

M

S

C

M

S

C



# Técnicas de Reprodução Humana Assistida para o Tratamento da Infertilidade

Daniela Costa e Sousa  
Dissertação de Mestrado apresentada à  
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto em  
Biologia Celular e Molecular

2016

MSc

2º CICLO

FCUP  
2016



Técnicas de Reprodução Humana Assistida para o  
Tratamento da Infertilidade

Daniela Costa e Sousa



M

S

C



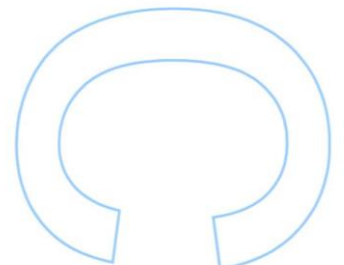
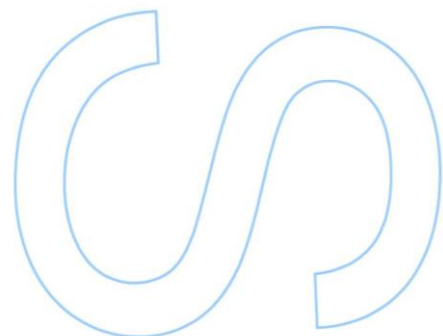
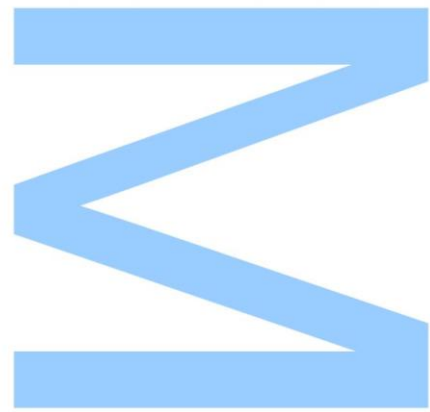
# Técnicas de Reprodução Humana Assistida para o Tratamento da Infertilidade

Daniela Costa e Sousa

Mestrado em Biologia Celular e Molecular  
Departamento de Biologia  
2016

## **Orientador**

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



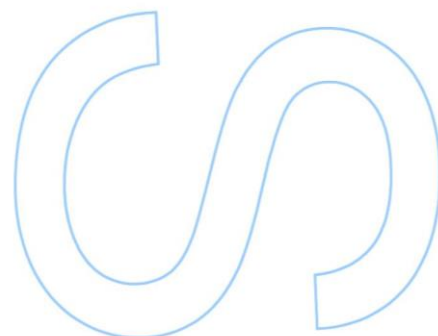
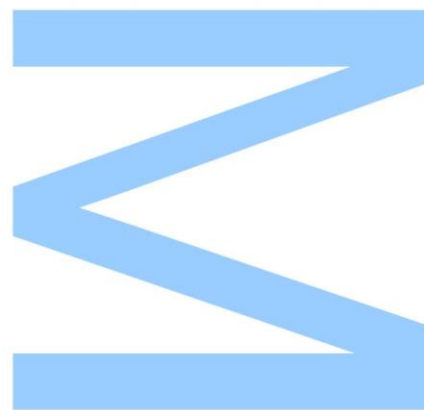




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

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





# Agradecimentos

Ao longo desta tão enriquecedora experiência, de realização do estágio curricular no âmbito da Procriação Medicamente Assistida, várias foram as pessoas que contribuíram de uma forma fundamental para o seu sucesso e que sem dúvida merecem o meu maior agradecimento.

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu orientador da tese de mestrado, Prof. Dr. Vasco Almeida, pela forma extraordinária com que me orientou ao longo deste ano de estágio e principalmente por toda a sua constante disponibilidade e compreensão.

Quero também dedicar um especial agradecimento à Dra. Isabel Damião, que me acompanhou ao longo de todo o período de tempo de realização do meu estágio, mostrando-se sempre disponível para partilhar todo o seu conhecimento. O seu apoio incansável e a simpatia foram fundamentais.

Agradecer também ao Dr. Joaquim Gonçalves e ao Dr. Jorge Braga por terem permitido a realização do meu estágio nas instalações do Centro de Estudos de Infertilidade e Esterilidade (CEIE), que tanto contribuiu para a minha formação na área de Procriação Medicamente Assistida.

Gostaria também de salientar a preciosa ajuda da Ana Gomes que foi essencial para a minha integração, demonstrando sempre a sua disponibilidade e carinho.

Quero agradecer especialmente à minha colega de estágio, Sara Oliveira, pela ótima companhia que demonstrou ser e pela partilha de dúvidas, receios e conquistas que tornaram este estágio ainda mais gratificante.

A toda a equipa do CEIE com quem tive a oportunidade de conviver, agradeço também pela forma como que me receberam e pelo bom ambiente de trabalho.

Um muito especial agradecimento ao Miguel Meireles, por todo o apoio incondicional, pela dedicação e paciência interminável que sempre demonstrou e por me mostrar que com serenidade e perseverança todos os nossos sonhos se realizam.

Por último, mas sem dúvida não menos importante, agradeço à minha família pelo apoio e enorme compressão. Foram essenciais para me manterem estável e focada no meu objetivo, encorajando-me sempre.

Obrigada a todos por marcarem esta importante etapa do meu percurso.



# Índice

<b>Agradecimentos .....</b>	<b>V</b>
<b>Índice .....</b>	<b>VII</b>
<b>Lista de Abreviaturas .....</b>	<b>XI</b>
<b>Lista de Tabelas .....</b>	<b>XIII</b>
<b>Lista de Figuras .....</b>	<b>XIV</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>3</b>
<b>Capítulo I - Biologia da Reprodução Humana e Infertilidade .....</b>	<b>5</b>
<b>1. Biologia da Reprodução Humana.....</b>	<b>7</b>
1.1. Anatomia e Fisiologia do Sistema Reprodutor Masculino.....	7
1.1.1. Espermatogénese .....	9
1.1.2. Controlo hormonal masculino .....	13
1.2. Anatomia e Fisiologia do Sistema Reprodutor Feminino .....	16
1.2.1. Desenvolvimento folicular e oogénese.....	20
1.2.2. Controlo hormonal feminino .....	23
1.2.2.1. Ciclo menstrual.....	25
1.3. Fertilização e desenvolvimento embrionário .....	29
1.3.1. Transporte de gâmetas no trato feminino .....	29
1.3.2. Fertilização.....	32
1.3.3. Desenvolvimento Embrionário .....	34
<b>2. Infertilidade .....</b>	<b>38</b>
2.1. Fatores de infertilidade .....	39
2.1.1. Fatores não patológicos .....	39
2.1.2. Fatores Patológicos .....	43



2.1.2.1.	Fator Masculino .....	43
2.1.2.2.	Fator Feminino.....	45
2.2.	Infertilidade Idiopática.....	48
<b>Capítulo II - Técnicas de Reprodução Humana Assistida.....</b>		<b>49</b>
<b>3. Recolha, avaliação e processamento de gâmetas masculinos .....</b>		<b>51</b>
3.1.	Métodos de colheita de gâmetas masculinos .....	51
3.1.1.	Outros métodos de colheita para tratamentos de RHA .....	53
3.2.	Espermograma.....	54
3.2.1.	Caraterísticas macroscópicas .....	57
3.2.1.1.	Liquefação.....	57
3.2.1.2.	pH.....	57
3.2.1.3.	Volume.....	58
3.2.1.4.	Viscosidade.....	58
3.2.1.5.	Aparência visual .....	58
3.2.1.6.	Cheiro .....	59
3.2.2.	Caraterísticas microscópicas .....	59
3.2.2.1.	Motilidade .....	59
3.2.2.2.	Vitalidade.....	60
3.2.2.3.	Concentração.....	63
3.2.2.4.	Morfologia.....	65
3.2.2.5.	Aglutinação.....	68
3.3.	Processamento de amostras seminais para tratamentos de RHA.....	69
3.3.1.	Processamento de amostras recolhidas por TESE .....	71
<b>4. Recolha, avaliação e processamento de gâmetas femininos .....</b>		<b>72</b>
4.1.	Estimulação ovárica.....	72
4.2.	Punção folicular.....	74
4.3.	Avaliação da Maturidade e Qualidade ovocitária.....	74
4.3.1.	Maturidade ovocitária.....	75
4.3.2.	Qualidade ovocitária .....	76
4.3.2.1.	Anomalias intracitoplasmáticas .....	77
4.3.2.2.	Anomalias extracitoplasmáticas.....	78

<b>5. Técnicas de RHA.....</b>	<b>80</b>
5.1. Inseminação Intrauterina (IIU) .....	80
5.2. Fertilização <i>In Vitro</i> (FIV).....	81
5.3. Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI).....	83
5.3.1. Desnudação de ovócitos .....	84
5.3.2. Protocolo de ICSI .....	85
5.3.2.1. Seleção de espermatozoides .....	87
5.3.2.2. Microinjeção de espermatozoide .....	88
<b>6. Desenvolvimento Embrionário .....</b>	<b>90</b>
6.1. Avaliação da fertilização.....	90
6.1.1. Avaliação de pronúcleos.....	92
6.1.2. Avaliação dos corpos percursores de nucléolos .....	94
6.1.3. Avaliação citoplasmática .....	95
6.2. Cultura embrionária .....	96
6.2.1. Sistema de Time-lapse .....	97
6.3. Avaliação da qualidade embrionária .....	100
6.3.1. Avaliação de embriões em fase de clivagem (Dia 2 e 3).....	101
6.3.1.1. Número de blastómeros.....	101
6.3.1.2. Tamanho e simetria de blastómeros.....	102
6.3.1.3. Fragmentação.....	103
6.3.1.4. Multinucleação.....	103
6.3.1.5. Anomalias Citoplasmáticas.....	104
6.3.2. Avaliação de embriões em fase de mórula (Dia 4) .....	105
6.3.3. Avaliação de embriões em fase de blastocisto (Dia 5).....	106
6.3.3.1. Fase de desenvolvimento .....	107
6.3.3.2. Massa celular interna .....	107
6.3.3.3. Trofoectoderme.....	108
<b>7. Transferência de Embriões.....</b>	<b>109</b>
7.1. Eclosão assistida .....	111
<b>8. Diagnóstico Genético Pré-implantação .....</b>	<b>112</b>
<b>9. Criopreservação .....</b>	<b>116</b>

9.1. Criopreservação de embriões.....	117
9.2. Criopreservação de gâmetas masculinos.....	120
9.3. Criopreservação de gâmetas femininos .....	121
<b>10. Doação.....</b>	<b>124</b>
10.1. Doação de gâmetas.....	124
10.1.1. Doação de gâmetas masculinos.....	125
10.1.2. Doação de gâmetas femininos.....	126
10.2. Doação de embriões.....	127
<b>Conclusão .....</b>	<b>129</b>
<b>Considerações Finais .....</b>	<b>131</b>
<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>133</b>

## Lista de Abreviaturas

ABP	<i>Androgen-binding Protein</i> , proteína de ligação a androgénios
AZF	<i>Azoospermia Factor</i> , fator de azoospermia
CAF	Cirurgia de Alta Frequência
CC	citrato de clomifeno
CCO	Complexo <i>Cumulus</i> -ovócito
CNPMA	Conselho Nacional de Procriação Medicamente Assistida
CPA	agentes crioprotetores
CPN	Corpos Percursos de Nucléolos
CR	Corpos Refrateis
DGPI	Diagnóstico Genético Pré-implantação
DIP	Doença Inflamatória Pélvica
DIU	Dispositivo Intrauterino
DMSO	dimetilsulfóxido
EG	Etilenoglicol
EPV	Espaço Perivitelino
epz	espermatozoides
FISH	hibridização <i>in situ</i> de sondas fluorescentes
FIV	Fertilização <i>In Vitro</i>
FOP	Falência Ovária Prematura
FSH	<i>Follicle-stimulating Hormone</i> , hormona folículo-estimulante
GnRH	<i>Gonadotropin-releasing Hormone</i> , fator libertador de gonadotrofinas
GP	Glóbulo Polar
hCG	<i>human Chorionic Gonadotropin</i> , gonadotrofina coriônica humana
hMG	<i>human Menopausal Gonadotropin</i> , gonadotrofina pós-menopausa humana
IMC	Índice de Massa Corporal
IB	<i>Immunobead</i>
ICSI	Intracytoplasmic Sperm Injection, injeção intracitoplasmática de espermatozoides
IUI	Inseminação Intrauterina
LH	<i>Luteinizing Hormone</i> , hormona lúteo-estimulante
micro-TESE	<i>Microdissection Testicular Sperm Extraction</i>
MESA	<i>Microscopic Epididymal Sperm Aspiration</i>
MVSA	<i>Microscopic Vasal Sperm Aspiration</i>

MAR	<i>Mixed Antiglobulin Reaction</i>
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
MCI	Massa Celular Interna
n	haploide
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	reação em cadeia da polimerase
PESA	<i>Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration</i>
PMA	Procriação Medicamente Assistida
PN	Pronúcleos
PrOH	propanediol
PVP	polivinilpirrolidona
PVSA	<i>Percutaneous Vasal Sperm Aspiration</i>
PZD	<i>Partial Zona Dissection</i> , disseção parcial da zona pelúcida
rFSH	FSH recombinante
rLH	LH recombinante
RE	Retículo Endoplasmático
RHA	Reprodução Humana Assistida
ROS	espécies reativas de oxigénio
SHO	Síndrome de Hiperestimulação Ovária
SNC	Sistema Nervoso Central
SOP	Síndrome de Ovário Policístico
STRY	<i>Sex-determining Region Y</i> , região de determinação sexual do cromossoma Y
SUZI	<i>Subzonal sperm Injection</i> , injeção sub-zonal de espermatozoides
TEC	transferência de embriões criopreservados
TESA	<i>Testicular Sperm Aspiration</i>
TESE	<i>Testicular Sperm Extraction</i>
TF	Trofoectoderme
VG	Vesícula Germinativa
VHB	Vírus da Hepatite B
VHC	Vírus da Hepatite C
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana
ZD	<i>Zona Drilling</i> , perfuração da zona pelúcida
ZP	Zona Pelúcida
2n	diploide

## Lista de Tabelas

**Tabela 1** | Valores mínimos de referência estabelecidos pela OMS para os parâmetros de avaliação da qualidade da amostra espermática. (Adaptado de World Health Organization, 2010)

**Tabela 2** | Terminologia utilizada para classificar as amostras seminais consoante a qualidade dos seus parâmetros espermáticos. VR - Valor de Referência. (Adaptado de World Health Organization, 2010)

**Tabela 3** | Diluições adequadas em função do número de espermatozoides visualizados a fresco por cada campo de observação (ampliação de 400x) e respetivos volumes de amostra seminal e fixador. (Adaptado de World Health Organization, 2010)

**Tabela 4** | Fatores de conversão indicados para o cálculo da concentração de uma amostra seminal, em função da diluição utilizada e número de quadrados contados. (Adaptado de NAFA e ESHRE-SIGA, 2002)

**Tabela 5** | Sistema de classificação dos pronúcleos (PN) de pré zigotos, consoante a sua organização espacial e o número e alinhamento de corpos percursores de nucléolos (CPN). (Adaptado de ASiRM e ESIGoE, 2011)

**Tabela 6** | Comparação de parâmetros técnicos de sistemas de Time-lapse atualmente disponíveis. (Adaptado de Campbell e Fishel, 2015 e Kovacs, 2014)

**Tabela 7** | Tempos de observação de pré-zigotos e embriões em cultura e respetiva fase de desenvolvimento esperada. (Adaptado de ASiRM e ESIGoE, 2011)

**Tabela 8** | Sistema de classificação de embriões em fase de clivagem (Dias 2 e 3), consoante o grau de fragmentação, o tamanho e simetria dos blastómeros e a nucleação. (Adaptado de ASiRM e ESIGoE, 2011)

**Tabela 9** | Sistema de classificação de embriões em fase de mórula (Dia 4), consoante o grau de compactação e ciclo de clivagem. (Adaptado de ASiRM e ESIGoE, 2011)

**Tabela 10** | Sistema de classificação de embriões em fase de Blastocisto (Dia 5), tendo em conta a fase de desenvolvimento e a morfologia da MCI e da TF. (Adaptado de ASiRM e ESIGoE, 2011)

## Lista de Figuras

**Figura 1** | Anatomia do sistema reprodutor masculino em corte sagital. Os órgãos sexuais masculinos são os testículos, o pênis, o sistema de ductos e as glândulas anexas. O sistema de ductos inclui o epidídimo, os ductos deferentes, o ducto ejaculatório e a uretra. As glândulas anexas incluem as vesículas seminais, a próstata e as glândulas Bulbouretrais. O pênis e o escroto constituem a genitália externa masculina. (Adaptado de Shier *et al.*, 2012a)

