blastocisto (Veiga e Belil, 2012).

Em 1990 surgiu a eclosão assistida (EA), através da qual é possível, artificialmente, reduzir a espessura da ZP ou criar uma abertura nesta camada. A EA pode ser alcançada através de diferentes abordagens, como o ZD com tampão ácido de *Tyrode*, a PZD e o laser (ASRM e SART, 2014). Apesar do equipamento ser dispendioso, a EA com recurso a laser parece ser o método mais seguro, simples e rápido, englobando a consistência na realização entre diferentes operadores (Elder e Dale, 2011; Hammadeh *et al.*, 2011). A EA pode ser aplicada antes da transferência em embriões em fase de clivagem (dia 3) ou blastocistos (Veiga e Belil, 2012).

A técnica do laser é executada ao microscópio ótico invertido, com superfície aquecida, diretamente na placa onde os embriões se encontram em cultura (Petersen *et al.*, 2005). A fotoablação da ZP deve ser precisa e rápida de modo a evitar efeitos termogénicos ou mutagénicos. Finalizado este procedimento, os embriões sujeitos a EA devem ser mantidos em cultura durante um período mínimo de 30 minutos (Veiga e Belil, 2012).

A EA possui um bom prognóstico em casos de falhas sucessivas de implantação, transferência de embriões criopreservados, casos com mau prognóstico e casos de idade materna avançada (Elder e Dale, 2011; ASRM e SART, 2014). Contudo, não existem evidências suficientes para a sua recomendação como técnica integrante da rotina laboratorial (Veiga e Belil, 2012).

Como todas as técnicas, a EA também possui algumas complicações associadas, tais como danos letais ou danos nos blastómeros que comprometam a viabilidade do embrião, estando ainda implicado um risco de gravidez de gémeos monozigóticos devido à manipulação da ZP (ASRM e SART, 2014).

9. Criopreservação

O procedimento que torna possível o armazenamento de células viáveis a baixas temperaturas (normalmente -196°C em azoto líquido) é designado por criopreservação (Di Santo *et al.*, 2012). A criopreservação bem-sucedida em contexto de PMA foi alcançada inicialmente em 1954 com espermatozoides, e só depois em embriões e ovócitos em 1986. A criopreservação de espermatozoides e embriões é atualmente parte integrante da prática laboratorial (Zhao *et al.*, 2011).

As técnicas usadas para criopreservação em PMA devem garantir a sobrevivência e viabilidade das células após descongelação (Zhao *et al.*, 2011). Contudo, este processo possui riscos associados, que incluem danos provocados pela descida da temperatura, o que pode levar à formação de cristais de gelo que perturbem o fuso meiótico/mitótico. A adição de crioprotetores aos meios de criopreservação pode prevenir a formação de cristais de gelo (Elder e Dale, 2011).

Os dois métodos principais utilizados na criopreservação são a congelação lenta e a vitrificação. A congelação lenta envolve um processo de arrefecimento programado em conjunto com baixas concentrações de crioprotetores. Por sua vez, a vitrificação é alcançada usando altas concentrações de crioprotetores e taxas de arrefecimento extremamente rápidas ($15\ 000$ a $30\ 000^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$), resultando na solidificação da água num estado vítreo sem a formação de cristais de gelo. As concentrações elevadas dos crioprotetores associadas à citotoxicidade podem ser ultrapassadas graças à introdução de crioprotetores com alta permeabilidade membranar e baixa toxicidade em conjunto com concentrações apropriadas de crioprotetores não permeáveis (Antinori *et al.*, 2007). Dados recentes sugerem que a vitrificação pode resultar em melhores resultados clínicos comparativamente com os protocolos de congelação lenta (Zhao *et al.*, 2011).

9.1. Criopreservação de Embriões

A criopreservação de embriões permite a transferência de um número limitado de embriões e o conseqüente armazenamento dos embriões supranumerários de boa qualidade, maximizando deste modo as taxas cumulativas de sucesso de um único ciclo de FIV/ICSI e evitando uma nova estimulação ovárica (Loutradi *et al.*, 2008). Adicionalmente é uma ferramenta de grande utilidade em casos em que a

transferência de embriões é cancelada, quer devido a risco de SHO, hemorragia endometrial ou quaisquer outros eventos não planeados (Konc *et al.*, 2014). É ainda importante em casos em que uma recetora de ovócitos não se encontra sincronizada com a sua dadora (Blayney, 2005).

Uma revisão de Loutradi e colaboradores (2008) comparou os resultados obtidos entre os dois métodos de criopreservação disponíveis e demonstrou que a vitrificação de embriões em fase de clivagem e de blastocisto apresenta maiores taxas de sobrevivência após desvitrificação comparativamente com a congelação lenta. Estas taxas elevadas podem dever-se ao menor risco de dano celular com esta técnica, levando a que a maioria dos laboratórios adote a vitrificação como método principal (Balaban *et al.*, 2014).

A vitrificação de embriões deve realizar-se respeitando cuidadosamente todos os intervalos de tempos discriminados nos protocolos, de modo a que os embriões, após vitrificação, mantenham todas as características estruturais e, conseqüentemente, todas as funções fisiológicas, assim como o seu metabolismo, inalterados.

O protocolo de vitrificação, segundo o método Rapid-i™ (*Vitrolife*, Suécia), engloba a preparação de uma placa de 4 poços com os meios de vitrificação, conforme o estado de desenvolvimento do embrião – RapidVit Cleave™ para embriões em fase de clivagem e RapidVit Blast™ para blastocistos. A placa é incubada na estufa a 37°C durante, pelo menos, 30 minutos antes do procedimento. Os blastocistos devem ser previamente colapsados com recurso a laser de modo a aumentar as suas taxas de sobrevivência (Elder e Dale, 2011). Findado o tempo de incubação da placa, os embriões selecionados são colocados nos poços pela ordem e tempos apresentados na tabela 15. O carregamento da palheta de vitrificação deve ser realizado o mais rapidamente possível e com um volume mínimo de meio, não excedendo os 2 embriões por palheta. A palheta é colocada no interior de uma palheta externa, que se encontra em azoto líquido, sendo posteriormente selada e armazenada no contentor de azoto líquido.

No dia da transferência dos embriões criopreservados, é realizada a desvitrificação com recurso a meios de aquecimento – RapidWarm Cleave™ para embriões em fase de clivagem e RapidWarm Blast™ para blastocistos – preparados do mesmo modo que os meios anteriores. A palheta, retirada do contentor e colocada em azoto líquido, é cortada e imersa no primeiro meio da placa de 4 poços, sendo seguidamente transferidos entre os diferentes meios pela ordem e tempos

apresentados na tabela 15. No final, os embriões são colocados numa nova placa com meio de cultura previamente equilibrado, onde é avaliada a sua qualidade pós-desvitrificação, sendo mantidos na estufa a 37°C, 6% CO₂ e 5% O₂ até à hora da transferência.

Tabela 15 – Vitrificação e aquecimento de embriões. Estão apresentados o número de meios e os tempos de permanência em cada um deles, conforme se trate de vitrificação ou aquecimento de embriões em fase de clivagem ou blastocistos, segundo o método Rapid-i™ (Vitrolife, Suécia). De notar que apenas o meio RapidWarm Cleave™ possui um quarto meio de aquecimento.

Vitrificação			Aquecimento		
Meio	RapidVit Cleave™	RapidVit Blast™	Meio	RapidWarm Cleave™	RapidWarm Blast™
1	5 – 10 min	5 – 20 min	1	10 – 30 s	2 min
2	2 min	2 min	2	1 min	3 min
3	30 s	45 s	3	2 min	5 – 10 min
			4	5 min	

9.2. Criopreservação de Ovócitos

A criopreservação de ovócitos tem vindo a ser introduzida na prática clínica, apesar de muitas vezes ser considerada experimental (Konc *et al.*, 2014). A ampla aplicação da criopreservação de ovócitos permite:

- Preservar a fertilidade em mulheres sujeitas a tratamentos oncológicos, FOP, doenças crónicas ou cirurgias à região pélvica que impliquem a remoção dos ovários durante a idade reprodutiva (Kuwayama, 2012);
- Ultrapassar os problemas legais, morais e religiosos associados à criopreservação de embriões em alguns países (Antinori *et al.*, 2007);
- Criar bancos de ovócitos que evitam os problemas inerentes à necessidade de sincronização dadora-recetora (Konc *et al.*, 2014);
- Armazenar ovócitos excedentários para evitar a produção de embriões supranumerários (Gianaroli *et al.*, 2012);
- Permitir o adiamento da maternidade por motivos pessoais ou profissionais – criopreservação por razões não-médicas (Konc *et al.*, 2014).