**Figura 2** | Representação esquemática de um testículo (a) e respetivo corte transversal de um túbulo seminífero (b). (a) O testículo é constituído por um conjunto de túbulos seminíferos, que se encontram organizados em lóbulos, separados por septos. Estes convergem numa rede *testicular* que drena através de ductos eferentes para o epidídimo e posteriormente para o canal deferente. (b) Os túbulos seminíferos contêm as células da linha germinativa incluindo os espermatozoides que são libertados no lúmen dos túbulos, assim como as células de Sertoli que lhes servem de suporte. No espaço intersticial, entre os tubos, encontram-se as células de Leydig. (Adaptado de Tate, 2012a)

**Figura 3** | Representação esquemática do epitélio do tubo seminífero, evidenciando os diferentes estádios de desenvolvimento das células germinativas masculinas. Na base do túbulo seminífero encontram-se os estádios iniciais da espermatogénese e, à medida que se aproxima do lúmen do túbulo, podem observar-se células em estádios cada vez mais avançados. As caudas das células em diferenciação estendem-se para o lúmen do túbulo, para onde são libertados os espermatozoides maduros. As zonas de oclusão determinam a separação do epitélio em estrato basal e adluminal (Adaptado de Sherwood, 2014)

**Figura 4** | Representação estrutural do espermatozoide humano diferenciado. O espermatozoide é constituído por três estruturas principais – a cabeça, que inclui o acrossoma e o núcleo, a peça intermédia, rica em mitocôndrias, e a cauda, que é composta por microtúbulos. (Adaptado de Sherwood, 2014)

**Figura 5** | Regulação hormonal do sistema reprodutor masculino pelo eixo hipotálamo-hipófise-testículos. A hormona GnRH estimula a segregação de LH e FSH que atuam a nível das células de Leydig e de Sertoli, respetivamente. As células de Leydig são responsáveis por produzir testosterona que, para além dos seus efeitos androgénicos e comportamentais, atua nas células de Sertoli para promover a espermatogénese. A

testosterona e a Inibina B atuam por feedback negativo no controlo hormonal da função testicular, inibindo a libertação das gonadotrofinas. (+) ação estimulante; (-) ação inibitória; SNC, sistema nervoso central; GnRH, fator libertador de gonadotrofinas; FSH, hormona folículo-estimulante; LH, hormona lúteo-estimulante. (Adaptado de Guyton e Hall, 2016a)

**Figura 6** | Anatomia do Sistema reprodutor feminino em corte sagital (a) e vista posterior (b). (a) Os órgãos sexuais femininos são os ovários, as trompas de Falópio, o útero e a vagina. O clítoris, os lábios menores e os lábios maiores constituem a genitália externa feminina. (b) As trompas de Falópio são constituídas pelas fímbrias, infundíbulo, ampola, istmo e porção intramural. O útero pode ser dividido em três zonas distintas - fundo, corpo e colo, consoante as suas características histológicas e funcionais. (Adaptado de Shier *et al.* 2012a)

**Figura 7** | Representação esquemática da histologia do ovário humano, evidenciando os diferentes estadios de desenvolvimento folicular. O ovário é dividido em medula e córtex. No córtex, apresentam-se os folículos em desenvolvimento, desde a fase de folículo primordial, com apenas uma camada de células de granulosa; folículo primário, com várias camadas de células da granulosa e zona pelúcida; folículo secundário, com células da Teca; folículo Antral, com antro; folículo de Graaf, folículo completamente maduro e expandido, com *cumulus oophorus*; ovulação, ovócito rodeado pela coroa radiata. Formação do corpo amarelo e consequente degeneração em corpo branco. (Adaptado de Martini e Bartholomew, 2011)

**Figura 8** | Regulação hormonal do sistema reprodutor feminino pelo eixo hipotálamo-hipófise-ovários. A hormona GnRH estimula a segregação de LH e FSH que atuam a nível das células da Teca e da Granulosa, respetivamente. As células da Teca são responsáveis por produzir androgénios que se difundem para as células da Granulosa onde são convertidos em estrogénios. Tanto as células da Teca como da Granulosa são responsáveis por produzir progesterona. A progesterona e os estrogénios exercem tanto efeito de feedback negativo como positivo no hipotálamo e na hipófise anterior, dependendo da fase do ciclo menstrual. A Inibina tem um efeito de feedback negativo na hipófise anterior, inibindo a libertação de FSH. (+) ação estimulante; (-) ação inibitória; SNC, sistema nervoso central; GnRH, fator libertador de gonadotrofinas; FSH, hormona folículo-estimulante; LH, hormona lúteo-estimulante. (Adaptado de Guyton e Hall, 2016b)

**Figura 9** | Alterações hormonais do ciclo menstrual e respetiva regulação do ciclo ovárico e uterino. Ao longo do ciclo menstrual ocorrem variações nos níveis de



gonadotrofinas, que regulam o ciclo ovário. A FSH é determinante para o desenvolvimento e dominância folicular, na fase folicular do ciclo ovário. O pico de LH (e FSH) induz a ovulação, determinando o início da fase lútea com a formação do corpo amarelo e consequente degeneração em corpo branco. As alterações ovárias resultam na segregação diferencial de estrogénio e progesterona, que regulam o ciclo uterino. O estrogénio é essencial para promover a proliferação do endométrio na fase proliferativa do ciclo uterino. A progesterona aumenta após ovulação induzindo a fase secretora do ciclo uterino. A ação conjunta das duas hormonas irá promover extensas alterações endometriais que culminam na fase menstrual. (Adaptado de Fox, 2011)

**Figura 10** | Processo de fertilização ovocitária evidenciando as etapas da penetração espermática. O espermatozoide atravessa a coroa radiata e liga-se aos recetores ZP3 da zona pelúcida. Esta ligação desencadeia a reação acrossómica, na qual são libertadas enzimas hidrolíticas, que promovem a digestão da zona pelúcida e dispersão da coroa radiata. Quando o espermatozoide atravessa a ZP, as membranas citoplasmáticas do espermatozoide e do ovócito fundem-se, permitindo a entrada do espermatozoide para o citoplasma do ovócito. É desencadeada uma resposta de bloqueio da polispermia, por exocitose dos grânulos corticais que inativam os recetores ZP3 e enrijecem a ZP. Inicia-se a segunda divisão meiótica com formação do segundo glóbulo polar. ZP, zona pelúcida (Adaptado de Sherwood, 2016)

**Figura 11** | Desenvolvimento e transporte embrionário desde a ovulação até à implantação. O ovócito é fertilizado na região da ampola, a partir do qual se inicia a fase de clivagem, adquirindo tipicamente 2 células (Dia 1), 4 células (Dia 2) e 8 células (Dia 3). Ao 4º dia, as células começam a compactar e forma-se a *mórula* com cerca de 16-32 células. Ao 5º dia, o embrião atinge a fase de blastocisto e vai implantar na parede do endométrio. (Adaptado de Tate, 2011b)

**Figura 12** | Distribuição dos fatores patológicos que afetam a fertilidade de um casal. (Adaptado de Bayer e Alper, 2012)

**Figura 13** | Imagem microscópica de espermatozoides sujeitos ao teste de vitalidade com corante de eosina. Os espermatozoides com membrana intacta, considerados vivos, não permitem a penetração do corante e mantêm-se incolores. Os espermatozoides que permitem a penetração do corante apresentam uma coloração rosa e são considerados mortos.

**Figura 14** | Imagens exemplificativas de alterações flagelares após teste de hipoosmolaridade. (a) Imagens esquemáticas de espermatozoides sem (1) e com

vários tipos de alterações flagelares (2 a 7) (Adaptado de World Health Organization, 2010); (b) Imagem microscópica de espermatozoides sujeitos ao teste de hipoosmolaridade. Os espermatozoides com membrana intacta são todos aqueles que apresentam a cauda enrolada. Os espermatozoides não reativos e mortos mantêm a cauda inalterada.

**Figura 15** | Imagem da grelha central de contagem da Câmara de Neubauer evidenciando (a) os 25 quadrados (ampliação de 100x) e (b) um dos quadrados, subdividido em 16 pequenos quadrados, com espermatozoides previamente fixados para contagem (ampliação de 400x).

**Figura 16** | Imagens exemplificativas de anomalias morfológicas de cabeça [(a) a (i)], de cauda [(j) a (l)], de peça intermédia [(m) a (o)] e restos citoplasmáticos (p) encontradas em espermatozoides durante a avaliação morfológica do esperma. (Adaptado de World Health Organization, 2010)

**Figura 17** | Imagens exemplificativas de leucócitos e células espermáticas imaturas persentes em amostras seminais. (a) Neutrófilo (inferior) e macrófago (superior); (b) Espermatócito; (c) Espermátide. (Adaptado de World Health Organization, 2010)

**Figura 18** | Preparação de amostras seminais por gradientes de densidade descontínuos, após centrifugação, evidenciando a separação do plasma seminal acima dos gradientes, detritos celulares, espermatozoides não viáveis e células não espermáticas retidos na interface dos gradientes de 40% e 80% e espermatozoides morfológicamente normais e progressivos acumulados no fundo do tubo.

**Figura 19** | Imagens exemplificativas da maturidade do complexo *cumulus-ovócito* (CCO) (ampliação de 400x). (a) CCO evidenciando as células envolventes compactas; (b) CCO evidenciando células envolventes expandidas. (Adaptado de Rienzi *et al.*, 2012)

**Figura 20** | Imagens exemplificativas da maturidade nuclear dos ovócitos após desnudação (ampliação de 400x). (a) Ovócito maduro em MII, evidenciando o 1º GP no EPV; (b) Ovócito imaturo em MI, sem a presença de VG e 1ºGP; (c) Ovócito imaturo em VG, com um núcleo excêntrico e um único nucléolo proeminente. (Adaptado de Rienzi *et al.*, 2012)

**Figura 21** | Imagem exemplificativa de um ovócito MII com forma esférica, citoplasma translúcido e rodeado por uma ZP uniforme, contendo o 1º GP no EPV. (Adaptado de Rienzi *et al.*, 2012)

**Figura 22** | Imagens exemplificativas de ovócitos gigantes. (a) Ovócito gigante em VG evidenciando dois núcleos excêntricos, cada uma com o respetivo nucléolo proeminente; (b) Ovócito gigante (esquerda) em comparação com um ovócito de dimensões normais (direita) (Adaptado de Rienzi *et al.*, 2012 e Rienzi e Ubaldi, 2012).

**Figura 23** | Imagens exemplificativas de inclusões intracitoplasmáticas (ampliação de 400x). (a) Ovócito com a presença de um corpo refrátil; (b) Ovócito com um vacúolo de grandes dimensões (>14µm); (c) Ovócito com agregado de RE liso ao centro. (Adaptado de Rienzi e Ubaldi, 2012)

**Figura 24** | Imagens exemplificativas de anomalias extracitoplasmáticas (ampliação 400x). (a) Ovócito com 1º GP gigante; (b) Ovócito com 1º GP fragmentado; (c) Ovócito com EPV aumentado; (d) Ovócito evidenciando fragmentos no EPV; (e) Ovócito com ZP espessa e densa; (f) Ovócito com ZP de forma anormal, com o que parece uma rutura ou duplicação da camada interna da ZP. (Adaptado de Rienzi *et al.*, 2012)

**Figura 25** | Imagens exemplificativas da sequência de desnudação de ovócitos por método enzimático e mecânico. (a) CCO antes do processo de desnudação, rodeado pelas células do *cumulus* (ampliação 100x); (b) CCO durante a incubação em solução enzimática de hialuronidase, evidenciando células da coroa radiata já dispersas (ampliação 200x); (c) Ovócito maduro (MII) após remoção de todas as células envolventes, com 1GP visível no EPV (ampliação 200x). (Adaptado de Rienzi *et al.*, 2012)

**Figura 26** | Esquema de placas de microinjeção para casos normais (a) e de imobilidade (b). (a) Placa de microinjeção com duas gotas alongadas de PVP (verde) e gotas de meio tamponado (azul). (b) Placa de microinjeção com uma gota de espermatozoides imóveis ou polpa testicular recolhida por TESE (roxo), uma gota de meio hipotónico (vermelho), duas gotas alongadas de PVP (verde) e gotas de meio tamponado (azul).

**Figura 27** | Equipamento especializado para técnicas de micromanipulação. (a) Microscópio ótico invertido, com superfície aquecida; (b) Pormenor de micropipetas de sustentação (esquerda) e injeção (direita) colocadas em posição para a realização de ICSI; Pormenor de micromanipulador, com um joystick hidráulico e injetor.

**Figura 28** | Processo de imobilização e aspiração de espermatozoides selecionados para microinjeção. (a) Imobilização de espermatozoide por movimento rápido e firme com a micropipeta de injeção sob a cauda; (b) Aspiração do espermatozoide pela cauda, para posterior microinjeção. (Adaptado de Veeck, 1999).

**Figura 29** | Imagens exemplificativas do procedimento de microinjeção. (a) Aproximação da pipeta de injeção contendo na sua extremidade o espermatozoide; (b) Penetração da ZP e oolema com a micropipeta de injeção e deposição do espermatozoide no citoplasma ovocitário; (c) Remoção da micropipeta de injeção, permanecendo o espermatozoide bem evidenciado no interior do ovócito. (Adaptado de Neri *et al.*, 2012)

**Figura 30** | Imagem exemplificativa de um pré-zigoto ideal, contendo dois GP no EPV e dois PN centrais com os respectivos CPN justapostos. (Adaptado de Elder e Dale, 2011)

**Figura 31** | Imagens exemplificativas de pré-zigotos com fertilização anormal (Ampliação de 200x). (a) Pré-zigoto com 1 PN e 2GP no EPV. (b) Pré-zigoto com 1PN e apenas 1GP no EPV; (c) Pré-zigoto com 3PN e 1GP no EPV. (Adaptado de Papale *et al.*, 2012 (a e b) e Elder e Dale, 2011 (c))

**Figura 32** | Imagens exemplificativas de pré-zigotos com PN de tamanho anormal. (a) Pré-zigoto com PN menores do que o normal; (b) Pré-zigotos com um PN significativamente inferior ao outro de diâmetro normal. (Adaptado de Papale *et al.*, 2012 e Ebner, 2012, respetivamente)

**Figura 33** | Imagens exemplificativas do alinhamento dos PN relativamente ao plano dos GP. (a) Pré-zigoto com 2PN centrais e justapostos, paralelos ao plano dos GP; (b) Pré-zigoto com 2PN centrais e justapostos, perpendiculares ao plano dos GP. (Adaptado de Papale *et al.*, 2012)

**Figura 34** | Imagens exemplificativas de anomalias no posicionamento dos PN e GP. (a) Pré-zigoto com 2PN centrais, mas não justapostos; (b) Pré-zigoto com 2PN justapostos e periféricos; (c) Pré-zigoto com 2PN centrais e justapostos e 2GP no EPV afastados entre si. (Adaptado de Papale *et al.*, 2012 (a e c) e Ebner, 2012 (b))

**Figura 35** | Imagens exemplificativas de pré-zigotos com diferente organização, número e tamanho de CPN. (a) Pré-zigoto com 2PN centrais e justapostos com igual número de CPN de grandes dimensões, alinhados na zona de justaposição dos PN. (b) Pré-zigoto com 2PN centrais e justapostos, com diferente número e organização

dos CPN; (c) Pré-zigoto com 2PN centrais e justapostos, em que um dos PN não apresenta nenhum CPN; (d) Pré-zigoto com 2PN centrais e justapostos, em que um dos PN apresenta apenas um único CPN. (Adaptado de Papale *et al.*, 2012)

**Figura 36** | Imagens exemplificativas de pré-zigotos com anomalias citoplasmáticas. (a) Pré-zigoto com 2PN centrais e justapostos, em que se pode observar um halo citoplasmático; (b) Pré-zigoto com 2PN periféricos com uma severa agregação de organelos; (c) Pré-zigoto com 2PN centrais e justapostos, evidenciando dois grandes vacúolos e corpos refartéis. (Adaptado de Papale *et al.*, 2012)

**Figura 37** | Imagens exemplificativas de embriões com número de células específico de cada fase de desenvolvimento. (a) Embrião de 2 células de igual tamanho, sem fragmentação; (b) Embrião de 4 células de igual tamanho, sem fragmentação (Dia 2); (c) Embrião de 8 células de igual tamanho, sem fragmentação (Dia 3). (Adaptado de Prados *et al.*, 2012)

**Figura 38** | Imagens exemplificativas de embriões em fase de clivagem com blastómeros de diferentes tamanhos, embora específicos da fase de desenvolvimento. (a) Embrião de 3 células, com duas células de menor tamanho e uma maior; (b) Embrião de 5 células, com duas células de menor tamanho e três maiores; (c) Embrião de 6 células, com quatro células de menor tamanho e duas maiores. (Adaptado de Prados *et al.*, 2012)

**Figura 39** | Imagens exemplificativas de embriões em fase de clivagem com diferentes graus de fragmentação. (a) Embrião de 4 células de igual tamanho com fragmentação < 10%; (b) Embrião de 4 células de igual tamanho, com fragmentação de 10-20%; (c) Embrião de 3 células de diferente tamanho, com > 25% de fragmentação. (Adaptado de Prados *et al.*, 2012)

**Figura 40** | Imagens exemplificativas de embriões em fase de clivagem com ou sem multinucleação. (a) Embrião de 4 células de igual tamanho, evidenciando cada uma delas um único núcleo; (b) Embrião de 2 células de igual tamanho, ambas binucleadas; (c) Embrião de 4 células de diferente tamanho, com um dos blastómeros binucleado. (Adaptado de Prados *et al.*, 2012)

**Figura 41** | Imagens exemplificativas de embriões em fase de clivagem com anomalias citoplasmáticas. (a) Embrião de 4 células com zonas de granulosidade; (b) Embrião de 8 células de igual tamanho com citoplasma rendilhado; (c) Embrião de 5 células de diferente tamanho, com dois pequenos vacúolos nos dois blastómeros de menor tamanho. (Adaptado de Prados *et al.*, 2012)

**Figura 42** | Imagens exemplificativas de mórulas com diferentes qualidades. (a) Mórula de boa qualidade, evidenciando todas as células incluídas no processo de compactação; (b) Mórula de qualidade razoável, com alguns limites celulares ainda visíveis e algumas células pequenas ou fragmentos que não são completamente incorporados no processo de compactação; (c) Mórula de má qualidade, com várias células e fragmentos excluídos da massa principal de células compactadas. (Adaptado de Prados *et al.*, 2012)

**Figura 43** | Imagens exemplificativas de blastocistos em diferentes fases de desenvolvimento. (a) Blastocisto inicial com uma cavidade que ocupa cerca de 50% do volume do embrião; (b) Blastocisto (Grau 2: 1: 1), evidenciando uma boa MCI e TF; (c) Blastocisto expandido (Grau 3: 1: 1), evidenciando uma boa MCI e TF; (d) Blastocisto em eclosão (Grau 4: 1: 1), evidenciando uma boa MCI e TF, com cerca de 75% do volume do embrião já no exterior da ZP. (e) Blastocisto eclodido (Grau 4: 1: 1), completamente livre da ZP, a qual também pode ser observada na imagem. Nesta caso é possível ver claramente o aumento de tamanho do embrião relativamente ao seu tamanho inicial, que é definido pelo diâmetro da ZP. (Adaptado de Hardarson *et al.*, 2012).

**Figura 44** | Imagens exemplificativas de blastocistos com MCI diferente grau. (a) Blastocisto expandido (Grau3:1:1), evidenciando uma MCI proeminente, constituída por muitas células coesas. (b) Blastocisto expandido (Grau 3:2:1) evidenciando uma MCI distinta, constituída por menos células do que o ideal. (c) Blastocisto expandido (Grau 3:3:3) com MCI difícil de distinguir e com poucas células. (Adaptado de Hardarson *et al.*, 2012).

**Figura 45** | Imagens exemplificativas de blastocistos com TF de diferente grau. (a) Blastocisto em eclosão (Grau4:1:1) com TF constituída por muitas células que formam um epitélio coeso; (b) Blastocisto expandido (Grau 3:1:2), com TF constituída por células de diferente tamanho, pouco coesas. (c) Blastocisto em eclosão (Grau 4:1:3) com TF com muito poucas células não coesas. (Adaptado de Hardarson *et al.*, 2012).

**Figura 46** | Esquema de carregamento de cateter de transferência. Colunas de meio de transferência (cinzento) intercalado por colunas de ar (branco), evidenciando ao centro a coluna de meio contendo os embriões a transferir (azul).

**Figura 47** | Imagens exemplificativas de procedimentos de biopsias de glóbulo polar (A), embrião em fase de clivagem (B) e embrião em fase de blastocisto (C). **A** - Abertura da zona pelúcida por método mecânico (a), penetração da pipeta de biópsia (a) e aspiração do 1ºGP (c); **B** – Penetração da pipeta de biópsia na abertura da ZP (a), aspiração dos blastómeros (b) e sua deposição no meio (c); **C** - Abertura da zona pelúcida por laser (a), penetração da pipeta de biópsia (b) e aspiração de várias células da trofoectoderme (c). (Adaptado de Veeck, 1999 (A e B) e Thornhill *et al.*, 2012 (C))

**Figura 48** | Colapso artificial de um blastocisto expandido previamente à criopreservação. (a) Blastocisto totalmente expandido, submetido a um disparo de laser, no ponto de junção celular das células trofoectoderme, do lado oposto à MCI (círculo); (b) Início do colapso do embrião 10 segundos após disparo de laser; (c) Embrião quase totalmente colapsado 30 segundos após o disparo de laser. (Adaptado de Mukaida e Oka, 2016)

## Resumo

A fertilização e o desenvolvimento de uma gravidez é um processo extremamente complexo que implica o correto funcionamento dos sistemas reprodutivos feminino e masculino, altamente regulados por um controlo hormonal rigoroso. Desta forma, vários são os fatores que podem contribuir para a dificuldade de engravidar e para desenvolver um quadro de infertilidade. A infertilidade é definida pela incapacidade de obter uma gravidez clínica após pelo menos 12 meses de relações sexuais regulares e desprotegidas e estima-se afetar cerca de 48,5 milhões de casais em todo mundo. Assim, o desenvolvimento de técnicas de reprodução humana assistida (RHA) têm sido essenciais para ajudar casais inférteis a realizar o seu desejo de ter um filho biológico.

Inicialmente, deve ser realizada uma avaliação exaustiva do casal de modo a identificar fatores de infertilidade patológicos ou não patológicos, sendo que a avaliação do elemento masculino do casal deve iniciar-se pela realização de um espermograma. A infertilidade de um casal pode, em certos casos, não ter um diagnóstico específico, sendo considerada infertilidade idiopática.

Tendo em conta o fator de infertilidade, são determinados os tratamentos de RHA mais adequados, podendo recorrer-se a ciclos de Inseminação Intrauterina (IIU), Fertilização *In Vitro* (FIV) ou Microinjeção Intracitoplasmática (ICSI). Os ciclos de RHA iniciam-se com um protocolo específico de estimulação ovárica e envolvem o processamento das amostras de gâmetas masculinos. À exceção da IIU, após estimulação hormonal controlada, é realizada a punção folicular para recolha dos múltiplos folículos, os quais, após avaliação da sua maturidade e qualidade, são inseminados. Os ovócitos corretamente fertilizados são mantidos em cultura embrionária e sujeitos a classificação diariamente, até ao momento da transferência intrauterina dos embriões selecionados.

Em casos de risco de transmissão de doenças ou anomalias genéticas à descendência, é possível recorrer ao diagnóstico genético pré-implantação (DGPI), que pressupõe a realização da biópsia de embriões em cultura, seguida de análise genética das células biopsiadas.



No âmbito da RHA, foram também desenvolvidas e aperfeiçoadas técnicas de criopreservação de embriões e gâmetas, tanto para fins de utilização em ciclos homólogos, como para doação aos beneficiários, cuja indicação médica de infertilidade o aconselhe.

A reprodução humana assistida é, assim, uma área científica em constante evolução que busca proporcionar as melhores condições e as mais vastas opções de tratamento a todos aqueles que dela sejam beneficiários.

**Palavras-chave:** Infertilidade; Reprodução Humana assistida (RHA); Inseminação intrauterina (IIU); Fertilização *In Vitro* (FIV); Injeção Intracitoplasmática (ICSI); gâmetas; embriões; Diagnóstico Genético Pré-implantação (DGPI); criopreservação; doação.

# Abstract

Fertilization and pregnancy development is an extremely complex process that involves the proper functioning of the male and female reproductive systems, which are highly regulated by a strict hormonal control. Thus, there are several factors that can contribute to the difficulty of getting pregnant and to develop infertility. Infertility is defined as the inability to obtain a clinical pregnancy after at least 12 months of regular, unprotected intercourse and it is estimated to affect about 48.5 million couples worldwide. Thus, the development of assisted reproductive technology (ART) has been essential in helping infertile couples to fulfill their desire of having a biological child.

Initially, it should be performed a full evaluation of the couple in order to identify pathological or not pathological infertility factors. The evaluation of the male element of the couple should start by performing a semen analysis. The couple infertility may, in some cases, not have a specific diagnosis and it is considered idiopathic infertility.

Taking into account the infertility factor, the best treatments are determined, which include intrauterine insemination (IUI), in vitro fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection (ICSI). The treatment cycles begin with a specific protocol of ovarian stimulation and involve the processing of male gametes samples. Except for IUI, after controlled hormonal stimulation, the follicular puncture is performed for collection of multiple follicles, which, after assessment of their maturity and quality, are inseminated. Properly fertilized oocytes are maintained in embryo culture and daily classified, until the time of intrauterine transfer of selected embryos.

In cases of risk of transmission of genetic diseases to offspring, it is possible to use preimplantation genetic diagnosis (PGD), which requires the biopsy of embryos in culture, followed by a genetic analysis of biopsied cells.

Embryo and gametes cryopreservation techniques were also developed and improved, for the purpose of use in homologous cycles or for donation to beneficiaries with infertility indication.

Assisted human reproduction is thereby an evolving scientific field, which aim is to provide the best conditions and treatment options to its beneficiaries.

**Keywords:** Infertility; assisted reproductive technology (ART); IUI; IVF; ICSI; gametes; embryos; PGD; cryopreservation; donation.



# Capítulo I

---

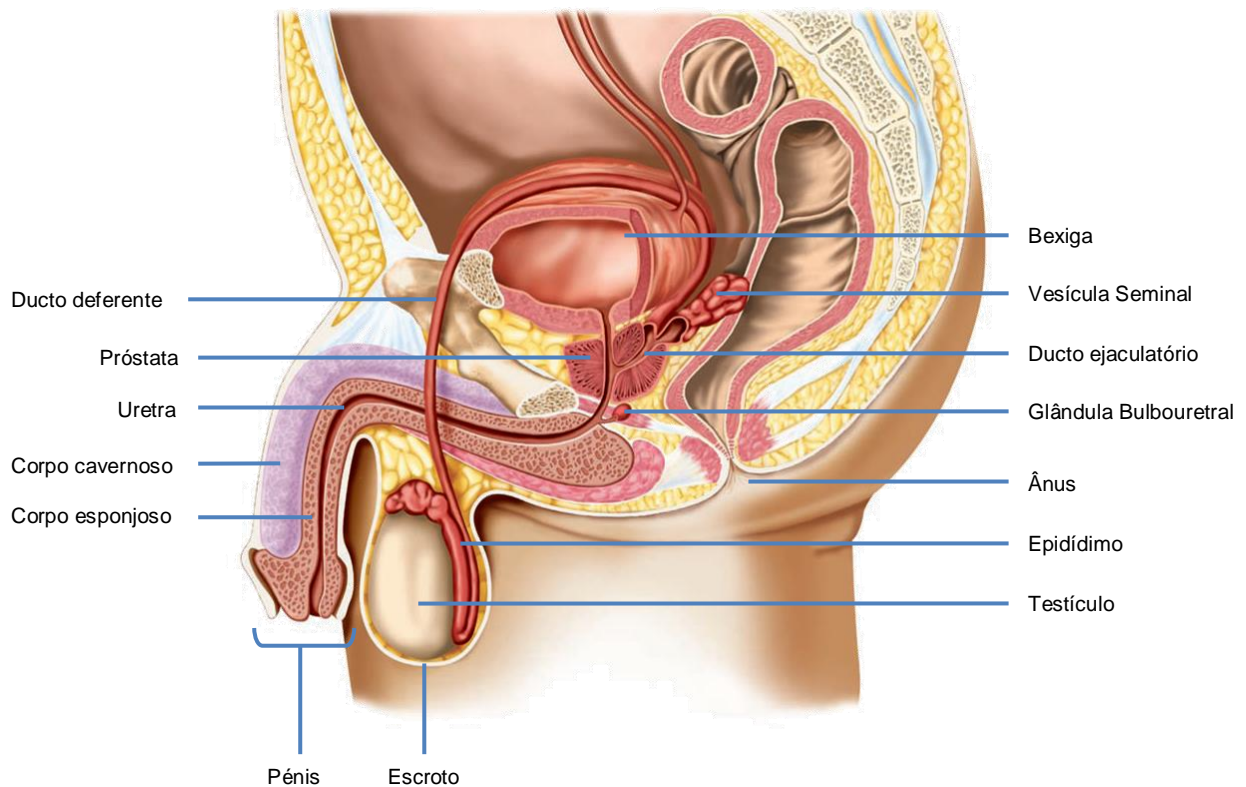
Biologia da Reprodução Humana e  
Infertilidade



# 1. Biologia da Reprodução Humana

## 1.1. Anatomia e Fisiologia do Sistema Reprodutor Masculino

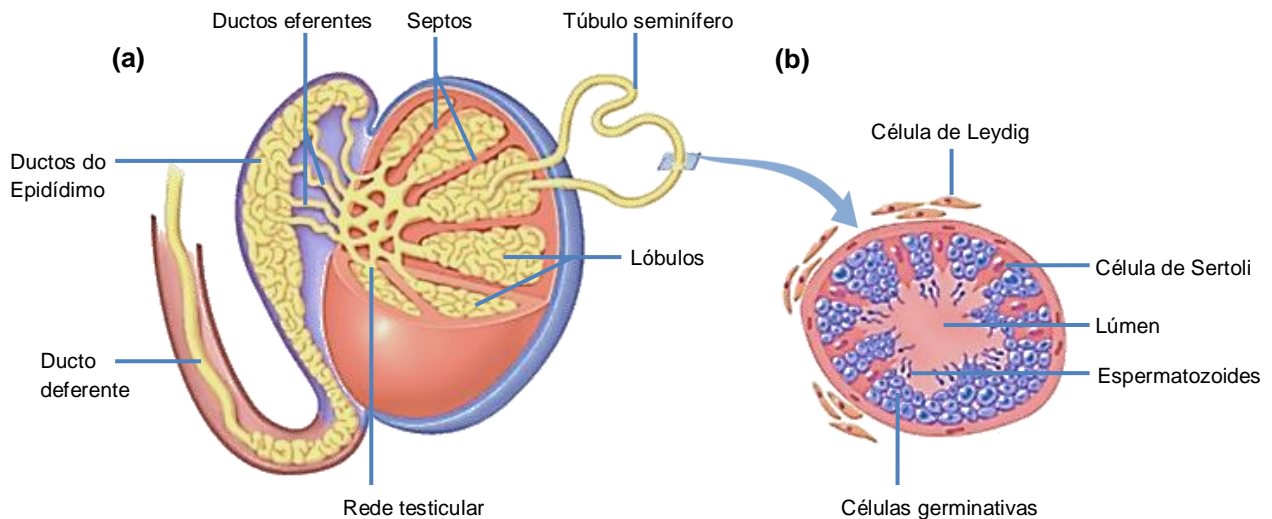
O sistema reprodutor masculino é constituído pelos dois testículos que representam o órgão sexual principal, ou gónadas, responsáveis pela diferenciação de espermatozoides e produção de hormonas sexuais masculinas, e pelo conjunto de órgãos sexuais secundários, que incluem o pénis, o sistema de ductos, responsáveis pelo transporte do esperma e as glândulas anexas, produtoras de secreções (Figura 1) (Shier *et al.*, 2012a).



**Figura 1** | Anatomia do sistema reprodutor masculino em corte sagital. Os órgãos sexuais masculinos são os testículos, o pénis, o sistema de ductos e as glândulas anexas. O sistema de ductos inclui o epidídimo, os ductos deferentes, o ducto ejaculatório e a uretra. As glândulas anexas incluem as vesículas seminais, a próstata e as glândulas Bulbouretrais. O pénis e o escroto constituem a genitália externa masculina. (Adaptado de Shier *et al.*, 2012a)

Os testículos são estruturas ovais que se encontram no exterior do abdómen masculino, no saco escrotal. Esta posição permite manter uma temperatura escrotal

inferior à temperatura corporal, de cerca de 35°C, que é essencial para o processo de espermatogénese que ocorre neste órgão (Widmaier *et al.*, 2014). Cerca de 80% da massa testicular é constituída por túbulos seminíferos, que se encontram organizados em vários lóbulos, separados por septo de tecido conjuntivo, que se formam através da túnica albugínea que reveste cada um dos testículos (Figura 2) (Fox, 2011; Jones e Lopez, 2014; Sherwood, 2016). Os tubos seminíferos são constituídos não só pelas células da linha germinativa, como também por células de suporte, designadas células de Sertoli (Widmaier *et al.*, 2014). Entre os tubos seminíferos, no tecido intersticial, encontram-se também as células de Leydig, células endócrinas produtoras de testosterona, essencial para o desenvolvimento da genitália e caracteres secundários masculinos (Sherwood, 2016).