O ovócito maduro possui características biológicas muito particulares – grande tamanho, alta sensibilidade a baixas temperaturas, alta fragilidade, alto conteúdo em água, razão volume:área superficial elevada, presença de fuso meiótico e outros organelos celulares e baixa permeabilidade membranar (Konc *et al.*, 2014). Estas

particularidades tornam o ovócito suscetível a danos durante a criopreservação (Antinori *et al.*, 2007). A formação intracelular de cristais de gelo causa danos no citoesqueleto, que é também sensível ao *stress* osmótico. A disrupção do fuso meiótico pode causar anomalias cromossômicas e aneuploidias. A descida da temperatura ou a própria ação dos crioprotetores podem causar um aumento no Ca^{2+} intracelular, que leva a modificações nos mecanismos de sinalização e à ativação do ovócito (Elder e Dale, 2011).

Os fatores que podem influenciar a eficiência da criopreservação são muito variados, incluindo a idade materna, a qualidade dos ovócitos e, mais importante, a técnica utilizada – criopreservação lenta ou vitrificação (Gianaroli *et al.*, 2012). Uma revisão de Antinori e colaboradores (2007) confirmou resultados obtidos por outros autores, indicando que a vitrificação é o método preferencial para criopreservação de ovócitos por ser uma técnica rápida e pouco dispendiosa capaz de preservar a integridade biológica dos ovócitos, resultando em elevadas taxas de sobrevivência e gravidez. Deste modo, a criopreservação de ovócitos deve deixar de ser considerada uma técnica experimental (ASRM e SART, 2013).

O protocolo de vitrificação para ovócitos, segundo o método Rapid-i™ (*Vitrolife*, Suécia), tem muitos pontos em comum com a vitrificação de embriões. Os ovócitos têm de ser desnudados previamente à criopreservação, segundo o descrito na secção 3.7.. Apenas os ovócitos maduros serão submetidos a este processo, podendo ser vitrificados de imediato ou colocados em cultura. Os ovócitos selecionados são, então, colocados nos poços da placa de 4 poços previamente equilibrada a 37 °C com os meios de vitrificação (RapidVit Oocyte™), seguindo a ordem e os tempos apresentados na tabela 16. O carregamento da palheta e posterior armazenamento é idêntico ao descrito na secção 9.1..

Tabela 16 – Vitrificação e aquecimento de ovócitos. Estão apresentados o número de meios e os tempos de permanência em cada um deles, conforme se trate de vitrificação ou aquecimento de ovócitos, segundo o método Rapid-i™ (*Vitrolife*, Suécia). De notar que o meio RapidWarm Oocyte™ possui um quarto meio de aquecimento.

Vitrificação		Aquecimento	
Meio	RapidVit Oocyte™	Meio	RapidWarm Oocyte™
1	5 – 20 min	1	1 min
2	2 – 5 min ^a	2	3 min
3	25 – 35 s	3	5 min
		4	5 – 10 min

^aÉ esperado que os ovócitos neste meio sofram re-expansão e retomem o seu volume original nos 5 minutos. Se tal não acontecer pode ser indicativo de que o meio não se encontra a 37°C.

No dia da ICSI²³, a desvitrificação é realizada cerca de 1 a 2 horas antes da microinjeção, com recurso a meios de aquecimento (RapidWarm Oocyte™) previamente equilibrados a 37 °C. A palheta, retirada do contentor e colocada em azoto líquido, é cortada e imersa no primeiro meio, sendo os ovócitos seguidamente transferidos entre os diferentes meios pela ordem e tempos apresentados na tabela 16. No final, os ovócitos são colocados numa placa com meio de cultura previamente equilibrado, onde se realiza a sua lavagem e se verifica a sua qualidade pós-desvitrificação, sendo mantidos na estufa a 37 °C, 6% CO₂ e 5%O₂ até à hora da ICSI.

9.3. Criopreservação de Espermatozoides

A criopreservação de espermatozóides é parte integrante das técnicas de PMA. Possui uma grande importância em casos de manutenção da fertilidade masculina em pacientes oncológicos – submetidos a quimio ou radioterapia ou à remoção das gónadas em idade reprodutiva – e em casos de doenças não malignas, como diabetes e doenças autoimunes, que podem levar a dano testicular. A criopreservação de espermatozoides é ainda utilizada para a criação de bancos de dadores masculinos e para o armazenamento de amostras obtidas de biópsia testicular, de modo a evitar novas intervenções. Além disso, permite a criopreservação dos gâmetas masculinos quando os casais iniciam o tratamento de PMA e o elemento masculino não pode realizar a colheita no dia da punção folicular (Di Santo *et al.*, 2012).

Os espermatozoides são células relativamente simples com uma razão área superficial:volume elevada e uma alta permeabilidade à água, garantindo um equilíbrio osmótico rápido na presença de crioprotetores (Blayney, 2005). Por estas razões, os espermatozoides parecem ser menos sensíveis a danos resultantes da criopreservação (Di Santo *et al.*, 2012). Apesar disso, a criopreservação pode ter efeitos deletérios na estrutura e função espermática – redução da motilidade, alterações na membrana plasmática e acrossómica e ainda danos na cromatina. Estes riscos associados à criopreservação não impedem que esta seja uma ferramenta de grande relevância nos tratamentos de infertilidade (Paoli *et al.*, 2014).

O método de criopreservação de espermatozoides inicia-se com a colheita e processamento da amostra seminal segundo as secções 3.2. e 3.3., respetivamente. Após o *swim-up*, é adicionado o crioprotetor (previamente colocado à temperatura

²³A ICSI é o método utilizado para inseminação dos ovócitos sujeitos a criopreservação devido ao endurecimento da ZP resultante deste processo (Elder e Dale, 2011).

ambiente) ao meio com os espermatozoides numa diluição 3:1, se a qualidade da amostra for boa, ou então 2:1 ou 1:1 no caso de uma menor qualidade (Blayney, 2005). A eficácia do crioprotetor é dependente do tempo de interação entre a solução crioprotetora e as células e da temperatura a que esta exposição ocorre. Por esta razão, a solução crioprotetora é adicionada gota a gota, com homogeneização suave para evitar o *stress* osmótico (Paoli *et al.*, 2014). A amostra bem homogeneizada é carregada em palhetas devidamente identificadas, que são seladas por calor em ambas as extremidades. As palhetas são colocadas durante 30 minutos a 5°C, seguidamente em vapor de azoto durante 30 minutos a uma temperatura que ronda os -80°C e, por fim, são mergulhadas no azoto líquido. Este método pode causar a formação de cristais de gelo se a taxa de arrefecimento for muito rápida ou muito lenta (Paoli *et al.*, 2014).

O processo de descongelação é igualmente importante, uma vez que deve permitir a recuperação da normal atividade biológica por parte dos espermatozoides. Deste modo, devem ser evitadas mudanças de temperatura abruptas (Di Santo *et al.*, 2012). A palheta de criopreservação é, então, retirada do contentor e colocada à temperatura ambiente até descongelar. Seguidamente cortam-se as extremidades seladas e adiciona-se a amostra a um tubo. Nesta fase, acrescentam-se 2 ml de meio de cultura previamente aquecido a 37°C à amostra, que vai a centrifugar a 1000 rpm durante 15 minutos a 35°C. Esta centrifugação tem como objetivo remover o sobrenadante e lavar a amostra (Di Santo *et al.*, 2012).