**Figura 2** | Representação esquemática de um testículo (a) e respetivo corte transversal de um túbulo seminífero (b). (a) O testículo é constituído por um conjunto de túbulos seminíferos, que se encontram organizados em lóbulos, separados por septos. Estes convergem numa rede *testicular* que drena através de ductos eferentes para o epidídimo e posteriormente para o canal deferente. (b) Os túbulos seminíferos contêm as células da linha germinativa incluindo os espermatozoides que são libertados no lúmen dos túbulos, assim como as células de Sertoli que lhes servem de suporte. No espaço intersticial, entre os tubos, encontram-se as células de Leydig. (Adaptado de Tate, 2012a)

Os tubos seminíferos dos vários lóbulos convergem numa rede de túbulos, designada rede testicular, que, por sua vez, drenam através dos ductos eferentes para o epidídimo (Figura 2). É neste órgão que ocorre a maturação dos espermatozoides, essencial para o correto desempenho da função motora. Os ductos do epidídimo de cada testículo estão ligados a um ducto deferente cada, que passam através da parede abdominal e permitem a passagem dos espermatozoides maduros. Estes, em conjunto com os ductos das vesículas seminais, formam os ductos ejaculatórios, os

quais convergem na uretra, a qual permite não só a passagem do líquido seminal como da urina (Shier *et al.*, 2012a).

O pénis é o órgão sexual masculino externo que permite a penetração vaginal devido à sua capacidade de ereção. Este órgão é constituído por dois corpos cavernosos e um corpo esponjoso, através do qual passa a uretra. Aquando da ereção, estes tecidos enchem-se de sangue por vasodilatação dos vasos sanguíneos aí presentes, regulados por ação do sistema nervoso (Jones e Lopez, 2014; Shier *et al.*, 2012a).

As glândulas anexas do sistema reprodutor masculino são responsáveis pela produção de secreções, que são libertadas no sistema de ductos, para, em conjunto com os espermatozoides formar o líquido seminal ou sémen. As vesículas seminais são responsáveis por cerca de 60% do volume seminal, produzindo uma secreção alcalina e viscosa, rica em frutose, essencial para a nutrição dos espermatozoides (Jones e Lopez, 2014). Para além disso, produzem também prostaglandinas, que funciona como indutores da contração muscular dos ductos masculinos para expulsão do líquido seminal aquando da ejaculação, assim como fibrinogénio para a coagulação seminal no interior da vagina, onde o pH é favorável. Por outro lado, a próstata produz secreções fluidas, contendo ácido cítrico, zinco e diferentes enzimas proteolíticas com funções coagulantes e liquefadoras, essenciais para a manutenção do líquido seminal no interior da vagina. Ainda, as glândulas bulbouretrais produzem muco que funciona como lubrificante à passagem do líquido seminal no aparelho reprodutor masculino (Jones e Lopez, 2014; Tate, 2012a).

### 1.1.1. Espermatogénese

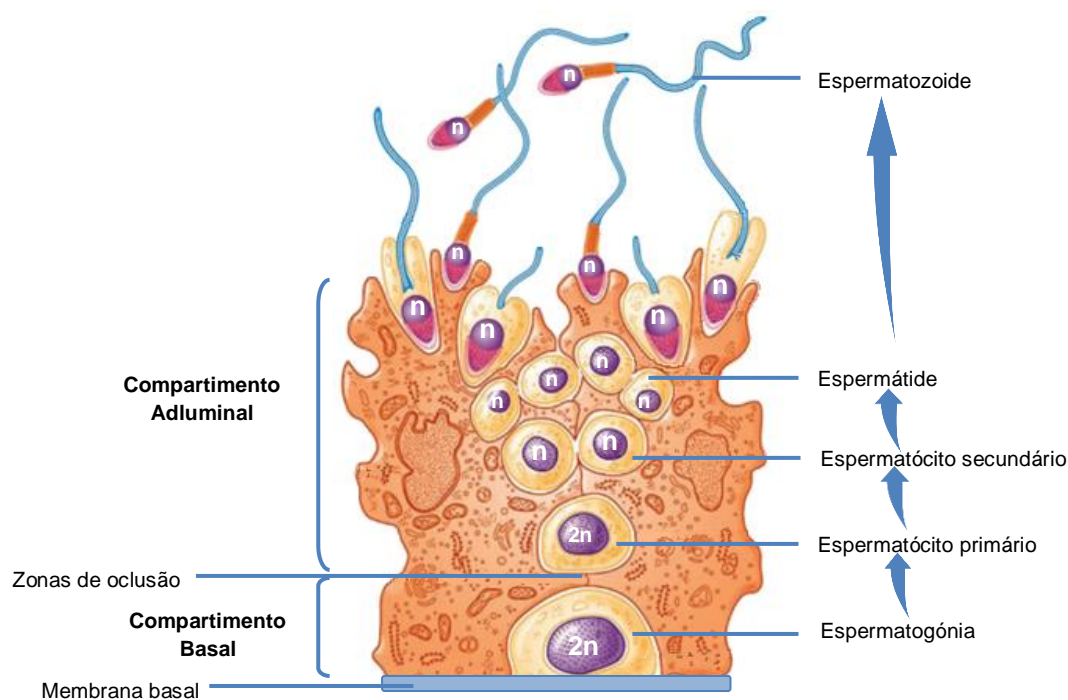
A espermatogénese é o processo de diferenciação celular responsável pela formação de espermatozoides que ocorre nos tubos seminíferos nas gónadas masculinas, com duração de cerca de 74 dias (Jones e Lopez, 2014; Tate, 2012a). Este é um processo complexo, pelo qual células germinativas diploides indiferenciadas, as espermatogónias, proliferam por divisão mitótica e diferenciam-se após divisão meiótica em células especializadas haploides, os espermatozoides (Sherwood, 2016).

Durante o desenvolvimento embrionário, células primordiais da linha germinativa migram para os testículos, originando as espermatogónias, que começam



desde logo a dividir-se por mitose, levando a uma elevada proliferação de células indiferenciadas, junto à membrana basal dos túbulos seminíferos (Guyton e Hall, 2016a; Shier *et al.*, 2012a). Cada divisão celular origina dois tipos distintos de células: as espermatogónias tipo A, que serão responsáveis pela manutenção das células germinativas indiferenciadas ao longo da vida, e as espermatogónias tipo B, que irão seguir o processo de espermatogénese (Shier *et al.*, 2012a).

A partir da puberdade, o processo de espermatogénese inicia-se por estimulação hormonal, levando a que espermatogónias do tipo B migrem para o compartimento adluminal e comecem a diferenciar-se em espermatócitos primários, que irão entrar em processo de divisão meiótica (Guyton e Hall, 2016a; Shier *et al.*, 2012a; Widmaier *et al.*, 2014). A meiose é um processo de divisão celular que ocorre apenas em células da linha germinativa e que promove a redução do número de cromossomas de 46 numa célula diploide ( $2n$ ) para 23 numa célula haploide ( $n$ ). Assim, um espermatócito primário  $2n$ , após a primeira divisão meiótica (Meiose I), irá originar duas células-filhas haploides, designadas espermatócitos secundários (Jones e Lopez, 2014; Shier *et al.*, 2012a; Tate, 2012a). Por sua vez, cada espermatócito secundário irá entrar na segunda divisão meiótica (Meiose II), originando duas células-filhas, designadas espermatídes (Figura 3) (Shier *et al.*, 2012a). No final do processo de espermatogénese, as quatro espermatídes haploides, resultantes de uma espermatogónia diploide inicial, irão diferenciar-se em espermatozoides por um processo designado espermiogénese.



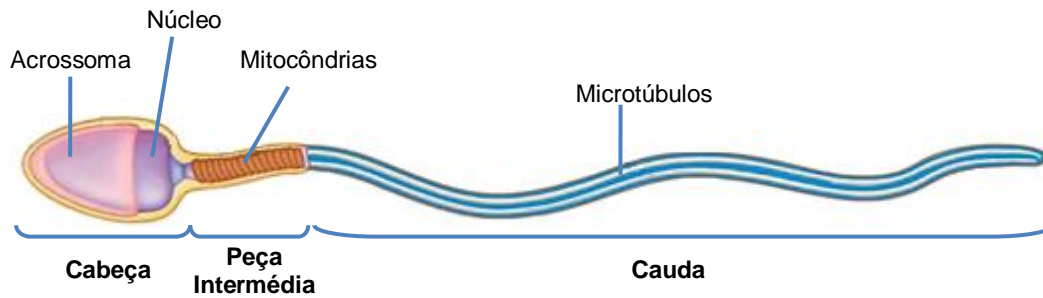
**Figura 3** | Representação esquemática do epitélio do tubo seminífero, evidenciando os diferentes estágios de desenvolvimento das células germinativas masculinas. Na base do túbulo seminífero encontram-se os

estádios iniciais da espermatogénese e, à medida que se aproxima do lúmen do túbulo, podem observar-se células em estádios cada vez mais avançados. As caudas das células em diferenciação estendem-se para o lúmen do túbulo, para onde são libertados os espermatozoides maduros. As zonas de oclusão determinam a separação do epitélio em estrato basal e adluminal (Adaptado de Sherwood, 2014)

Os espermatozoides são células móveis extremamente especializadas e a sua produção a partir da diferenciação de espermatídes exige uma extensa remodelação da estrutura e componentes celulares (Sherwood, 2016). Inicialmente, o aparelho de Golgi cria uma grande vesícula, a vesícula acrossomal, que acumula carboidratos e enzimas hidrolíticas. Esta migra para um dos polos da célula, alongando-se junto ao núcleo, para formar posteriormente o acrossoma. Entretanto, ambos os centríolos migram para a extremidade oposta, alongando-se um deles para formar um flagelo rodeado apenas de membrana citoplasmática. À medida que o flagelo se vai alongando, o citoplasma vai-se acumulando na porção inicial, junto ao núcleo, para onde migram as mitocôndrias. Finalmente, o restante citoplasma é fagocitado pelas células de Sertoli envolventes, juntamente com os restantes organelos, e o núcleo alonga e condensa-se, dando ao espermatozoide a sua forma alongada característica (Jones e Lopez, 2014; Young *et al.*, 2014a). No fundo, a maioria do citoplasma e todos os organelos que não sejam essenciais são removidos, de modo a que o espermatozoide constitua uma unidade básica para o desempenho da sua função - a transmissão da informação genética masculina na formação de um novo ser humano (Sherwood, 2016).

Quando o processo de diferenciação se encontra concluído, o espermatozoide irá apresentar três estruturas principais: a cabeça, a peça intermédia e cauda. (Figura 4) A cabeça do espermatozoide é constituída, essencialmente, pelo núcleo da célula que se encontra coberto por uma estrutura vesicular, o acrossoma, contendo enzimas necessárias para a penetração do ovócito durante o processo de fertilização (Sherwood, 2016; Tate, 2012a; Widmaier *et al.*, 2014). A peça intermédia contém mitocôndrias, responsáveis pela produção de energia, fundamental para o movimento do espermatozoide. A cauda ou flagelo é constituída por microtúbulos, filamentos contráteis responsáveis pelo movimento flagelar (Tate, 2012a; Widmaier *et al.*, 2014).

Ao longo de todo o processo de espermatogénese, as células germinativas resultantes de um espermatócito primário vão-se mantendo unidas por pontes citoplasmáticas (Sherwood, 2016). Estas ligações, resultantes de divisões citoplasmáticas incompletas, permitem a partilha de material citoplasmático e só se quebram com a libertação dos espermatozoides no lúmen dos túbulos seminíferos (Sherwood, 2016; Young *et al.*, 2014a).



**Figura 4 |** Representação estrutural do espermatozoide humano diferenciado. O espermatozoide é constituído por três estruturas principais – a cabeça, que inclui o acrossoma e o núcleo, a peça intermédia, rica em mitocôndrias, e a cauda, que é composta por microtúbulos. (Adaptado de Sherwood, 2014)

No processo de espermatogénese, é também essencial o envolvimento das células de Sertoli que suportam as células da linha germinativa. Cada célula de Sertoli estende-se da membrana basal do túbulo seminífero até ao seu lúmen, encontrando-se interligada às células adjacentes por zonas de oclusão (*tight junctions*) (Figura 5) (Tate, 2012a; Widmaier *et al.*, 2014). Estas junções determinam a separação do túbulo em dois compartimentos - compartimento basal e adluminal – formando uma barreira hemato-testicular, que garante as condições adequadas para o desenvolvimento e diferenciação das células da linha germinativa (Widmaier *et al.*, 2014; Young *et al.*, 2014a). Esta barreira impede tanto a passagem de toxinas, como componentes do sistema imunitário, prevenindo, assim, o desenvolvimento de uma resposta imunitária contra as células germinativas em desenvolvimento, que apresentam novos antígenos de superfície (Jones e Lopez, 2014; Tate, 2012a).

O processo de espermatogénese inicia-se na zona basal do tubo seminífero e progride ao longo da parede, até que são libertados no lúmen do túbulo os espermatozoides totalmente diferenciados (Jones e Lopez, 2014). Estes irão prosseguir através de movimentos peristálticos rítmicos até ao epidídimo, onde completam a sua maturação (Shier *et al.*, 2012a). É neste órgão que ocorre a maturação do acrossoma e os espermatozoides adquirem capacidade de fertilização e movimento flagelar (Sherwood, 2016; Tate, 2012a). Os espermatozoides maduros têm a capacidade de ficar armazenados nos ductos deferentes até dois meses, dadas as suas baixas necessidades metabólicas, usando como fonte nutricional apenas pequenos açúcares das secreções tubulares (Sherwood, 2016).

### 1.1.2. Controlo hormonal masculino

O eixo hipotálamo-hipófise é um importante sistema de controlo hormonal, estando envolvido na regulação de vários sistemas de órgãos (Shier *et al.*, 2012a). A hipófise, que se encontra na base do cérebro, ligada ao hipotálamo através do infundíbulo, é constituída por dois lóbulos, hipófise anterior e posterior. A hipófise anterior, também chamada de adeno-hipófise, é aquela que se encontra envolvida na regulação hormonal, atuando em resposta a neurohormonas libertadas pelo hipotálamo através do sistema porta hipotálamo-hipófise (Shier *et al.*, 2012a).

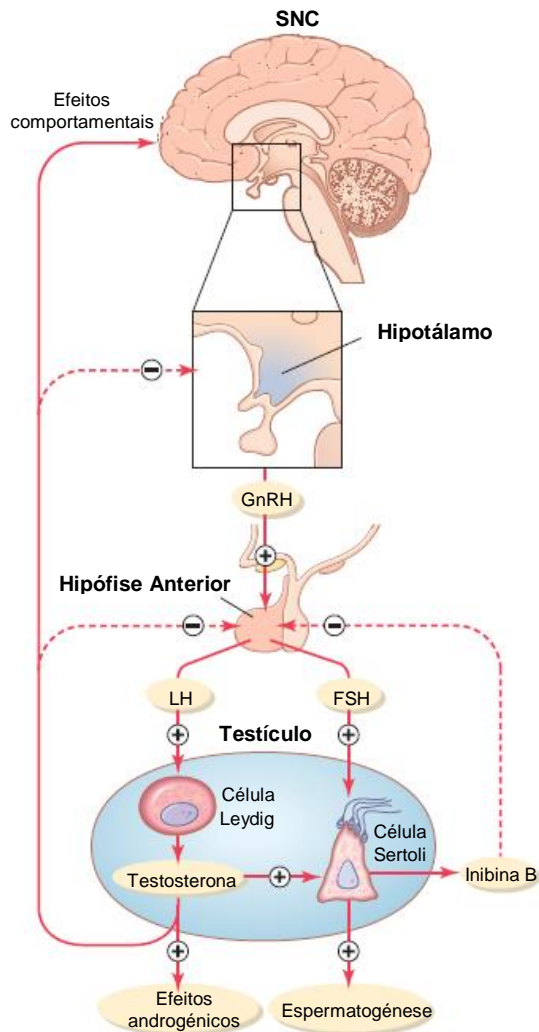
O controlo hormonal do sistema reprodutor masculino é, portanto, desempenhado pelo eixo hipotálamo-hipófise-testículo. O hipotálamo é responsável por produzir o Fator Libertador de Gonadotrofinas (do Inglês *Gonadotropin-releasing Hormone*, GnRH), que, através dos vasos sanguíneos do sistema porta hipotálamo-hipófise, irá atuar a nível da hipófise anterior, induzindo nesta glândula a síntese da Hormona folículo-estimulante (do Inglês *Follicle-stimulating Hormone*, FSH) e a Hormona lúteo-estimulante (do Inglês *Luteinizing Hormone*, LH), que serão, por sua vez, libertadas na corrente sanguínea (Jones e Lopez, 2014; Tate, 2012a). Estas gonadotrofinas irão atuar a nível dos testículos, desempenhando diferentes funções, essenciais tanto para o processo de espermatogénese que aí ocorre, como para a produção de testosterona fundamental no desenvolvimento masculino (Sherwood, 2016).