A criopreservação de espermatozoides não tem avançado ao longo do tempo. Uma das razões para fundamentar esta paragem pode basear-se no facto de que, apesar das taxas de sobrevivência não serem as melhores – a perda pode ir até aos 50% – a fertilização e os resultados, de um modo geral, não são afetados devido ao grande número de células disponíveis para os tratamentos e ao sucesso da fertilização (Blayney, 2005; Elder e Dale, 2011).

10. Doação de Gâmetas e Embriões

As opções disponíveis através da doação proporcionaram a muitos casais a oportunidade de tornar o seu sonho da paternidade uma realidade (ASRM, 2012c). Segundo a lei nº 32/2006 do Diário da República, *“pode recorrer-se à dádiva de ovócitos, de espermatozoides ou de embriões quando, face aos conhecimentos médico-científicos objetivamente disponíveis, não possa obter-se gravidez através do recurso a qualquer outra técnica que utilize os gâmetas dos beneficiários e desde que sejam asseguradas condições eficazes de garantir a qualidade dos gâmetas”*.

A doação de gâmetas é voluntária, de carácter benévolo e não remunerada, embora possam receber uma compensação estritamente limitada ao reembolso das despesas efetuadas ou dos prejuízos direta e imediatamente resultantes da dádiva. Para além disso, a doação é anónima e *“os dadores não podem ser havidos como progenitores da criança que vai nascer”*.

A seleção dos dadores deve ser executada com base na idade, saúde e antecedentes médicos. Para tal, é fornecido um questionário e realiza-se uma entrevista pessoal. Devem, então, ser tidos em conta os limites de idade, a história pessoal – clínica, reprodutiva e sexual, médica e cirúrgica – e familiar, bem como os hábitos de vida e a avaliação psicológica. Os centros de doação devem assegurar que os potenciais dadores são submetidos aos testes de rastreio obrigatórios nestas situações.

10.1. Doação de Espermatozoides

A idade dos dadores masculinos deve estar compreendida entre os 18 e os 40 anos. Os possíveis dadores são sujeitos a uma consulta de entrevista, consulta de psicologia e análises sanguíneas que incluam marcadores víricos e estudo genético. É também realizado um espermograma, segundo as indicações da secção 3.1., para avaliação da qualidade espermática da amostra. Se todas as condições estiverem reunidas, o dador inicia a dádiva de gâmetas. A colheita é realizada por recurso a masturbação, processada em laboratório (secção 3.2.) e criopreservada (secção 9.3.). No dia seguinte à primeira colheita é realizado um teste de descongelamento da amostra. São realizadas um total de 5 a 6 colheitas, que são mantidas em quarentena durante 180 dias. Findado este período, as análises sanguíneas devem ser repetidas, só

podendo ser efetivamente utilizadas caso o resultado seja negativo para todos os vírus rastreados. O resultado positivo em algum deles implica a exclusão do dador. É aconselhável que cada dador masculino não tenha dado origem a mais de 8 partos de nados-vivos.

O recurso a doação de espermatozoides está indicado para casais em que o fator masculino é bastante afetado – OA e NOA, em que não é possível recuperar espermatozoides a partir técnicas cirúrgicas. É também bastante útil em casos em que o elemento masculino possui uma doença genética transmissível à descendência ou em situações de remoção cirúrgica das gónadas (ASRM, 2012c).

10.2. Doação de Ovócitos

A idade das dadoras de ovócitos deve estar compreendida entre os 18 e os 33 anos. As possíveis dadoras são sujeitas a uma consulta de entrevista, consulta de psicologia e análises sanguíneas que incluam marcadores víricos e estudo genético. Para além disso, é também realizado um exame ginecológico com colheita de citologia cervico-vaginal e ecografia pélvica transvaginal. Se todas as condições estiverem reunidas, a dadora é aceite no processo de doação. Quando é encontrada uma recetora compatível, procede-se à sua coordenação com o ciclo menstrual da recetora através de estimulação ovárica (secção 3.4.). Cada dador feminino não pode efetuar mais do que três dádivas ao longo da vida, independentemente da doação dar origem ou não a uma gravidez. O intervalo entre as doações terá de ser superior a 6 meses. Antes do início de cada ciclo, a dadora repete as análises sanguíneas. No caso dos resultados serem positivos, não se procede à recolha dos ovócitos.

O recurso a doação de ovócitos está indicado para casais em que a mulher possua idade avançada, FOP, falha ovárica devido a tratamentos oncológicos, remoção cirúrgica das gónadas e ainda disgenesia gonadal. Para além disso, é utilizada em mulheres com falhas repetidas de implantação em ciclos de FIV/ICSI e com resposta inadequada à indução ovárica. É também importante em situações em que a mulher possua anomalias genéticas transmissíveis à descendência (ASRM, 2012c).

10.3. Doação de Embriões

A doação de embriões é um procedimento que permite que embriões que foram desenvolvidos em casos de casais que recorreram a tratamentos de infertilidade sejam utilizados por outro casal infértil. Este tipo de doação está indicada para situações de infertilidade não tratável que envolvam ambos os parceiros, abortamento recorrente aparentemente relacionado com fatores embrionários e ainda em casos de doenças genéticas presentes em um ou ambos os elementos do casal (ASRM, 2012c).

O processo de doação de embriões requer que o casal recetor seja submetido a todos os exames médicos e psicológicos recomendados para ciclos de doação. A gravidez após doação de embriões está dependente da qualidade da criopreservação dos embriões, da idade da mulher da qual provieram os ovócitos e ainda do número de embriões transferidos (ASRM, 2012c).

Considerações Finais

O estágio desenvolvido ao longo deste ano no Centro de Estudos de Infertilidade e Esterilidade permitiu a confirmação da minha vontade em trabalhar na área da Procriação Medicamente Assistida. O facto de ser possível dar aos casais inférteis a oportunidade de realizarem um dos seus maiores desejos, a parentalidade, torna todo este trabalho extremamente gratificante e motivador.

Para todos os objetivos serem cumpridos, a execução laboratorial tem de ser desenvolvida com todo o rigor e metodologia descritos ao longo deste relatório de estágio. Durante este ano, ao nível do laboratório de andrologia, desenvolvi a capacidade de realizar, de forma autónoma, a análise e processamento de amostras seminais utilizadas nos vários tratamentos disponíveis. Para além disso, pude ainda contactar com todo o processo de seleção de dadores masculinos, incluindo a análise, processamento, criopreservação e testes de descongelação das amostras seminais, realizando ainda a descongelação dessas mesmas amostras para utilização em ciclos de tratamento. Relativamente ao processamento de gâmetas femininos, pude realizar a triagem dos complexos *cumulus*-ovócito após punção folicular, a avaliação da maturidade ovocitária, a desnudação de ovócitos e ainda a sua criopreservação. No que diz respeito ao laboratório de embriologia, foi-me dada a oportunidade de executar inseminações de ovócitos em fertilizações *in vitro*, de desenvolver a aptidão para avaliar a qualidade embrionária ao longo da cultura de embriões e também de trocar os embriões de meio nos casos do sistema de cultura sequencial.

Com recurso a ovócitos não fecundados e a embriões sem condições para vitrificação, pude treinar técnicas mais complexas e delicadas, que exigem muita prática, como é o caso da injeção intracitoplasmática de espermatozoides, carregamento dos cateteres para transferência de embriões e criopreservação de embriões. Ao longo deste ano, consegui ainda assistir a procedimentos realizados com menor frequência, o diagnóstico genético pré-implantação e a biópsia testicular, com a possibilidade de pesquisar espermatozoides e processar o tecido testicular extraído.

Na sala de exames, pude assistir e auxiliar em punções foliculares, inseminações intrauterinas e transferências de embriões, permitindo um maior contacto com o trabalho dos ginecologistas bem como com os casais em tratamento.

Todas as competências que adquiri de forma autónoma ao longo deste estágio, bem como as técnicas que necessitam de uma maior prática laboratorial, impulsionam a minha vontade de querer aprender mais e de me empenhar ao máximo no futuro.