A LH é a hormona responsável por se ligar aos recetores presentes nas células de Leydig no espaço intersticial dos túbulos seminíferos, promovendo a produção e secreção de androgénios, principalmente testosterona (Sherwood, 2016; Tate, 2012a). Esta desempenha um papel essencial na regulação da função reprodutora masculina, atuando tanto a nível sistémico, através da corrente sanguínea, como parácrino, difundindo-se através dos espaços intersticiais para o interior dos túbulos seminíferos (Widmaier *et al.*, 2014). Os seus efeitos a nível sistémico como hormona são fundamentais para o desenvolvimento dos órgãos do aparelho reprodutor masculino, assim como para o desenvolvimento das características sexuais secundárias, que se caracterizam por alterações estruturais e comportamentais, determinantes do corpo do homem adulto (Shier *et al.*, 2012a; Tate, 2012a). A testosterona desempenha também um importante papel na indução da espermatogénese, atuando paracrinamente nas

células de Sertoli. Estas células apresentam à sua superfície proteínas de ligação a androgénios (do Inglês *Androgen-binding Protein*, ABP), que irão promover a acumulação desta hormona a nível do lúmen dos túbulos seminíferos, permanecendo aí em elevada concentração, relativamente àquela que se verifica na corrente sanguínea (Jones e Lopez, 2014; Sherwood, 2016; Widmaier *et al.*, 2014; Young *et al.*, 2014a).

A regulação do processo de espermatogénese depende também da atuação da FSH. Esta hormona atua diretamente a nível das células de Sertoli nos túbulos seminíferos, promovendo o desenvolvimento das células da linha germinativa, assim como a expressão de ABP e a libertação de Inibina B (Kasper *et al.*, 2015; Tate, 2012a). As células de Sertoli apresentam, assim, recetores distintos para cada uma destas hormonas, sendo que os recetores de testosterona se encontram a nível intracelular e os recetores de FSH à superfície da membrana, como é característico dos recetores de hormonas esteroides e peptídicas, respetivamente (Sherwood, 2016).

As células de Sertoli são também elas responsáveis pela produção do Fator inibidor de Müller, durante o desenvolvimento fetal (Sherwood, 2016). Tanto a testosterona como o Fator Inibidor de Müller são fundamentais na diferenciação sexual que ocorre ainda durante a vida fetal, que é determinada pela presença ou ausência destas hormonas. Durante a gravidez, a Gonadotrofina Coriônica Humana (do Inglês *human Chorionic Gonadotropin*, hCG) é produzida pela placenta, atuando como a LH nos órgãos sexuais masculinos para induzir a produção de testosterona (Guyton e Hall, 2016a; Widmaier *et al.*, 2014). Um feto geneticamente masculino apresenta no seu cromossoma Y uma importante região de determinação sexual, o gene SRY (do Inglês *Sex-determining Region Y*), que é responsável por induzir a diferenciação das gónadas masculinas (Guyton e Hall, 2016a; Widmaier *et al.*, 2014). A presença de testículos fetais irá levar à produção de Fator Inibidor de Müller, causando a degeneração do sistema de ductos de Müller, que no feto feminino será responsável pelo desenvolvimento do sistema reprodutor. Por outro lado, a produção de testosterona no feto masculino irá induzir a diferenciação dos ductos de Wolff em epidídimo, vasos deferentes, ducto ejaculatório e vesículas seminais (Guyton e Hall, 2016a; Widmaier *et al.*, 2014).



**Figura 5 |** Regulação hormonal do sistema reprodutor masculino pelo eixo hipotálamo-hipófise-testículos. A hormona GnRH estimula a segregação de LH e FSH que atuam a nível das células de Leydig e de Sertoli, respetivamente. As células de Leydig são responsáveis por produzir testosterona que, para além dos seus efeitos androgénicos e comportamentais, atua nas células de Sertoli para promover a espermatogénese. A testosterona e a Inibina B atuam por feedback negativo no controlo hormonal da função testicular, inibindo a libertação das gonadotrofinas. (+) ação estimulante; (-) ação inibitória; SNC, sistema nervoso central; GnRH, fator libertador de gonadotrofinas; FSH, hormona folículo-estimulante; LH, hormona lúteo-estimulante. (Adaptado de Guyton e Hall, 2016a)

A regulação do controlo hormonal da função testicular é desempenhada por diversos mecanismos de feedback (Figura 5). Por um lado, a testosterona produzida pelas células de Leydig a nível dos testículos promove a redução de secreção de LH por feedback negativo, atuando tanto a nível do hipotálamo, inibindo a produção de GnRH, que irá, consequentemente, afetar não só a secreção de LH, como de FSH, pela hipófise anterior, como diretamente nesta glândula (Guyton e Hall, 2016a; Sherwood, 2016; Widmaier *et al.*, 2014). A redução dos níveis de secreção de LH irão, por sua vez, provocar uma diminuição na estimulação da produção de testosterona a nível testicular, diminuindo o efeito de feedback negativo que esta hormona exerce sobre o eixo hipotálamo-hipófise. Assim, este mecanismo de regulação permite manter os níveis de testosterona estáveis, inibindo ou estimulando a sua produção consoante os níveis aumentam ou diminuem, respetivamente (Guyton e Hall, 2016a). Por outro lado, a produção de Inibina B pelas células de Sertoli inibe diretamente a hipófise anterior a segregar especificamente FSH, que, por sua vez, irá reduzir a estimulação

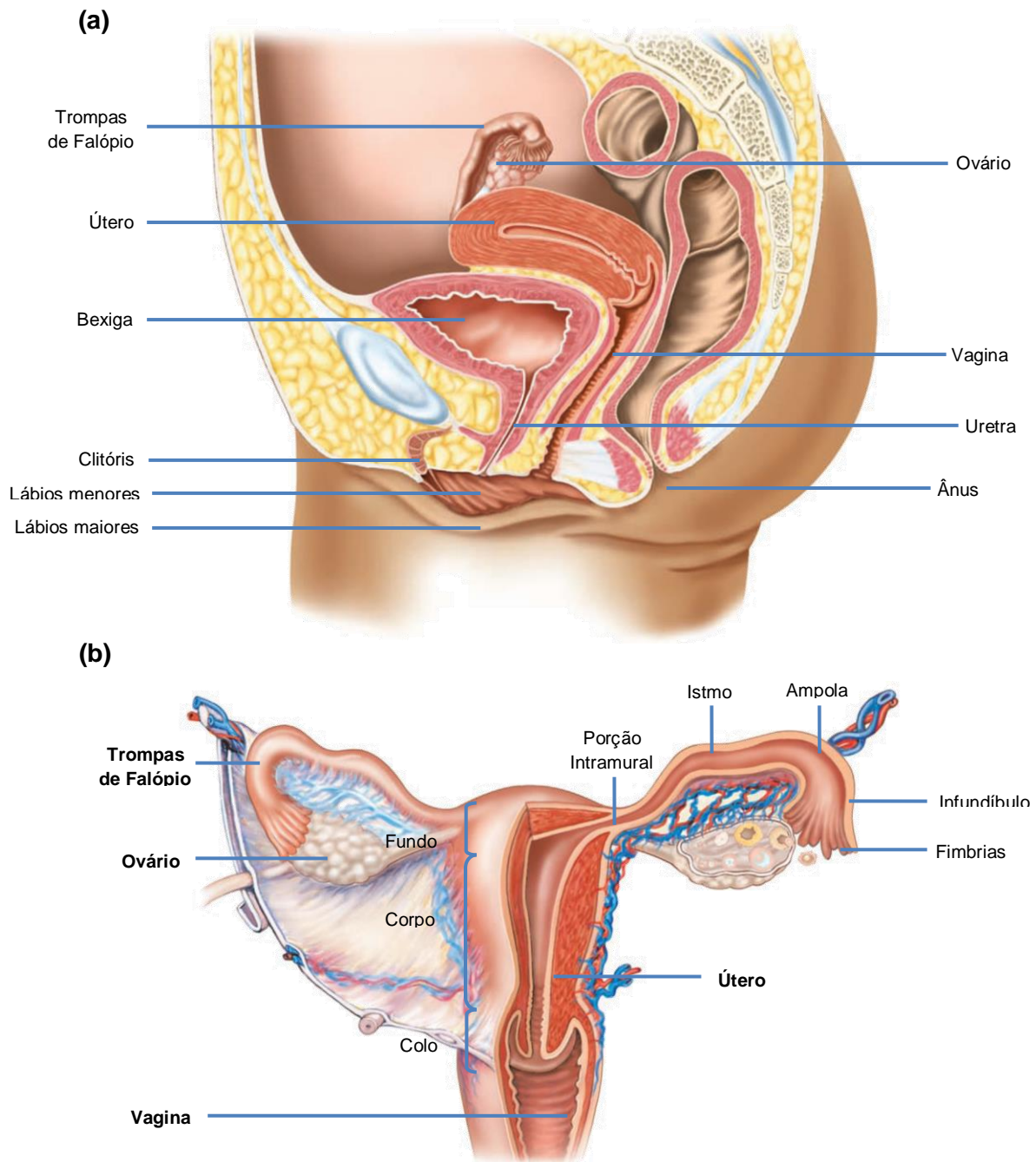
das células de Sertoli, controlando a taxa de espermatogénese (Kasper *et al.*, 2015; Sherwood, 2016; Shier *et al.*, 2012a). Na puberdade, o complexo hipotálamo-hipófise torna-se muito menos sensível a este efeito de feedback negativo, levando a que os níveis de secreção de GnRH, LH e FSH aumentem significativamente, contribuindo para o aumento dos níveis de testosterona e início da capacidade de reprodução sexual masculina (Tate, 2012a; Widmaier *et al.*, 2014).

Para além da regulação hormonal, o controlo nervoso do sistema reprodutor masculino é fundamental, estando envolvido principalmente no controlo do ato sexual, nomeadamente na ereção e no comportamento sexual masculino (Tate, 2012a). Falhas no controlo nervoso podem levar ao comprometimento da função reprodutora, resultando, nomeadamente, em problemas de disfunção erétil (Tate, 2012a).

## 1.2. Anatomia e Fisiologia do Sistema Reprodutor Feminino

Os órgãos constituintes do sistema reprodutor feminino têm como função a produção e manutenção das células sexuais femininas, os ovócitos, transportando-as e promovendo um ambiente favorável à fecundação e ao desenvolvimento da gravidez (Shier *et al.*, 2012a). Os órgãos sexuais principais, ou gónadas, são os dois ovários, responsáveis pelo desenvolvimento folicular e produção hormonal. Os órgãos sexuais secundários incluem as trompas de Falópio, o útero e a vagina (Guyton e Hall, 2016b; Shier *et al.*, 2012a). A genitália externa feminina, ou vulva, é constituída pelos lábios maiores e menores que envolvem e protegem os orifícios vaginal e uretral, e pelo clitóris que representa o órgão erétil feminino (Figura 6) (Sherwood, 2016; Tate, 2012a).





**Figura 6 |** Anatomia do Sistema reprodutor feminino em corte sagital (a) e vista posterior (b). (a) Os órgãos sexuais femininos são os ovários, as trompas de Falópio, o útero e a vagina. O clitóris, os lábios menores e os lábios maiores constituem a genitália externa feminina. (b) As trompas de Falópio são constituídas pelas fimbrias, infundíbulo, ampola, istmo e porção intramural. O útero pode ser dividido em três zonas distintas - fundo, corpo e colo, consoante as suas características histológicas e funcionais. (Adaptado de Shier *et al.* 2012a)

Os ovários são órgãos fundamentais do sistema reprodutor feminino, sendo responsáveis pelo processo de desenvolvimento folicular que resulta na libertação de um ovócito perfeitamente maduro e capaz de ser fecundado, desencadeando uma gravidez. Assim, os ovários, à semelhança das gónadas masculinas, constituem



órgãos fundamentais para a função reprodutora (Sherwood, 2016). Estes órgãos são estruturas de forma oval localizados na cavidade abdominal de cada lado do útero (Figura 6b), que se encontram ancorados por estruturas de tecido conjuntivo, permitindo manterem-se numa posição e alinhamento adequado à passagem dos ovócitos para o trato reprodutivo (Jones e Lopez, 2014; Tate, 2012a). O tecido ovárico pode ser dividido numa camada mais externa e densa, o córtex, e uma interna, a medula. E no córtex que se encontram numerosos folículos ováricos, sendo estes estruturas celulares que contêm no seu interior as células da linha germinativa. A medula é constituída por tecido conjuntivo laxo e intensamente provida de vasos sanguíneos, linfáticos e células nervosas (Jones e Lopez, 2014; Shier *et al.*, 2012a; Tate, 2012a).

As trompas de Falópio são estruturas tubulares que se prolongam desde perto dos ovários até ao topo do útero (Jones e Lopez, 2014). Estas estruturas abrem diretamente para a cavidade peritoneal, junto a cada um dos ovários, apresentando uma forma de funil, designada infundíbulo (Tate, 2012a; Widmaier *et al.*, 2014). Esta porção apresenta projeções nas suas margens, as fimbrias, que auxiliam a entrada do ovócito para as trompas de Falópio (Jones e Lopez, 2014; Shier *et al.*, 2012a). A porção seguinte, a ampola, é a secção mais longa e larga das trompas de Falópio, à qual se segue o Istmo, mais estreito, e por fim a porção intramural que faz a ligação entre as trompas de Falópio e o útero (Jones e Lopez, 2014; Tate, 2012a). É nestas estruturas que irá ocorrer a fecundação, mais concretamente na região da ampola (Sherwood, 2016). O seu epitélio colunar ciliado é responsável por produzir muco e realizar movimentos ciliares que, em conjunto com as contrações musculares peristálticas, auxiliam o transporte do ovócito ou embrião em direção ao útero (Shier *et al.*, 2012a).

O útero é uma cavidade altamente musculada, com paredes espessas, situado entre a bexiga e o reto (Widmaier *et al.*, 2014). Este órgão é responsável por receber o embrião e manter o seu desenvolvimento, tendo a capacidade de alterar extensamente as suas dimensões durante a evolução da gravidez (Shier *et al.*, 2012a). A parte superior do útero, onde se localizam as entradas das trompas de Falópio, é designada de fundo, e a porção principal deste órgão é o corpo, onde ocorre a implantação do embrião. O colo do útero é a porção inferior e mais estreita que estabelece a ligação com a vagina, através do canal cervical (Shier *et al.*, 2012a; Tate, 2012a). A parede uterina é constituída por três camadas - perimétrio, miométrio e endométrio. O perimétrio é a camada mais externa de tecido conjuntivo, que reveste os órgãos reprodutores, seguida por uma camada de tecido muscular liso, o

miométrio. Esta camada é mais espessa na região do corpo e é responsável por fortes contrações musculares durante o parto, dado que as fibras musculares constituintes desta camada aumentam tanto em número como em tamanho durante a gravidez (Jones e Lopez, 2014; Shier *et al.*, 2012a). O endométrio é o epitélio estratificado, descamativo não queratinizado, que reveste o lúmen do útero e pode ser dividido em estrato basal e estrato funcional (Fox, 2011). O estrato funcional, por sua vez, é a camada mais superficial, que altera a sua espessura ao longo do ciclo feminino, em resposta à estimulação hormonal, culminando na sua descamação durante a menstruação (Fox, 2011; Jones e Lopez, 2014; Tate, 2012a). Este estrato é rico em glândulas endometriais, glândulas tubulares simples formadas por dobras do endométrio, responsáveis pela produção de muco, especialmente importante para retardar a passagem dos espermatozoides, através do canal cervical e impedir a entrada de microrganismos infecciosos na cavidade uterina (Fox, 2011; Jones e Lopez, 2014; Shier *et al.*, 2012a; Tate, 2012a).