Referências Bibliográficas

- Agarwal A, Bragais FM e Sabanegh E** (2008) Assessing Sperm Function. *Urologic Clinics of North America* **35** 157–171.
- Allahbadia GN e Merchant R** (2012) Intrauterine Insemination. Em *Practical Manual of In Vitro Fertilization: Advanced Methods and Novel Devices*, pp 281–296. Eds ZP Nagy, AC Varghese e A Agarwal. Nova Iorque: Springer.
- Alper MM** (2012) Treatment options III. In vitro fertilization. Em *The Boston IVF Handbook of Infertility, 3ª edição*, pp 69–82. Eds SR Bayer, MM Alper e AS Penzias. Londres: Informa Healthcare.
- Alpha SiRM e ESHRE SIGE** . (2011) Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: Proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction* **26** 1270–1283.
- Alrabeeh K e Zini A** (2015) Male Infertility Laboratory Investigation: A Critical Analysis of the 2010 World Health Organization Semen Analysis Guidelines. Em *Non-Invasive Sperm Selection for In Vitro Fertilization: Novel Concepts and Methods*, pp 1–6. Eds A Agarwal, E Borges Jr e AS Setti. Nova Iorque: Springer.
- Angell NF, Moustafa HF, Rizk B, Nawar MG, Rizk CB, Huff CA, Kennedy R, Holland SB, Hazelton J, Garcia-Velasco JA et al.** (2008) Intrauterine Insemination. Em *Infertility and Assisted Reproduction*, pp 416–427. Eds B Rizk, J Garcia-Velasco, H Sallam e A Makrigiannakis. Nova Iorque: Cambridge University Press.
- Anguiano A, Oates RD, Amos JA, Dean M, Gerrard B, Stewart C, Maher TA, White MB e Milunsky A** (1992) Congenital bilateral absence of the vas deferens. A primarily genital form of cystic fibrosis. *The Journal of the American Medical Association* **267** 1794–1797.
- Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C e Antinori S** (2007) Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries. *Reproductive* **14** 72–79.
- ASEBIR** (2015) *Cuadernos de embriología clínica - Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos*. Madrid:

Góbal, Agencia Creativa Digital.

ASRM (2012a) The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Smoking and infertility: A committee opinion. *Fertility and Sterility* **98** 1400–1406.

ASRM (2012b) The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile male: A committee opinion. *Fertility and Sterility* **98** 294–301.

ASRM (2012c) Third-Party Reproduction - A Guide for Patients. *American Society for Reproductive Medicine*.

ASRM (2015) Assisted reproductive technology - A Guide for Patients. *American Society for Reproductive Medicine*.

ASRM e SART (2013) The Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology. Mature oocyte cryopreservation: a guideline. *Fertility and Sterility* **99** 37–43.

ASRM e SART (2014) The Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology. Role of assisted hatching in in vitro fertilization: A guideline. *Fertility and Sterility* **102** 348–351.

AUA (2010) *The Optimal Evaluation of the Infertile Male: AUA Best Practice Statement*. Maryland: American Urological Association.

Balaban B, Sakkas D e Gardner D (2014) Laboratory Procedures for Human In Vitro Fertilization. *Seminars in Reproductive Medicine* **32** 272–282.

Barnes FL (2012) Micromanipulation. Em *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Volume 1 - Laboratory Perspectives, 4ª edição*, pp 163–171. Eds DK Gardner, A Weissman, CM Howles e Z Shoham. Flórida: Taylor & Francis Group.

Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA e Soules MR (1996) Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Human Reproduction* **11** 2217–2222.

Bayer SR (2012a) Factors affecting fertility. Em *The Boston IVF Handbook of Infertility, 3ª edição*, pp 11–18. Eds SR Bayer, MM Alper e AS Penzias. Londres: Informa

Healthcare.

Bayer SR (2012b) Treatment options II. Intrauterine inseminations. Em *The Boston IVF Handbook of Infertility*, 3ª edição, pp 65–68. Eds SR Bayer, MM Alper e AS Penzias. Londres: Informa Healthcare.

Bayer SR e Alper MM (2012) The infertility workup. Em *The Boston IVF Handbook of Infertility*, 3ª edição, pp 19–34. Eds SR Bayer, MM Alper e AS Penzias. Londres: Informa Healthcare.

Best L (2015) Equipment required for time-lapse observations in in vitro fertilization. Em *Atlas of Time Lapse Embryology*, pp 1–6. Eds A Campbell e S Fishel. Nova Iorque: CRC Press.

Bettocchi S, Nappi L, Ceci O e Selvaggi L (2004) Office hysteroscopy. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* **31** 641–654.

Blayney M (2005) Cryopreservation of embryos and spermatozoa. Em *Textbook of in Vitro Fertilization and Assisted Reproduction: The Bourn Hall Guide to Clinical and Laboratory Practice*, 3ª edição, pp 319–336. Ed P Brinsden. Londres: Taylor & Francis Group.

Boivin J, Bunting L, Collins JA e Nygren KG (2007) International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: Potential need and demand for infertility medical care. *Human Reproduction* **22** 1506–1512.

Bossert NL e De Jonge CJ (2007) Sperm Preparation for IVF and ICSI. Em *In Vitro Fertilization - A Practical Approach*, pp 147–160. Ed D Gardner. Nova Iorque: Informa Healthcare USA.

Bourne H, Archer J, Edgar DH e Baker HG (2012) Sperm preparation techniques. Em *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Volume 1 - Laboratory Perspectives*, 4ª edição, pp 61–74. Eds DK Gardner, A Weissman, CM Howles e Z Shoham. Flórida: Taylor & Francis Group.

Brandell RA, Mielnik A, Liotta D, Ye Z, Veeck LL, Palermo GD e Schlegel PN (1998) AZFb deletions predict the absence of spermatozoa with testicular sperm extraction: preliminary report of a prognostic genetic test. *Human reproduction* **13** 2812–2815.

Brannigan RE (2003) Azoospermic Men. Em *Sperm Collection and Processing*

Methods - A practical guide, pp 50–84. Ed RS Jeyendran. Nova Iorque: Cambridge University Press.

Brauer AA e Schattman G (2014) Embryo Transfer. Em *Human Fertility - Methods and Protocols*, pp 541–548. Eds Z Rosenwaks e PM Wassarman. Nova Iorque: Humana Press.

Brinsden P (2005) Oocyte recovery and embryo transfer techniques for in vitro fertilization. Em *Textbook of in Vitro Fertilization and Assisted Reproduction: The Bourn Hall Guide to Clinical and Laboratory Practice, 3ª edição*, pp 271–286. Ed P Brinsden. Londres: Taylor & Francis Group.

Bronet F, Nogales MC, Martínez E, Ariza M, Rubio C, García-Velasco JA e Meseguer M (2015) Is there a relationship between time-lapse parameters and embryo sex? *Fertility and sterility* **103** 396–401.

Chillon M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S, Romey MC, Ruiz-Romero J, Verlingue C, Claustres M et al. (1995) Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *The New England Journal of Medicine* **332** 1475–1480.

Comhaire F e Mahmoud A (2008) Male Factor Infertility: State of the ART. Em *Infertility and Assisted Reproduction*, pp 178–186. Eds B Rizk, J Garcia-Velasco, H Sallam e A Makrigiannakis. Nova Iorque: Cambridge University Press.

Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HWG, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT et al. (2009) World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction Update* **16** 231–245.

Dahdouh EM, Balayla J e Audibert F (2015) Technical Update: Preimplantation Genetic Diagnosis and Screening. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada* **323** 451–463.

Desai N, Ploskonka S, Goodman LR, Austin C, Goldberg J e Falcone T (2014) Analysis of embryo morphokinetics, multinucleation and cleavage anomalies using continuous time-lapse monitoring in blastocyst transfer cycles. *Reproductive Biology and Endocrinology* **12** 54.

DGS (2008) Saúde Reprodutiva - Infertilidade. *Normas da Direção-Geral da Saúde*.

DGS (2010) Saúde Reprodutiva - Infertilidade. Cuidados de Saúde Primários. *Normas da Direção-Geral da Saúde*.

DGS (2011) Saúde Reprodutiva - Infertilidade, Cuidados de Saúde Hospitalares. *Normas da Direção-Geral da Saúde*.

Drakopoulos P, Blockeel C, Stoop D, Camus M, De Vos M, Tournaye H e Polyzos NP (2016) Conventional ovarian stimulation and single embryo transfer for IVF/ICSI. How many oocytes do we need to maximize cumulative live birth rates after utilization of all fresh and frozen embryos? *Human Reproduction* **31** 370–376.

Dumoulin JC, Bras M, Coonen E, Dreesen J, Geraedts JP e Evers JL (1998) Effect of $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free medium on the biopsy procedure for preimplantation genetic diagnosis and further development of human embryos. *Human Reproduction* **13** 2880–2883.

EAU (2015) *Guidelines on Male Infertility*. European Association of Urology.

Ebner T (2012a) Oocyte Treatment and Preparation for Microinjection. Em *Practical Manual of In Vitro Fertilization: Advanced Methods and Novel Devices*, pp 361–369. Eds ZP Nagy, AC Varghese e A Agarwal. Nova Iorque: Springer.

Ebner T (2012b) Analysis of fertilization. Em *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Volume 1 - Laboratory Perspectives, 4ª edição*, pp 212–217. Eds DK Gardner, A Weissman, CM Howles e Z Shoham. Flórida: Taylor & Francis Group.

Ebrahimi M e Asbagh FA (2015) The role of autoimmunity in premature ovarian failure. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* **13** 461–472.

Elder K (2005) Routine gamete handling: oocyte collection and embryo culture. Em *Textbook of in Vitro Fertilization and Assisted Reproduction: The Bourn Hall Guide to Clinical and Laboratory Practice, 3ª edição*, pp 287–308. Ed P Brinsden. Londres: Taylor & Francis Group.

Elder K e Dale B (2011) *In-Vitro Fertilization, 3ª edição*. Nova Iorque: Cambridge University Press.

ESHRE (2009) The ESHRE Capri Workshop Group. Intrauterine insemination. *Human Reproduction Update* **15** 265–277.

- Esteves SC** (2014) Clinical relevance of routine semen analysis and controversies surrounding the 2010 World Health Organization criteria for semen examination. *International Brazilian Journal of Urology* **40** 443–453.
- Esteves SC e Verza Jr. S** (2012) PESA/TESE/TESE Sperm Processing. Em *Practical Manual of In Vitro Fertilization: Advanced Methods and Novel Devices*, pp 207–220. Eds ZP Nagy, AC Varghese e A Agarwal. Nova Iorque: Springer.
- Esteves SC, Miyaoka R e Agarwal A** (2011) Sperm retrieval techniques for assisted reproduction. *International Brazilian Journal of Urology* **37** 570–583.
- Faria C** (2014) Abordagem Psicológica do Casal Infértil. Em *Manual de Medicina Sexual - Visão Multidisciplinar*, pp 503–510. Eds F Barros e R Figueiredo. Lisboa: HSJ, Consultores, Lda.
- Fausser B e Devroey P** (2011) *Baby-making: what the new reproductive treatments mean for families and society*. Nova Iorque: Oxford University Press.
- Ferraz L** (2014) Avaliação do Casal Infértil - Fator Masculino. Em *Manual de Medicina Sexual - Visão Multidisciplinar*, pp 461–468. Eds F Barros e R Figueiredo. Lisboa: HSJ, Consultores, Lda.
- Finn A, Scott L, O’Leary T, Davies D e Hill J** (2010) Sequential embryo scoring as a predictor of aneuploidy in poor-prognosis patients. *Reproductive BioMedicine Online* **21** 381–390.
- Fitz MA** (1999) Menstrual Disorders. Em *Clinical gynecologic endocrinology and infertility, 6ª edição*, pp 557–574. Eds L Speroff, RH Glass e NG Kase. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Flint M, Lampiao F, Agarwal A e du Plessis SS** (2012) Sperm Assessment: traditional approaches and their indicative value. Em *Practical Manual of In Vitro Fertilization: Advanced Methods and Novel Devices*, pp 185–192. Eds ZP Nagy, AC Varghese e A Agarwal. Nova Iorque: Springer.
- Frey KA e Patel KS** (2004) Initial evaluation and management of infertility by the primary care physician. *Mayo Clinic Proceedings* **79** 1439–1443.
- Gardner DK e Lane M** (1997) Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Human Reproduction Update* **3** 367–382.
- Gardner D e Lane M** (2012) Culture systems for the human embryo. Em *Textbook of*

Assisted Reproductive Technologies: Volume 1 - Laboratory Perspectives, 4^a edição, pp 218–239. Eds DK Gardner, A Weissman, CM Howles e Z Shoham. Flórida: Taylor & Francis Group.

Gaspar A e Carvalho MJ (2014) Avaliação do Casal Infértil - Fator Feminino. Em *Manual de Medicina Sexual - Visão Multidisciplinar*, pp 469–474. Eds F Barros e R Figueiredo. Lisboa: HSJ, Consultores, Lda.

Gaudet L, Ferraro ZM, Wen SW e Walker M (2014) Maternal Obesity and Occurrence of Fetal Macrosomia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BioMed Research International* **2014** 1–22.

Gianaroli L, Racowsky C, Geraedts J, Cedars M, Makrigiannakis A e Lobo RA (2012) Best practices of ASRM and ESHRE: A journey through reproductive medicine. *Human Reproduction* **27** 3365–3379.

Glazener CM, Ford WC e Hull MG (2000) The prognostic power of the post-coital test for natural conception depends on duration of infertility. *Human Reproduction* **15** 1953–1957.

Gosden LV (2014) Oocyte Retrieval and Quality Evaluation. Em *Human Fertility - Methods and Protocols*, pp 343–360. Eds Z Rosenwaks e PM Wassarman. Nova Iorque: Humana Press.

Granot I e Dekel N (2012) Preparation and evaluation of oocytes for ICSI. Em *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Volume 1 - Laboratory Perspectives*, 4^a edição, pp 114–121. Eds DK Gardner, A Weissman, CM Howles e Z Shoham. Flórida: Taylor & Francis Group.

Gulekli B, Child TJ e Tan SL (2009) Initial investigation of the patient (female and male). Em *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Laboratory and Clinical Perspectives*, 3^a edição, pp 459–468. Eds DK Gardner, A Weissman, CM Howles e Z Shoham. Londres: Informa Healthcare.

Guyton AC e Hall JE (2006) Pregnancy and Lactation. Em *Textbook of Medical Physiology*, 11^a edição, pp 1027–1041. Filadélfia: Saunders.

Hall S e Oates RD (1993) Unilateral absence of the scrotal vas deferens associated with contralateral mesonephric duct anomalies resulting in infertility: laboratory, physical and radiographic findings, and therapeutic alternatives. *The Journal of Urology* **150** 1161–1164.

- Hammadeh ME, Fischer-Hammadeh C e Ali KR** (2011) Assisted hatching in assisted reproduction: A state of the art. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **28** 119–128.
- Hardarson T, Van Landuyt L e Jones G** (2012) The blastocyst. *Human Reproduction* **27** i72–i91.
- Harper J** (2011) Preimplantation genetic diagnosis. Em *In-Vitro Fertilization*, 3ª edição, pp 238–251. Eds K Elder e B Dale. Nova Iorque: Cambridge University Press.
- Hens K, Dondorp W, Handyside AH, Harper J, Newson AJ, Pennings G, Rehmann-Sutter C e de Wert G** (2013) Dynamics and ethics of comprehensive preimplantation genetic testing: A review of the challenges. *Human Reproduction Update* **19** 366–375.
- Herrero J e Meseguer M** (2013) Selection of high potential embryos using time-lapse imaging: The era of morphokinetics. *Fertility and Sterility* **99** 1030–1034.
- Herrler A e Beier HM** (2000) Assessment of Oocyte and Early Embryo Morphology with Regard to Embryonic Development and the Outcome of Assisted Reproduction. Em *Manual on Assisted Reproduction*, 2ª edição, pp 303–320. Eds T Rabe, K Dietrich e T Stowitzki. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Hickman T, Cabrera R, McKenzie L, Moustafa H e Rizk B** (2008) Evaluation of the Infertile Female. Em *Infertility and Assisted Reproduction*, pp 55–69. Eds B Rizk, J Garcia-Velasco, H Sallam e A Makrigiannakis. Nova Iorque: Cambridge University Press.
- Hirsh AV** (2005) The management of infertile men presenting in the assisted conception unit. Em *Textbook of in Vitro Fertilization and Assisted Reproduction: The Bourn Hall Guide to Clinical and Laboratory Practice*, 3ª edição, pp 35–60. Ed P Brinsden. Londres: Taylor & Francis Group.
- Huang JYJ e Rosenwaks Z** (2014) Assisted Reproductive Techniques. Em *Human Fertility - Methods and Protocols*, pp 171–232. Eds Z Rosenwaks e PM Wassarman. Nova Iorque: Humana Press.
- Iwarsson E, Malmgren H e Blennow E** (2011) Preimplantation genetic diagnosis: twenty years of practice. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* **16** 74–80.
- Jeyendran RS** (2003) Introduction. Em *Sperm Collection and Processing Methods - A*

practical guide, pp 1–8. Ed RS Jeyendran. Nova Iorque: Cambridge University Press.