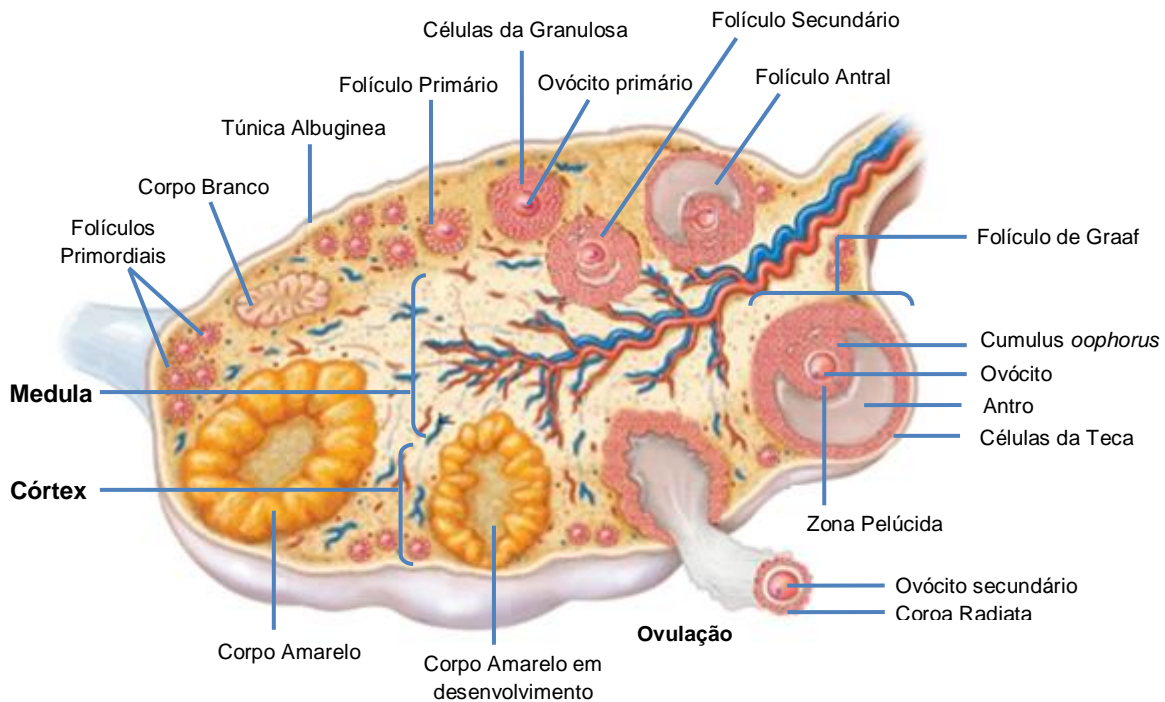
A vagina é uma estrutura fibromuscular que se estende a partir do útero para o exterior do corpo, funcionando assim como passagem do fluxo menstrual, órgão copulador feminino, acomodando o pênis durante a relação sexual, e constituinte do canal de parto (Jones e Lopez, 2014; Shier *et al.*, 2012a; Tate, 2012a). A parede vaginal é constituída por uma camada exterior fibrosa (túnica adventícia), seguida de uma camada muscular (túnica muscular) e uma membrana mucosa interna (túnica mucosa) (Jones e Lopez, 2014; Shier *et al.*, 2012a). A camada fibrosa externa é constituída por tecido conjuntivo denso com fibras elásticas entrelaçadas, suportando diversos feixes nervosos, responsáveis pelo controlo do fluxo sanguíneo e contração da musculatura lisa do tecido vaginal (Jones e Lopez, 2014; Shier *et al.*, 2012a). A camada muscular, por sua vez, apresenta fibras elásticas e feixes de músculo liso, que permitem que a vagina aumente significativamente o seu tamanho durante as relações sexuais e o parto (Jones e Lopez, 2014; Tate, 2012a). Na extremidade inferior da vagina, encontra-se um esfíncter de músculo esquelético que permite o controlo voluntário da abertura vaginal (Jones e Lopez, 2014; Shier *et al.*, 2012a). A camada mucosa é constituída por epitélio estratificado descamativo, que forma uma camada superficial protetora, envolvida no processo de lubrificação deste órgão (Shier *et al.*, 2012a; Tate, 2012a).

### 1.2.1. Desenvolvimento folicular e oogénese

O processo pelo qual as células da linha germinativa se desenvolvem e diferenciam para formar ovócitos maduros, aptos a serem fecundados, designa-se oogénese.

Durante o desenvolvimento embrionário feminino, as células da linha germinativa migram para os ovários, dividindo-se por mitose e atingindo cerca de 6 a 7 milhões de oogónias por volta dos cinco meses de gestação (Fox, 2011; Kasper *et al.*, 2015). A partir desta fase, as mitoses celulares terminam, não se formando mais oogónias (Guyton e Hall, 2016b; Sherwood, 2016; Widmaier *et al.*, 2014). A maioria destas células morre por apoptose antes do nascimento, sendo que as restantes iniciam o processo de meiose, passando a ser chamadas de ovócitos primários (Fox, 2011; Sherwood, 2016). O processo de meiose, no entanto, é interrompido durante a primeira divisão meiótica em fase de profase I, sendo recomeçado apenas a partir da puberdade (Tate, 2012a; Widmaier *et al.*, 2014). Este ovócito imaturo apresenta um núcleo de grandes dimensões, denominado por vesícula germinativa (Elder e Dale, 2011). Nesta fase, começam a ser rodeados por uma única camada de células epiteliais, as células da granulosa, que em conjunto com os ovócitos formam o Folículo primordial (Figura 7) (Guyton e Hall, 2016b; Sherwood, 2016; Shier *et al.*, 2012a).

Na altura do nascimento, os ovários contêm um total de cerca de 2 milhões de ovócitos primários, que representam o total de células sexuais disponíveis durante toda a vida reprodutiva feminina (Fox, 2011; Guyton e Hall, 2016b; Sherwood, 2016; Tate, 2012a). Quando a mulher atinge a puberdade, o número de folículos é ainda inferior, de cerca de 400 mil, embora apenas perto de 400 irão ovular, tendo em conta que, apesar de aproximadamente mil folículos iniciarem o seu desenvolvimento a cada ciclo, apenas um consegue progredir até à fase final de desenvolvimento (Fox, 2011; Shier *et al.*, 2012a; Tate, 2012a). O processo de desenvolvimento folicular pode iniciar-se ainda antes da puberdade, contudo, todos os folículos que entram em desenvolvimento nesta fase sofrem sempre atresia, uma vez que, por falta de estimulação hormonal adequada, este processo nunca consegue terminar.



**Figura 7** | Representação esquemática da histologia do ovário humano, evidenciando os diferentes estádios de desenvolvimento folicular. O ovário é dividido em medula e córtex. No córtex, apresentam-se os folículos em desenvolvimento, desde a fase de folículo primordial, com apenas uma camada de células de granulosa; folículo primário, com várias camadas de células da granulosa e zona pelúcida; folículo secundário, com células da teca; folículo antral, com antro; folículo de Graaf, folículo completamente maduro e expandido, com *cumulus oophorus*; ovulação, ovócito rodeado pela coroa radiata. Formação do corpo amarelo e conseqüente degeneração em corpo branco. (Adaptado de Martini e Bartholomew, 2011)

Após a puberdade, os folículos primordiais quiescentes são recrutados para o crescimento e diferenciação através de um processo altamente regulado. Este limita o número de folículos que iniciam a maturação, de modo a assegurar que o desenvolvimento folicular e, paralelamente, a oogénese possam continuar durante todo o período da vida reprodutiva (Kasper *et al.*, 2015). Este recrutamento inicial de folículos primordiais é caracterizado pelo crescimento do ovócito e pela transição das células da granulosa de pavimentosas para cuboides, formando assim os folículos primários (Kasper *et al.*, 2015; Tate, 2012a). Subsequentemente, as células da granulosa irão proliferar, formando múltiplas camadas celulares, que serão responsáveis pela segregação de proteínas e polissacáridos, dando origem à zona pelúcida (Tate, 2012a; Widmaier *et al.*, 2014). Esta desempenha um papel fundamental na ligação do espermatozoide à superfície do ovócito, após a ovulação (Widmaier *et al.*, 2014). Entre a zona pelúcida e o ovócito encontra-se o espaço perivitelino. Apesar da presença de uma zona pelúcida, a camada interna de células da granulosa permanece intimamente associada ao ovócito, através de estruturas citoplasmáticas que atravessam a zona pelúcida, formando junções Gap. Através

dessas junções, as células da granulosa fornecem ao ovócito tanto nutrientes, como mensageiros químicos essenciais para controlar o desenvolvimento ovocitário (Sherwood, 2016; Widmaier *et al.*, 2014). Alguns folículos primários serão, posteriormente, estimulados a aumentar de tamanho, desenvolvendo uma série de vesículas entre as células da granulosa, resultantes dos fluidos que estas células segregam (Fox, 2011; Tate, 2012a; Widmaier *et al.*, 2014). A par disso, células especializadas de tecido conjuntivo ovariano proliferam e diferenciam-se para formar uma camada externa de células da Teca, em resposta a fatores parácrinos, segregados pelas células da granulosa. Neste ponto, são chamados de folículos secundários (Sherwood, 2016; Tate, 2012a; Widmaier *et al.*, 2014). O folículo secundário, por sua vez, continua o desenvolvimento folicular, aumentando, novamente, de tamanho e as vesículas fundem-se, formando uma cavidade única, o antro (Fox, 2011; Tate, 2012a). Nesta fase, os folículos designam-se de folículo Antral (Widmaier *et al.*, 2014). Como resultado do aumento do fluido folicular, o antro começa a expandir progressivamente, deslocando o ovócito para a periferia do folículo. Este folículo dominante, folículo de Graaf, pode atingir até cerca de 10 milímetros de diâmetro, contendo o ovócito ancorado por um conjunto de célula da granulosa, designado *cumulus oophorus* e um anel de células em torno do ovócito, a coroa radiata (Figura 7) (Fox, 2011; Shier *et al.*, 2012a).

À medida que a ovulação se aproxima, o processo de meiose é reiniciado e o ovócito primário completa a primeira divisão meiótica. Deste processo, resultam duas células filhas haploides, ou seja, contendo cada uma destas células apenas 23 cromossomas, metade do conteúdo genético da célula inicial que lhes deu origem (Fox, 2011; Tate, 2012a). Ao contrário do que acontece na espermatogénese, a primeira divisão meiótica não resulta em duas células iguais, mas sim numa célula de maiores dimensões, o ovócito secundário, e outra de menores dimensões, o primeiro glóbulo polar (Sherwood, 2016; Shier *et al.*, 2012a). Os glóbulos polares são células não funcionais que, quer entrem ou não em segunda divisão meiótica, irão acabar por degenerar (Guyton e Hall, 2016b; Sherwood, 2016; Tate, 2012a). Por outro lado, o ovócito secundário é a célula que irá continuar o processo de oogénese, entrando na segunda divisão meiótica. Esta célula apresenta um maior conteúdo citoplasmático, de tal forma que tenha capacidade e dimensões adequadas para originar um embrião (Fox, 2011). À semelhança do que acontece na primeira divisão meiótica, também a segunda divisão não é completa, sendo que o ovócito secundário fica parado em metáfase II (Tate, 2012a).

Por estimulação hormonal o folículo dominante continua a aumentar de tamanho, de tal forma que irá levar à ruptura da parede do ovário, também ela já enfraquecida. Assim, o ovócito secundário será libertado do ovário e respetivo folículo de Graaf para a cavidade peritoneal, rodeado apenas pelas células da coroa radiata, um processo designado ovulação (Widmaier *et al.*, 2014). Após a ovulação, sob a influência da LH, as células foliculares que permanecem no ovário expandem-se, formando uma estrutura glandular temporária, o corpo lúteo ou amarelo (Shier *et al.*, 2012a; Widmaier *et al.*, 2014). Este mantém-se funcional por cerca de 10 a 12 dias e, caso não ocorra fecundação, regride, tornando-se no corpo albicans ou branco (Tate, 2012a). Esta é uma estrutura não funcional que eventualmente degenera e desaparece (Fox, 2011; Tate, 2012a).

O ovócito secundário, parado em metáfase II, só completa a meiose caso ocorra penetração de um espermatozoide. Assim, a fertilização é o sinal necessário para que oogénese termine, resultando na formação de um segundo glóbulo polar e no ovócito fecundado ou zigoto (Shier *et al.*, 2012a).

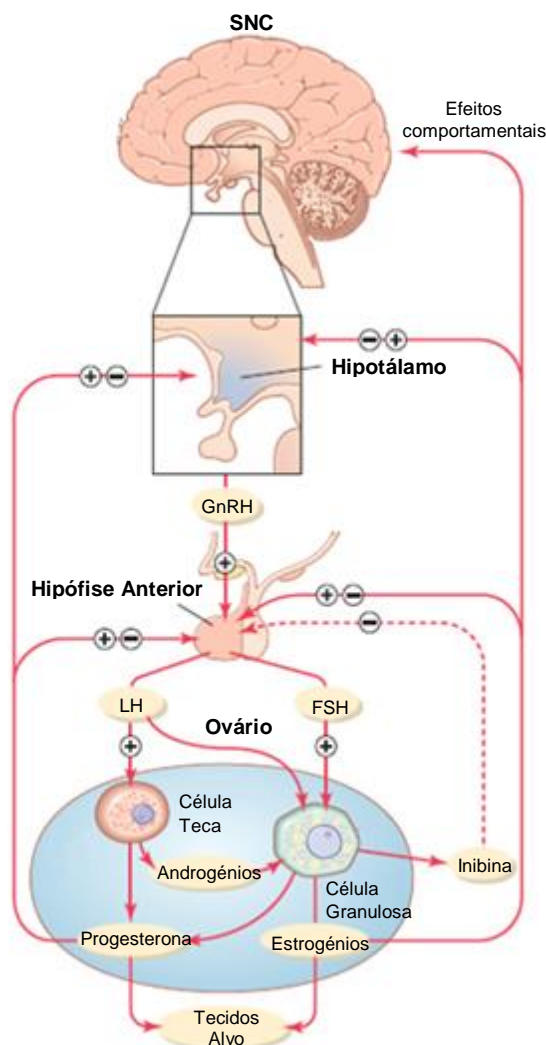
À medida que a idade da mulher vai avançando, a qualidade ovocitária vai diminuindo drasticamente, uma vez que os ovócitos em idades mais avançadas estão consequentemente mais envelhecidos do que aqueles que ovulam na puberdade, sendo possível que resultem em bebés com alterações cromossómicas (Widmaier *et al.*, 2014).

### 1.2.2. Controlo hormonal feminino

O sistema reprodutor feminino é intensamente controlado por um complexo sistema hormonal, constituindo o sistema hipotálamo-hipófise-ovários (Fox, 2011; Widmaier *et al.*, 2014). Para além do fator libertador de gonadotrofinas (GnRH) e das hormonas LH e FSH, também as hormonas sexuais femininas desempenham um papel fundamental nesta regulação (Widmaier *et al.*, 2014). Estas hormonas, produzidas a nível dos ovários, podem ser divididas em dois grandes grupos – estrogénio e progesterona (Shier *et al.*, 2012a). Uma intrínseca e complexa interação das hormonas sexuais femininas e das gonadotrofinas resultam num padrão cíclico de secreção hormonal, que irá determinar o ciclo reprodutivo feminino que dura tipicamente 28 dias (Fox, 2011; Guyton e Hall, 2016b; Tate, 2012a). De uma forma geral, a GnRH, produzida pelo hipotálamo, estimula a libertação de FSH e LH pela hipófise anterior, que por sua vez irão atuar nas gónadas femininas, afetando o desenvolvimento folicular, a

ovulação e a formação do corpo lúteo. Em resposta a estas hormonas, os folículos e o corpo lúteo produzem estrogénio e progesterona, que regulam alterações no endométrio (Figura 8) (Tate, 2012a).

Antes da puberdade, as hormonas GnRH, LH, FSH, estrogénio e progesterona são produzidas em muito baixas quantidades (Guyton e Hall, 2016b; Tate, 2012a). No entanto, após a puberdade, os níveis de GnRH e, conseqüentemente, LH e FSH aumentam drasticamente, estabelecendo o padrão cíclico mensal que se mantém ao longo de toda a vida reprodutiva (Shier *et al.*, 2012a; Tate, 2012a; Widmaier *et al.*, 2014). O primeiro ciclo reprodutivo feminino, caracterizado pelo aparecimento da primeira menstruação, designada menarca, ocorre quando os ovários e restantes órgãos femininos se encontram suficientemente maduros, de tal forma que começam a responder à ação hormonal. A puberdade marca assim o início da vida reprodutiva feminina (Shier *et al.*, 2012a; Tate, 2012a). Durante este período, o aumento de estrogénio e progesterona serão responsáveis por promover o desenvolvimento ovocitário e a genitália feminina, assim como as características sexuais secundárias, caracterizadas por alterações estruturais e comportamentais que distinguem a mulher adulta (Tate, 2012a).



**Figura 8** | Regulação hormonal do sistema reprodutor feminino pelo eixo hipotálamo-hipófise-ovários. A hormona GnRH estimula a segregação de LH e FSH que atuam a nível das células da Teca e da Granulosa, respetivamente. As células da Teca são responsáveis por produzir androgénios que se difundem para as células da Granulosa onde são convertidos em estrogénios. Tanto as células da Teca como da Granulosa são responsáveis por produzir progesterona. A progesterona e os estrogénios exercem tanto efeito de feedback negativo como positivo no hipotálamo e na hipófise anterior, dependendo da fase do ciclo menstrual. A Inibina tem um efeito de feedback negativo na hipófise anterior, inibindo a libertação de FSH. (+) ação estimulante; (-) ação inibitória; SNC, sistema nervoso central; GnRH, fator libertador de gonadotrofinas; FSH, hormona foliculo-estimulante; LH, hormona lúteo-estimulante. (Adaptado de Guyton e Hall, 2016b)

### 1.2.2.1. Ciclo menstrual

O ciclo menstrual consiste em alterações periódicas mensais a nível do útero e do ovário de uma mulher sexualmente madura, que ocorrem em resposta à variação cíclica hormonal (Tate, 2012a). O ciclo ovárico pode ser, então, dividido em três fases – folicular, ovulação e lútea – assim como o ciclo uterino – menstrual, proliferativa e secretora (Figura 9) (Fox, 2011; Widmaier *et al.*, 2014).