Jeyendran RS e Niederberger C (2003) Sperm procurement methods. Em *Sperm Collection and Processing Methods - A practical guide*, pp 9–14. Ed RS Jeyendran. Nova Iorque: Cambridge University Press.

Jeyendran RS e Zhang XJ (2003) Sperm processing methods. Em *Sperm Collection and Processing Methods - A practical guide*, pp 105–110. Ed RS Jeyendran. Nova Iorque: Cambridge University Press.

Joris H, Nagy Z, Van de Velde H, De Vos A e Van Steirteghem A (1998) Intracytoplasmic sperm injection: laboratory set-up and injection procedure. *Human Reproduction* **13** 76–86.

Junqueira LC e Carneiro J (2008a) Aparelho Reprodutor Masculino. Em *Histologia Básica 11ª edição*, 11.ª ed, pp 414–430. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Junqueira LC e Carneiro J (2008b) Aparelho Reprodutor Feminino. Em *Histologia Básica 11ª edição*, pp 431–451. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Kim YJ, Park CW e Ku S (2014) Indications of Intrauterine Insemination for Male and Non-Male Factor Infertility. *Seminars in Reproductive Medicine* **32** 306–312.

Kirkegaard K, Ahlström A, Ingerslev HJ e Hardarson T (2015) Choosing the best embryo by time lapse versus standard morphology. *Fertility and sterility* **103** 323–332.

Konc J, Kanyó K, Kriston R, Somoskői B e Cseh S (2014) Cryopreservation of embryos and oocytes in human assisted reproduction. *BioMed Research International* **2014** 1–9.

Kovac JR, Addai J, Smith RP, Coward RM, Lamb DJ e Lipshultz LI (2013) The effects of advanced paternal age on fertility. *Asian Journal of Andrology* **15** 723–728.

Krausz C e Degl’Innocenti S (2006) Y chromosome and male infertility: Update, 2006. *Frontiers in Bioscience* **11** 3049–3061.

Krausz C, Quintana-Murci L e Mcelreavey K (2000) Prognostic value of Y deletion analysis: What is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis? *Human Reproduction* **15** 1431–1434.

- Kroese ACJ, de Lange NM, Collins J e Evers JLH** (2012) Surgery or embolization for varicoceles in subfertile men: Summary of a subfertile men. *Cochrane Database of Systemic Reviews*.
- Kuwayama M** (2012) The human oocyte: Vitrification. Em *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Volume 1 - Laboratory Perspectives*, 4ª edição, pp 285–292. Eds DK Gardner, A Weissman, CM Howles e Z Shoham. Flórida: Taylor & Francis Group.
- Laranjeira C, Cardoso H e Borges T** (2010) Síndrome de Turner. *Acta Pediátrica Portuguesa* **41** 38–43.
- Lass A** (2005) Patient selection and management. Em *Textbook of in Vitro Fertilization and Assisted Reproduction: The Bourn Hall Guide to Clinical and Laboratory Practice*, 3ª edição, pp 15–33. Ed PR Brinsden. Londres: Taylor & Francis Group.
- Lazarou SA** (2012) Overview of male infertility. Em *The Boston IVF Handbook of Infertility*, 3ª edição, pp 93–106. Eds SR Bayer, MM Alper e AS Penzias. Londres: Informa Healthcare.
- Leung A, Mira J e Hsiao W** (2014) Updates on sperm retrieval techniques. *Translational Andrology and Urology* **3** 94–101.
- Lewis SEM** (2013) The place of sperm DNA fragmentation testing in current day fertility management. *Middle East Fertility Society Journal* **18** 78–82.
- Louro N** (2014) Diferenciação Sexual e Perturbações do Desenvolvimento Sexual. Em *Manual de Medicina Sexual - Visão Multidisciplinar*, pp 427–444. Eds F Barros e R Figueiredo. Lisboa: HSJ, Consultores, Lda.
- Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Pados G, Bontis I e Tarlatzis BC** (2008) Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility* **90** 186–193.
- Lunenfeld B e Elder K** (2005) Historical perspectives in the management of fertility and the use of gonadotropins. Em *Textbook of in Vitro Fertilization and Assisted Reproduction: The Bourn Hall Guide to Clinical and Laboratory Practice*, 3ª edição, pp 129–152. Ed PR Brinsden. Londres: Taylor & Francis Group.
- Lunenfeld B, Lunenfeld E e Insler V** (2000) Human Gonadotropins. Em *Manual on Assisted Reproduction*, 2ª edição, pp 79–132. Eds T Rabe, K Dietrich e T

Strowitzki. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Lynch A, McDuffie R, Murphy J, Faber K e Orleans M (2002) Preeclampsia in multiple gestation: The role of assisted reproductive technologies. *Obstetrics and Gynecology* **99** 445–451.

Macaluso M, Wright-Schnapp TJ, Chandra A, Johnson R, Satterwhite CL, Pulver A, Berman SM, Wang RY, Farr SL e Pollack LA (2010) A public health focus on infertility prevention, detection, and management. *Fertility and sterility* **93** 16.e1-10.

Machtinger R e Racowsky C (2013) Morphological systems of human embryo assessment and clinical evidence. *Reproductive BioMedicine Online* **26** 210–221.

Macklon NS, Broekmans FJ e Fauser B (2009) Indications for IVF treatment: from diagnosis to prognosis. Em *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Laboratory and Clinical Perspectives*, 3ª edição, pp 447–458. Eds DK Gardner, A Weissman, CM Howles e Z Shoham. Londres: Informa Healthcare.

Maggiulli R, Ubaldi F e Rienzi L (2012) Oocyte Denuding. Em *Practical Manual of In Vitro Fertilization: Advanced Methods and Novel Devices*, pp 93–104. Eds ZP Nagy, AC Varghese e A Agarwal. Nova Iorque: Springer.

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

Marcus SF (2005) Intrauterine Insemination. Em *Textbook of in Vitro Fertilization and Assisted Reproduction: The Bourn Hall Guide to Clinical and Laboratory Practice*, 3ª edição, pp 259–270. Ed PR Brinsden. Londres: Taylor & Francis Group.

Marikinti K (2005) Diagnostic hysteroscopy in assisted conception. Em *Textbook of in Vitro Fertilization and Assisted Reproduction: The Bourn Hall Guide to Clinical and Laboratory Practice*, 3ª edição, pp 107–127. Ed P Brinsden. Londres: Taylor & Francis Group.

Martins S, Ribeiro L, Cardoso H, Oliveira MJ e Borges T (2012) Síndrome de Kallmann... será possível um diagnóstico mais precoce? *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo* **7** 18–22.

Meldrum DR (2007) Evaluation and Preparation of the Infertile Couple for In Vitro Fertilization. Em *In Vitro Fertilization - A Practical Approach*, pp 17–28. Ed DK

Gardner. Nova Iorque: Informa Healthcare USA.