O dia 1 do ciclo é considerado o primeiro dia da menstruação. A partir deste momento inicia-se a **fase menstrual**, do ciclo uterino, que se prolonga tipicamente por cerca de cinco dias (Tate, 2012a; Widmaier *et al.*, 2014). Nesta fase, o endométrio encontra-se em degeneração e descamação, resultante das alterações hormonais e estruturais ocorridas durante o ciclo menstrual anterior. Quando o fluxo menstrual cessa, inicia-se no útero a **fase proliferativa**, que se caracteriza pelo espessamento do endométrio, como resposta à ação do estrogénio. A partir das células epiteliais restantes do ciclo anterior, forma-se, então, uma camada uniforme de células endometriais cuboides, que irão, posteriormente, tornar-se colunares, envaginando para formar glândulas secretoras, altamente vascularizadas (Tate, 2012a).

Simultaneamente às alterações endometriais, o ovário encontra-se em **fase folicular**. Esta fase é caracterizada pelo recrutamento inicial de um conjunto de folículos secundários, por ação da FSH, que aumenta a partir do final da fase lútea do ciclo anterior. No início da fase folicular, a produção de GnRH pelo hipotálamo aumenta, estimulando a produção e segregação de gonadotrofinas pela hipófise anterior (Tate, 2012a). A LH irá atuar ao nível das células da Teca, induzindo não só a sua proliferação, como também a produção de androgénios. Estes difundem-se para as células da granulosa, onde são convertidos em estrogénios por uma enzima designada aromatase (Tate, 2012a; Widmaier *et al.*, 2014). Por outro lado, a FSH irá atuar diretamente nas células da granulosa, promovendo a sua proliferação e a conversão dos androgénios em estrogénios (Tate, 2012a). Assim, a secreção de estrogénios pelas células da granulosa requer a interação dos dois tipos de células foliculares, assim como das gonadotrofinas que nelas atuam (Widmaier *et al.*, 2014).

O estrogénio pode funcionar como agente parácrino ou autócrino, atuando em conjunto com a FSH e fatores de crescimento, para a estimulação da proliferação das células da granulosa, resultando, conseqüentemente, no aumento da produção de estrogénio (Widmaier *et al.*, 2014). As células da granulosa são também elas responsáveis pela produção de hormonas peptídicas, a Inibina A e B (Kasper *et al.*, 2015). A Inibina B é segregada pelas células da granulosa de pequenos folículos



Antrais, durante a fase folicular, desempenhando um importante papel no processo de dominância, por inibição da segregação de FSH (Kasper *et al.*, 2015). Por outro lado, a Inibina A, para além das células da granulosa, pode ser também segregada pelas células da teca de folículos dominantes, assim como pelo corpo lúteo (Kasper *et al.*, 2015).

Assim, no início da fase folicular, a FSH estimula a produção de recetores de FSH nas células da granulosa, de modo a que se tornem altamente sensíveis a esta hormona (Fox, 2011). No entanto, com o decorrer do desenvolvimento folicular e os níveis de estrogénio e Inibina B aumentados, a segregação de FSH diminui, não sendo suficiente para estimular o crescimento e prevenir a atresia de todos os folículos em desenvolvimento (Widmaier *et al.*, 2014). A partir deste momento, apenas um folículo será capaz de responder à estimulação hormonal, uma vez que apresenta à sua superfície um maior número de recetores de FSH, sendo que os restantes, menos desenvolvidos, irão degenerar (Sherwood, 2016; Widmaier *et al.*, 2014). À medida que o folículo dominante continua a sua maturação, as células da granulosa começam a expressar recetores de LH à sua superfície, em resposta à ação de FSH (Fox, 2011; Widmaier *et al.*, 2014). Estes recetores vão ser importantes para que, a partir deste momento, a LH passe a atuar não só nas células da Teca como também nas da granulosa (Widmaier *et al.*, 2014).

Com o aumento do folículo dominante, os níveis de estrogénio, produzido pelo crescente número de células da granulosa, vão aumentar exponencialmente, passando a exercer um efeito de feedback positivo na segregação de LH e FSH. O estrogénio irá atuar tanto a nível do hipotálamo, estimulando a segregação de GnRH, como diretamente a nível da hipófise anterior, aumentando a sensibilidade das células libertadoras de LH ao GnRH, resultando num aumento significativo dos níveis de segregação de LH muito superior aos que se verificam para a FSH (Fox, 2011; Widmaier *et al.*, 2014). Os níveis de FSH e LH irão atuar sinergicamente para um rápido aumento do folículo dominante durante os últimos dias antes da **ovulação** (Guyton e Hall, 2016b; Kasper *et al.*, 2015). O pico de LH tem também um efeito específico sobre as células da granulosa e da teca, convertendo-as, principalmente, a células secretoras de progesterona. Portanto, a taxa de secreção de estrogénio começa a cair cerca de um dia antes da ovulação, enquanto quantidades crescentes de progesterona começam a ser segregadas (Guyton e Hall, 2016b; Widmaier *et al.*, 2014).

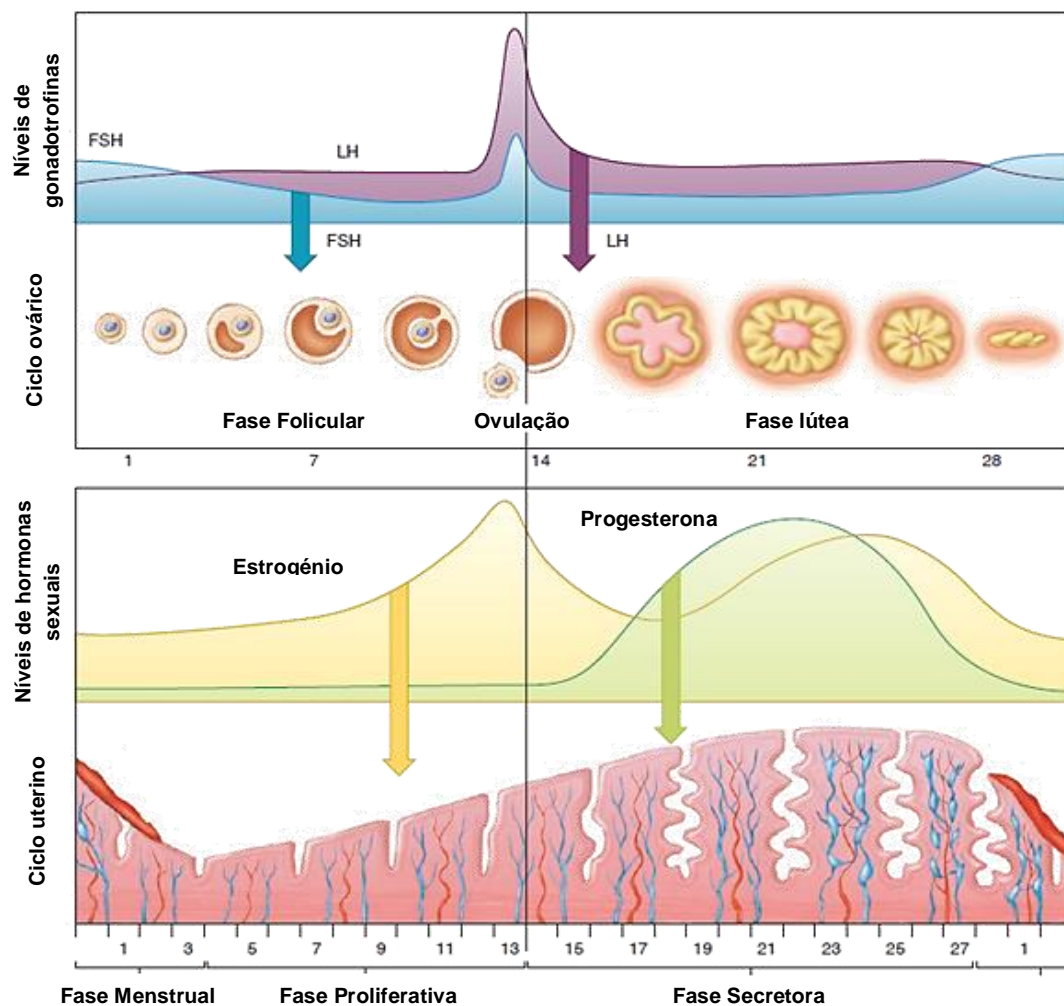
Este pico de LH será, assim, responsável por induzir no ovócito primário a conclusão da primeira divisão meiótica, estimular a ovulação e o desenvolvimento do corpo lúteo (Tate, 2012a).

Nesta fase, a teca externa começa a libertar enzimas proteolíticas (contidas em lisossomas), que irão provocar a dissolução da parede capsular do folículo e o seu consequente enfraquecimento, resultando na expansão de todo o folículo e degeneração do *cumulus oophorus* (Guyton e Hall, 2016b; Sherwood, 2016). Simultaneamente, ocorre um rápido crescimento de novos vasos sanguíneos para dentro da parede do folículo, acompanhado da segregação de prostaglandinas pelas células da granulosa, que irão provocar vasodilatação e, conseqüentemente, a transudação de plasma para o folículo, contribuindo para a sua expansão (Guyton e Hall, 2016b; Sherwood, 2016; Widmaier *et al.*, 2014). Finalmente, a combinação da expansão folicular, da degeneração simultânea do *cumulus oophorus* e da ação das prostaglandinas na contração muscular das células envolventes, irão provocar a rutura das paredes do folículo, libertando o líquido Antral juntamente com o ovócito secundário rodeado pela zona pelúcida e pela coroa radiata (Fox, 2011; Guyton e Hall, 2016b; Sherwood, 2016).

O pico de LH é também responsável por induzir a transformação das células foliculares restantes em células lúteas, formando assim no ovário o corpo lúteo (Fox, 2011; Kasper *et al.*, 2015; Shier *et al.*, 2012a; Tate, 2012a; Widmaier *et al.*, 2014). A partir deste momento, inicia-se a **fase lútea** no ovário, em que as células da granulosa do corpo lúteo começam a segregar elevados níveis de estrogénio, progesterona e Inibina A (Kasper *et al.*, 2015; Widmaier *et al.*, 2014). Em conjunto, estas hormonas irão estabelecer um processo de feedback negativo, inibindo a segregação de LH e FSH pela hipófise anterior. Conseqüentemente, níveis baixos de gonadotrofinas irão permitir que nesta fase, enquanto o corpo lúteo se encontra ativo, nenhum folículo seja estimulado a desenvolver-se (Shier *et al.*, 2012a). No entanto, caso não ocorra fecundação e conseqüente implantação, as células do corpo lúteo começam a atrofiar, dando origem ao corpo albicans e perdendo a sua função secretora (Shier *et al.*, 2012a; Tate, 2012a). Os baixos níveis de estrogénio, progesterona e Inibina A diminuem a repressão da segregação de LH e FSH, levando a um aumento destas hormonas, fundamentais para o recrutamento de folículos num novo ciclo (Widmaier *et al.*, 2014).

A nível do útero, os níveis elevados de progesterona segregados pelo corpo lúteo irão induzir a proliferação tanto de células endometriais como miometriais,

tornando o endométrio mais vascular e glandular, característico da **fase secretora** (Shier *et al.*, 2012a; Tate, 2012a). Esta hormona será também responsável por estimular as glândulas uterinas a produzir secreções ricas em lípidos e glicogénio, promovendo um ambiente favorável a uma possível implantação e consequente desenvolvimento embrionário (Shier *et al.*, 2012a; Tate, 2012a). Embora, na fase de ovulação, o estrogénio induza a contração das células musculares uterinas, desempenhando um importantíssimo papel no auxílio da progressão dos espermatozoides em direção às tropas de Falópio, a progesterona desempenha um papel oposto, na fase lútea, onde a sua concentração é superior, inibindo a contração muscular, fundamental para que o embrião possa implantar de forma segura na parede uterina (Tate, 2012a; Widmaier *et al.*, 2014).



**Figura 9 |** Alterações hormonais do ciclo menstrual e respetiva regulação do ciclo ovário e uterino. Ao longo do ciclo menstrual ocorrem variações nos níveis de gonadotrofinas, que regulam o ciclo ovário. A FSH é determinante para o desenvolvimento e dominância folicular, na fase folicular do ciclo ovário. O pico de LH (e FSH) induz a ovulação, determinando o início da fase lútea com a formação do corpo amarelo e consequente degeneração em corpo branco. As alterações ovárias resultam na segregação diferencial de estrogénio e progesterona, que regulam o ciclo uterino. O estrogénio é essencial para promover a proliferação do endométrio na fase proliferativa do ciclo uterino. A progesterona aumenta após ovulação induzindo a fase secretora do ciclo uterino. A ação conjunta das duas hormonas irá promover extensas alterações endometriais que culminam na fase menstrual. (Adaptado de Fox, 2011)

Quando o corpo lúteo degenera, a concentração de estrogénio e progesterona diminui drasticamente, levando à produção de prostaglandinas pelo endométrio. As prostaglandinas irão induzir a constrição dos vasos sanguíneos e a contração rítmica do músculo liso uterino. A vasoconstrição irá, conseqüentemente, diminuir o aporte de oxigénio e nutrientes ao espesso tecido endometrial, que acabará por desintegrar, libertando para o lúmen uterino, restos celulares degenerados, restando apenas uma fina camada basal, que irá permitir o crescimento do endométrio no novo ciclo (Shier *et al.*, 2012a; Tate, 2012a; Widmaier *et al.*, 2014). Ao mesmo tempo, o músculo liso uterino começa a contrair ritmicamente, por ação das prostaglandinas, auxiliando a libertação do fluxo menstrual. Os restos de células endometriais, em conjunto com o sangue libertado dos vasos sanguíneos danificados e com as secreções uterinas, são expelidos através da vagina, constituindo o fluxo menstrual (Shier *et al.*, 2012a; Tate, 2012a). Assim, o fluxo menstrual marca o fim de um ciclo reprodutivo e o início de outro (Shier *et al.*, 2012a).

### 1.3. Fertilização e desenvolvimento embrionário

#### 1.3.1. Transporte de gâmetas no trato feminino

A fertilização é o processo pelo qual os gâmetas feminino e masculino se unem, para formar uma nova célula, o zigoto (Tate, 2012b). A fertilização ocorre, normalmente, na região da ampola das trompas de Falópio, pelo que tanto o ovócito como o espermatozoide têm de ser transportados do seu local de produção, as gónadas, para a ampola (Sherwood, 2016; Young *et al.*, 2014b).

Após ovulação, o ovócito é libertado na cavidade abdominal, sendo rapidamente, e em condições normais, apanhado pelas trompas de Falópio. A dilatação da porção final destas estruturas, que forma a zona do infundíbulo, assim como as fimbrias e respetivos cílios que revestem a sua superfície, são essenciais para que, através de movimentos coordenados, garantam a passagem do ovócito para as trompas de Falópio (Sherwood, 2016).

Eventualmente, o ovócito pode falhar a entrada nas trompas de Falópio e permanecer na cavidade abdominal. Caso tal aconteça, o ovócito pode ser igualmente fecundado, resultando, no entanto, numa gravidez abdominal ectópica, que se encontra associada a inúmeras complicações durante o período de gestação e que culminam geralmente no aborto espontâneo (Sherwood, 2016). Se a situação for

diagnosticada precocemente, será igualmente indicada a indução do aborto, uma vez que constitui uma situação de elevado risco para a vida da mãe (Widmaier *et al.*, 2014). Uma gravidez ectópica pode também ocorrer quando o embrião não completa o seu trajeto até ao útero, onde normalmente deve implantar, permanecendo nas trompas de Falópio (Widmaier *et al.*, 2014). Estas estruturas, por não apresentarem elasticidade suficiente para comportar uma gravidez, não permitem o desenvolvimento do feto até ao término do período gestacional.