- Mitchell LM** (2005) Laboratory techniques: sperm preparation for assisted conception. Em *Textbook of in Vitro Fertilization and Assisted Reproduction: The Bourn Hall Guide to Clinical and Laboratory Practice*, 3ª edição, pp 309–318. Ed P Brinsden. Londres: Taylor & Francis Group.
- Mitwally M e Abuzeid M** (2008) Operative Hysteroscopy for Uterine Septum. Em *Infertility and Assisted Reproduction*, pp 115–131. Eds B Rizk, J Garcia-Velasco, H Sallam e A Makrigiannakis. Nova Iorque: Cambridge University Press.
- Moazzam A, Choudhary MN, Muhammad I, Sarwat J e Ijaz A** (2015) From basic to contemporary semen analysis: limitations and variability. *The Journal of Animal & Plant Sciences* **25** 328–336.
- Montag M, Liebenthron J e Köster M** (2011) Which morphological scoring system is relevant in human embryo development? *Placenta* **32** S252–S256.
- Moore KL e Persaud TVN** (2004) Introdução al desarrollo del ser humano. Em *Embriologia Clínica, Trad. 7ª edição Americana*, pp 1–14. Barcelona: Elsevier Espanha.
- Morice P, Josset P, Chapron C e Dubuisson J** (1995) History of infertility. *Human Reproduction Update* **1** 497–504.
- Mortimer D e Mortimer ST** (2005) Laboratory investigation of the infertile male. Em *Textbook of in Vitro Fertilization and Assisted Reproduction: The Bourn Hall Guide to Clinical and Laboratory Practice*, 3ª edição, pp 61–92. Ed PR Brinsden. Londres: Taylor & Francis Group.
- Mortimer D e Mortimer ST** (2013) Density Gradient Separation of Sperm for Artificial Insemination. Em *Spermatogenesis - Methods and Protocols*, pp 217–226. Eds DT Carrell e KI Aston. Nova Iorque: Humana Press.
- Mukhopadhyaya N** (2005) Oocyte donation. Em *Textbook of in Vitro Fertilization and Assisted Reproduction: The Bourn Hall Guide to Clinical and Laboratory Practice*, 3ª edição, pp 373–384. Ed P Brinsden. Londres: Taylor & Francis Group.
- NAFA e ESHRE-SIGA** (2002) Manual on Basic Semen Analysis. *Nordic Association for Andrology e ESHRE Special Interest Group on Andrology*.
- Nani JM e Jeyendran RS** (2003) Patient semen collection with assistance. Em *Sperm*

Collection and Processing Methods - A practical guide, pp 24–37. Ed RS Jeyendran. Nova Iorque: Cambridge University Press.

Nel-Themaat L, Elliott T, Chang CC, Wright G e Nagy ZP (2012) Conventional IVF Insemination. Em *Practical Manual of In Vitro Fertilization: Advanced Methods and Novel Devices*, pp 297–306. Eds ZP Nagy, AC Varghese e A Agarwal. Nova Iorque: Springer.

Neri QV, Monahan D, Rosenwaks Z e Palermo GD (2012) Intracytoplasmic sperm injection: Technical aspects. Em *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Volume 1 - Laboratory Perspectives*, 4ª edição, pp 172–185. Eds DK Gardner, A Weissman, CM Howles e Z Shoham. Flórida: Taylor & Francis Group.

NICE (2013) Fertility problems: assessment and treatment - clinical guideline. *National Institute for Health and Care Excellence*.

Oates RD, Silber S, Brown LG e Page DC (2002) Clinical characterization of 42 oligospermic or azospermic men with microdeletion of the AZFc region of the Y chromosome, and of 18 children conceived via ICSI. *Human Reproduction* **17** 2813–2824.

Oei SG, Helmerhorst FM, Bloemenkamp KW, Hollants FA, Meerpoel DE e Keirse MJ (1998) Effectiveness of the postcoital test: randomised controlled trial. *BMJ* **317** 502–505.

Oliva Teles N (2011) Diagnóstico genético pré-implantação: Aspectos Técnicos e Considerações Éticas. *Acta Médica Portuguesa* **24** 987–996.

Oskowitz SP (2012) Treatment options I. Ovulation induction. Em *The Boston IVF Handbook of Infertility*, 3ª edição, pp 57–64. Eds SR Bayer, MM Alper e AS Penzias. Londres: Informa Healthcare.

Palermo GD, Neri QV, Takeuchi T e Rosenwaks Z (2009) ICSI: Where We Have Been and Where We Are Going. *Seminars in Reproductive Medicine* **27** 191–201.

Palermo GD, Neri QV, Monahan D, Kocent J e Rosenwaks Z (2012a) Development and current applications of assisted fertilization. *Fertility and Sterility* **97** 248–259.

Palermo GD, Neri QV, Monahan D, Takeuchi T, Schlegel PN e Rosenwaks Z (2012b) Intracytoplasmic Sperm Injection. Em *Practical Manual of In Vitro*

Fertilization: Advanced Methods and Novel Devices, pp 307–320. Eds ZP Nagy, AC Varghese e A Agarwal. Nova Iorque: Springer.

Palermo GD, Neri QV e Rosenwaks Z (2015) To ICSI or not to ICSI. *Seminars in Reproductive Medicine* **33** 92–102.

Paoli D, Lombardo F, Lenzi A e Gandini L (2014) Sperm Cryopreservation: Effects on Chromatin Structure. Em *Genetic Damage in Human Spermatozoa*, pp 137–150. Eds E Baldi e M Muratori. Nova Iorque: Springer.

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

Partyka A, Nizanski W e Ochota M (2012) Methods of Assessment of Cryopreserved Semen. Em *Current Frontiers in Cryobiology*, pp 547–574. Ed I Katkov. InTech.

Penzias AS (2012) Overview of infertility. Em *The Boston IVF Handbook of Infertility, 3ª edição*, pp 1–10. Eds SR Bayer, MM Alper e AS Penzias. Londres: Informa Healthcare.

Pereira BJ (2014) Tratamento médico e cirúrgico do fator masculino. Em *Manual de Medicina Sexual - Visão Multidisciplinar*, pp 475–484. Eds F Barros e R Figueiredo. Lisboa: HSJ, Consultores, Lda.

Petersen CG, Mauri AL, Baruffi RL, Oliveira JBA, Massaro FC, Elder K e Franco Jr JG (2005) Implantation failures: success of assisted hatching with quarter-laser zona thinning. *Reproductive BioMedicine Online* **10** 224–229.

Pimentel S e Plancha CE (2014) Técnicas de Procriação Medicamente Assistida. Em *Manual de Medicina Sexual - Visão Multidisciplinar*, pp 495–501. Eds F Barros e R Figueiredo. Lisboa: HSJ, Consultores, Lda.

Prados FJ, Debrock S, Lemmen JG e Agerholm I (2012) The cleavage stage embryo. *Human Reproduction* **27** i50–i71.

Pried G, van der Yen H e Krebs D (2000) Artificial Intrauterine Insemination: Noninvasive Management of Subfertile Couples. Em *Manual on Assisted Reproduction, 2ª edição*, pp 601–656. Eds T Rabe, K Dietrich e T Strowitzki. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Pryor JL, Kent-First M, Muallem A, Van Bergen AH, Nolten WE, Meisner L e Roberts KP (1997) Microdeletions on the Y Chromosome of Infertile Men. *The*

New England Journal of Medicine **336** 534–539.

Rabe T, Diedrich K, Eberhardt I e Al-Hasani S (2000) In Vitro Fertilization. Em *Manual on Assisted Reproduction, 2ª edição*, pp 389–448. Eds T Rabe, K Dietrich e T Strowitzki. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Ramalho-Santos J (2011) A sperm's tail: the importance of getting it right. *Human Reproduction* **26** 2590–2591.

Regateiro FJ (2007) Relatório sobre «Diagnóstico Genético Pré-Implantação». *Conselho Nacional de Ética para as Ciências da Vida*.

Reichman D e Rosenwaks Z (2014) GnRH Antagonist-Based Protocols for In Vitro Fertilization. Em *Human Fertility - Methods and Protocols*, pp 289–304. Eds Z Rosenwaks e PM Wassarman. Nova Iorque: Humana Press.

Rienzi L e Ubaldi FM (2012) Oocyte retrieval and selection. Em *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Volume 1 - Laboratory Perspectives, 4ª edição*, pp 96–113. Eds DK Gardner, A Weissman, CM Howles e Z Shoham. Flórida: Taylor & Francis Group.

Rienzi L, Balaban B, Ebner T e Mandelbaum J (2012) The oocyte. *Human Reproduction* **27** 2–21.

Roupa Z, Polikandrioti M, Sotiropoulou P, Faros E, Koulouri A, Wozniak G e Gourni M (2009) Causes of infertility in women at reproductive age. *Health Science Journal* **3** 80–87.

Sá R, Cremades N, Silva J, Barros A e Sousa M (2008) Spermatid Injection: current status. Em *Infertility and Assisted Reproduction*, pp 493–505. Eds B Rizk, J Garcia-Velasco, H Sallam e A Makrigiannakis. Nova Iorque: Cambridge University Press.

Sakkas D e Alvarez JG (2010) Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility and Sterility* **93** 1027–1036.

Santbrink E Van e Fauser B (2008) Ovulation Induction. Em *Infertility and Assisted Reproduction*, pp 193–201. Eds B Rizk, J Garcia-Velasco, H Sallam e A Makrigiannakis. Nova Iorque: Cambridge University Press.

Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M e Borini A (2012) Human sperm cryopreservation:

Update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. *Advances in Urology* **2012** 1–9.

Schoor RA, Ross LS e Niederberger C (2003) Clinical sperm collection. Em *Sperm Collection and Processing Methods - A practical guide*, pp 85–104. Ed RS Jeyendran. Nova Iorque: Cambridge University Press.

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 e 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.

Sherwood L (2010) The Reproductive System. Em *Human Physiology: From Cells to Systems*, 7ª edição, pp 741–798. Belmont: Brooks/Cole.

Sheynkin Y, Jung M, Yoo P, Schulsinger D e Komaroff E (2005) Increase in scrotal temperature in laptop computer users. *Human Reproduction* **20** 452–455.

Shin DH e Turek PJ (2013) Sperm retrieval techniques. *Nature Reviews Urology* **10** 723–730.

Shoham Z e Howles CM (2009) Drugs used for ovarian stimulation: clomiphene citrate, aromatase inhibitors, metformin, gonadotropins, gonadotropin-releasing hormone analogs, and recombinant gonadotropins. Em *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Laboratory and Clinical Perspectives*, 3ª edição, pp 469–488. Eds DK Gardner, A Weissman, CM Howles e Z Shoham. Londres: Informa Healthcare.

Silva-Carvalho JL e Santos A (2009) Estudo AFRODITE. Caracterização da Infertilidade em Portugal. Estudo na Comunidade.

Silverberg KM e Turner T (2012) Evaluation of sperm. Em *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Volume 1 - Laboratory Perspectives*, 4ª edição, pp 48–60. Eds DK Gardner, A Weissman, CM Howles e Z Shoham. Flórida: Taylor & Francis Group.

Silverthorn D (2010) Reproduction and Development. Em *Human physiology: an integrated approach*, 5ª edição, pp 828–867. São Francisco: Pearson.

- Southorn T** (2002) Great balls of fire and the vicious cycle: A study of the effects of cycling on male fertility. *The Journal of Family Planning and Reproductive Health Care* **28** 211–213.
- Sowińska-Przepiera E, Andrysiak-Mamos E, Jarzabek-Bielecka G, Walkowiak A, Osowicz-Korolonek L, Syrenicz M, Kędzia W e Syrenicz A** (2015) Functional hypothalamic amenorrhoea - diagnostic challenges, monitoring, and treatment. *Endokrynologia Polska* **66** 252–268.
- Speroff L** (1999a) Sperm and Egg Transport, Fertilization, and Implantation. Em *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*, 6ª edição, pp 247–274. Eds L Speroff, RH Glass e NG Kase. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Speroff L** (1999b) The Breast. Em *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*, 6ª edição, pp 595–642. Eds L Speroff, RH Glass e NG Kase. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Speroff L** (1999c) Menopause and the Perimenopausal Transition. Em *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*, 6ª edição, pp 643–724. Eds L Speroff, RH Glass e N Kase. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Van Steirteghem A** (2007) Assisted Fertilization. Em *In Vitro Fertilization - A Practical Approach*, pp 161–182. Ed DK Gardner. Nova Iorque: Informa Healthcare USA.
- Tao J, Tamis R, Fink K, Williams B, Nelson-White T e Craig R** (2002) The neglected morula/compact stage embryo transfer. *Human Reproduction* **17** 1513–1518.
- Tate F** (2012a) Reproductive System. Em *Seeley's Principles of Anatomy & Physiology*. 2ª edição, pp 769–807. Nova Iorque: McGraw-Hill.
- Tate F** (2012b) Development and Genetics. Em *Seeley's Principles of Anatomy & Physiology*. 2ª edição, pp 808–845. Nova Iorque: McGraw-Hill.
- Thornhill AR, de Die-Smulders CE, Geraedts JP, Harper JC, Harton GL, Lavery SA, Moutou C, Robinson MD, Schmutzler AG, Scriven PN 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.
- Thornhill AR, Ottolini C e Handyside AH** (2012) Human embryo biopsy procedures. Em *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Volume 1 - Laboratory*

Perspectives, 4ª edição, pp 197–211. Eds DK Gardner, A Weissman, CM Howles e Z Shoham. Flórida: Taylor & Francis Group.

Trojian TH, Lishnak TS e Heiman D (2009) Epididymitis and orchitis: An overview. *American Family Physician* **79** 583–587.

Vander AJ, Luciano D e Sherman J (2001) Reproduction. Em *Human Physiology: The Mechanisms of Body Function*, 8ª edição, pp 635–685. Boston: McGraw-Hill Higher Education.

Vasconcelos M, Albuquerque R e Seixas J (2014) Papel de um enfermeiro num Centro de Reprodução Medicamente Assistida - Fator Masculino. Em *Manual de Medicina Sexual - Visão Multidisciplinar*, pp 513–518. Eds F Barros e R Figueiredo. Lisboa: HSJ, Consultores, Lda.

Veiga A e Belil I (2012) Assisted hatching. Em *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Volume 1 - Laboratory Perspectives*, 4ª edição, pp 186–196. Eds DK Gardner, A Weissman, CM Howles e Z Shoham. Flórida: Taylor & Francis Group.

Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, Kohn FM, Schill WB, Farah S, Ramos C et al. (1996) Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Human Molecular Genetics* **5** 933–943.

De Vos A (2000) Intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Human Reproduction* **15** 59–64.

De Vos A e Van Steirteghem A (2005) Assisted reproduction techniques for male-factor infertility: current status of intracytoplasmic sperm injection. Em *Textbook of in Vitro Fertilization and Assisted Reproduction: The Bourn Hall Guide to Clinical and Laboratory Practice*, 3ª edição, pp 337–358. Ed P Brinsden. Londres: Taylor & Francis Group.

Wells D e Fragouli E (2012) Preimplantation genetic diagnosis for infertility. Em *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Volume 1 - Laboratory Perspectives*, 4ª edição, pp 346–353. Eds DK Gardner, A Weissman, CM Howles e Z Shoham. Flórida: Taylor & Francis Group.

Whitman-Elia GF e Baxley EG (2001) A Primary Care Approach to the Infertile Couple. *The Journal of the American Board of Family Medicine* **14** 33–45.

WHO (2010) *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*, 5ª edição.

Wirka KA, Chen AA, Conaghan J, Ivani K, Gvakharia M, Behr B, Suraj V, Tan L e Shen S (2014) Atypical embryo phenotypes identified by time-lapse microscopy: high prevalence and association with embryo development. *Fertility and sterility* **101** 1637-48-5.

Young B, Woodford P e O'Dowd G (2013a) Male reproductive system. Em *Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas*, 6ª edição, pp 337–350. Filadélfia: Elsevier.

Young B, Woodford P e O'Dowd G (2013b) Female reproductive system. Em *Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas*, 6ª edição, pp 351–383. Filadélfia: Elsevier.

Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E e 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.

Zhao Y, Brezina P, Hsu CC, Garcia J, Brinsden PR e Wallach E (2011) In vitro fertilization: Four decades of reflections and promises. *Biochimica et Biophysica Acta* **1810** 843–852.

Zini A e Sigman M (2009) Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *Journal of Andrology* **30** 219–229.