Já no interior das trompas de Falópio, o ovócito é rapidamente impulsionado por contrações peristálticas e ação ciliar em direção à ampola, onde pode ser fecundado. Caso não seja fecundado, o ovócito começa a desintegrar-se cerca de 12 a 24 horas após a ovulação, sendo, conseqüentemente, fagocitado pelas células que revestem o trato reprodutor (Sherwood, 2016). Tendo em conta que o tempo de vida dos espermatozoides é consideravelmente superior ao dos ovócitos, sobrevivendo tipicamente 48 horas, mas podendo atingir os 5 dias ainda viáveis no trato feminino, a fertilização pode ocorrer quando o esperma é depositado entre 5 dias antes e 24 horas após a ovulação (Sherwood, 2016; Tate, 2012b). Assim, a fecundação pode ocorrer apenas durante um período de tempo limitado em cada ciclo, a que se designa período fértil (Sherwood, 2016).

Após a ejaculação dos espermatozoides para o interior da vagina durante a relação sexual, estes serão transportados até à região da ampola, passando através do colo e corpo do útero e demorando cerca de 30 minutos a completar este trajeto (Sherwood, 2016; Tate, 2012b). Aproximadamente 1 minuto após a deposição na vagina, o líquido seminal começa a coagular, tornando-se mais espesso e viscoso, de modo a evitar a perda de esperma pela vagina. Esta coagulação resulta da ação da enzima vesiculase, segregada pela próstata, que ao entrar em contacto com o fibrinogénio, proveniente das vesículas seminais, o converte numa complexa rede de fibrina (Jones e Lopez, 2014). Após cerca de 20 minutos, no entanto, o líquido seminal liquefaz novamente por ação de uma enzima fibrinolítica de atuação mais lenta, segregada também pela próstata, permitindo a continuação do trajeto dos espermatozoides em direção ao colo do útero (Jones e Lopez, 2014). O ambiente ácido da vagina, com um valor de pH de cerca de 4,2, inibe a motilidade dos espermatozoides, pelo que a alcalinidade do líquido seminal é essencial para equilibrar o pH no interior do trato vaginal feminino, atingindo um valor de pH de cerca de 7,2, que, por sua vez, aumenta a motilidade dos espermatozoides, permitindo a passagem do canal cervical (Jones e Lopez, 2014).

O colo do útero constitui a maior barreira à passagem dos espermatozoides, não só devido à sua anatomia altamente pregueada e musculada, mas principalmente devido à presença de muco cervical (Jones e Lopez, 2014). Ao longo da maior parte do ciclo menstrual feminino, o muco cervical é demasiado espesso para permitir a penetração dos espermatozoides (Sherwood, 2016; Shier *et al.*, 2012b). No entanto, antes da ovulação, os níveis elevados de estrogénio combinados com os níveis baixos de progesterona irão promover a segregação de muco aquoso, que permitirá a passagem de espermatozoides apenas neste período específico (Jones e Lopez, 2014; Sherwood, 2016; Shier *et al.*, 2012b). Desta forma, apenas os espermatozoides móveis e normais têm capacidade para atravessar esta barreira, onde os restantes ficam retidos (Jones e Lopez, 2014).

É nesta fase que os espermatozoides adquirem a sua capacidade de fertilização, um processo designado de capacitação (Fox, 2011; Widmaier *et al.*, 2014). A capacitação dos espermatozoides ocorre quando estes se encontram expostos ao trato feminino e envolve a remoção e modificação de moléculas inibidoras seminais e colesterol, alterando a sua superfície (Fritz e Speroff, 2010; Guyton e Hall, 2016c; Jones e Lopez, 2014; Sherwood, 2016; Tate, 2012b). Estas alterações irão permitir que os espermatozoides sejam capazes de desencadear a reação acrossómica, com consequente destabilização das membranas celulares e do acrossoma, um importante passo no processo de fertilização (Fritz e Speroff, 2010; Jones e Lopez, 2014). Para além disso, a capacitação irá permitir a ligação dos espermatozoides à zona pelúcida dos ovócitos, assim como a aquisição de hipermotilidade, movimentos flagelares mais rápidos e vigorosos que os impulsionam em direção ao ovócito, de um modo mais eficaz (Fritz e Speroff, 2010; Jones e Lopez, 2014; Widmaier *et al.*, 2014). As células germinativas masculinas que não sejam capazes de se mover rapidamente através do aparelho reprodutor feminino estarão vulneráveis à destruição pelo sistema imunológico, não atingindo o local de fecundação (Jones e Lopez, 2014). Apenas cerca de 10% dos espermatozoides sofrem capacitação (Fox, 2011).

O transporte dos espermatozoides ao longo do útero vai depender não só da hipermotilidade adquirida pelos espermatozoides que sofrem capacitação, mas principalmente das contrações do miométrio, induzidas por prostaglandinas presentes no líquido seminal, assim como pelos elevados níveis de estrogénio e pela hormona oxitocina libertada pela hipófise anterior aquando do orgasmo feminino (Guyton e Hall, 2016c; Jones e Lopez, 2014; Sherwood, 2016; Tate, 2012b).

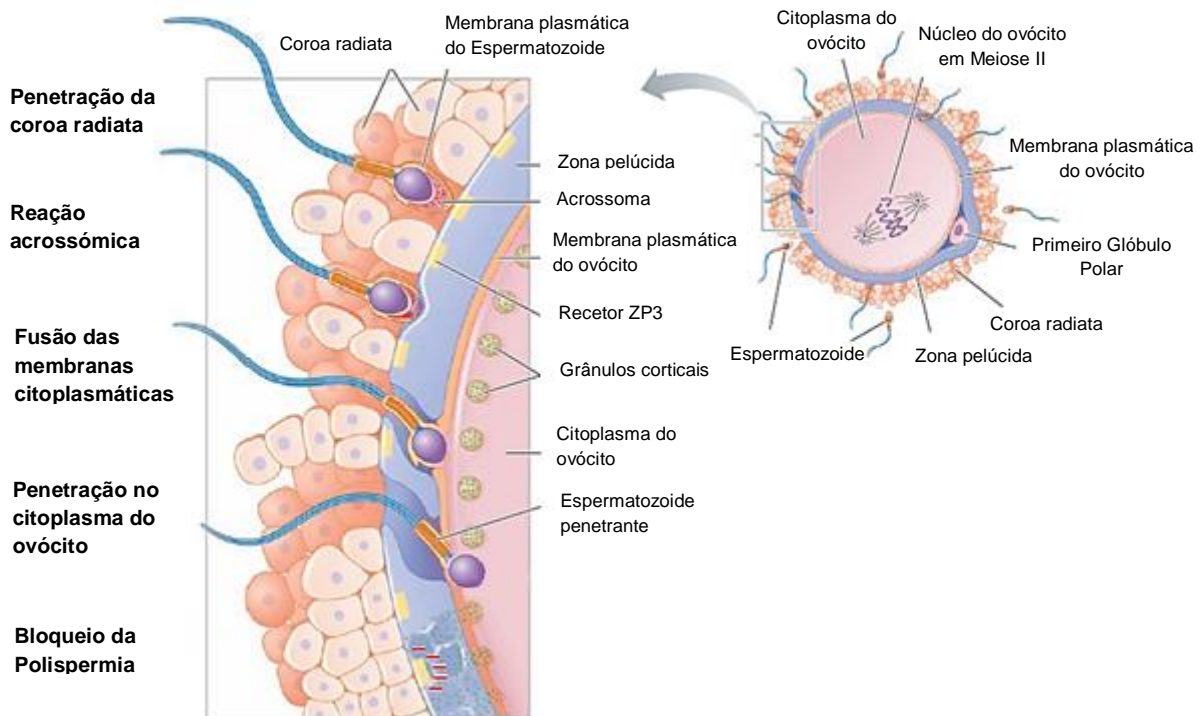
Quando os espermatozoides alcançam as trompas de Falópio, a sua progressão é retardada pelo muco, permitindo mais uma vez a seleção dos espermatozoides capacitados que serão capazes de progredir, ao contrário dos que não apresentam hipermotilidade que ficarão retidos no epitélio tubar (Jones e Lopez, 2014; Sherwood, 2016). Os espermatozoides são assim atraídos em direção ao ovócito por termo e quimiotaxia, auxiliados por movimento ciliar e contrações ascendentes do músculo liso das paredes das trompas (Fox, 2011; Jones e Lopez, 2014).

### 1.3.2. Fertilização

A fertilização inicia-se quando os espermatozoides entram em contacto com o ovócito na região da ampola, dando início ao processo de fusão de gâmetas (Widmaier *et al.*, 2014). A hipermotilidade adquirida dos espermatozoides irá permitir que estes atravessem as células da granulosa que constituem a coroa radiata em volta do ovócito, atingindo a zona pelúcida (Guyton e Hall, 2016c; Tate, 2012b; Widmaier *et al.*, 2014). Quando os espermatozoides capacitados atingem a zona pelúcida do ovócito, os recetores presentes à sua superfície ligam-se especificamente a glicoproteínas constituintes da zona pelúcida, nomeadamente a glicoproteína ZP3 (Guyton e Hall, 2016c; Jones e Lopez, 2014; Sherwood, 2016). A interação de espermatozoides com moléculas específicas na zona pelúcida do ovócito desencadeia a reação acrossómica, que envolve a fusão progressiva da membrana acrossomal com a membrana plasmática do espermatozoide, criando poros através dos quais as enzimas acrossomais podem ser libertadas por exocitose (Figura 10) (Fox, 2011). Entre estas enzimas compreendem-se a hialuronidase e enzimas proteolíticas. Por um lado, a hialuronidase irá despolimerizar os polímeros de ácido hialurónico, responsáveis por manter coesas as células da granulosa, impulsionando assim a dispersão da coroa radiata (Guyton e Hall, 2016c; Jones e Lopez, 2014). Por outro lado, enzimas proteolíticas irão atuar na zona pelúcida, provocando a sua digestão (Fox, 2011; Guyton e Hall, 2016c). A presença de vários espermatozoides no local de fecundação será essencial para que se libertem enzimas suficientes que permitam a penetração do espermatozoide no ovócito (Sherwood, 2016; Shier *et al.*, 2012b).

Durante este processo, a cauda do espermatozoide continua a bater vigorosamente, ajudando a penetrar através da zona pelúcida e do espaço perivitelino, atingindo a membrana plasmática do ovócito. O primeiro espermatozoide capaz de atravessar a zona pelúcida irá atingir a membrana plasmática do ovócito, ocorrendo

uma fusão entre esta e a membrana do espermatozoide (Figura 10) (Sherwood, 2016; Widmaier *et al.*, 2014). De seguida, o espermatozoide é lentamente libertado para o citosol do ovócito, sendo que as mitocôndrias e a cauda degeneram posteriormente (Elder e Dale, 2011).



**Figura 10** | Processo de fertilização ovocitária evidenciando as etapas da penetração espermática. O espermatozoide atravessa a coroa radiata e liga-se aos receptores ZP3 da zona pelúcida. Esta ligação desencadeia a reação acrossômica, na qual são libertadas enzimas hidrolíticas, que promovem a digestão da zona pelúcida e dispersão da coroa radiata. Quando o espermatozoide atravessa a ZP, as membranas citoplasmáticas do espermatozoide e do ovócito fundem-se, permitindo a entrada do espermatozoide para o citoplasma do ovócito. É desencadeada uma resposta de bloqueio da polispermia, por exocitose dos grânulos corticais que inativam os receptores ZP3 e enrijecem a ZP. Inicia-se a segunda divisão meiótica com formação do segundo glóbulo polar. ZP, zona pelúcida (Adaptado de Sherwood, 2016)

Logo após a fecundação por um único espermatozoide, a concentração de iões de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), armazenados a nível do retículo endoplasmático, aumenta significativamente no citoplasma, difundindo-se ao longo da membrana citoplasmática do ovócito (Fox, 2011; Guyton e Hall, 2016c). Este aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  irá provocar a exocitose de grânulos corticais, presentes à superfície do ovócito, um processo designado de reação cortical (Jones e Lopez, 2014; Widmaier *et al.*, 2014). O conteúdo enzimático dos grânulos corticais é, então, libertado para o espaço perivitelino, provocando o endurecimento da zona pelúcida e a inativação dos locais de ligação aos espermatozoides (Jones e Lopez, 2014; Sherwood, 2016; Shier *et al.*,



2012b; Widmaier *et al.*, 2014). Estas alterações estruturais irão impedir que outro espermatozoide seja capaz de penetrar nas camadas ovocitárias, evitando assim a polispermia (Fox, 2011).

O aumento dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático será também o sinal para o desencadear da conclusão da segunda divisão meiótica, resultando na libertação do segundo glóbulo polar para o espaço perivitelino (Fox, 2011; Jones e Lopez, 2014; Sherwood, 2016). O núcleo haploide, que se forma após a segunda divisão meiótica, o pronúcleo feminino, juntamente com o núcleo haploide do espermatozoide, o pronúcleo masculino, migram para o centro da célula (Tate, 2012b; Widmaier *et al.*, 2014). Cerca de 12 horas após fertilização, as membranas nucleares desintegram-se, permitindo a fusão dos dois pronúcleos, terminando assim o processo de fertilização e restabelecendo o número de cromossomas de uma célula diploide, formando o zigoto (Fox, 2011).

### 1.3.3. Desenvolvimento Embrionário

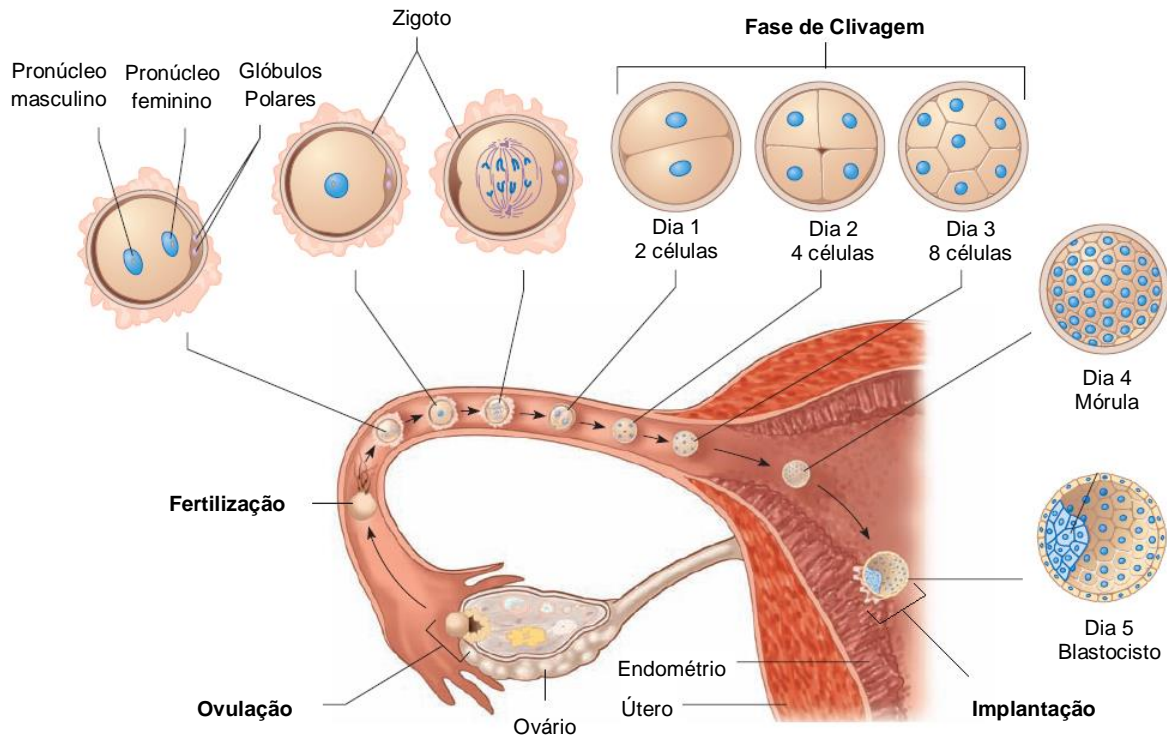
Cerca de 30 a 36 horas após a formação do zigoto, este entra em processo de mitose, originando duas células de menores dimensões, designadas de blastómeros (Fox, 2011; Shier *et al.*, 2012b). Estes continuam a dividir-se, originando um embrião de 4 células, perto de 40 horas após a fertilização (2º dia). A terceira divisão mitótica ocorre por volta das 50 a 60 horas após fertilização, para formar um embrião de 8 células (3º Dia) (Figura 11) (Fox, 2011). Esta fase inicial do desenvolvimento embrionário, caracterizada por rápidas divisões mitóticas, designa-se por fase de clivagem (Shier *et al.*, 2012b; Widmaier *et al.*, 2014). Nesta fase, embora o número de células aumente, as suas dimensões diminuem consideravelmente, uma vez que o embrião mantém o tamanho semelhante ao zigoto inicial (Shier *et al.*, 2012b; Tate, 2012b). Nesta fase muito inicial do desenvolvimento embrionário, todas as células constituintes são totipotentes, tendo potencial de se diferenciar em qualquer tipo celular, necessário ao completo desenvolvimento fetal (Tate, 2012b; Widmaier *et al.*, 2014).

À medida que o processo de clivagem continua, o número de blastómeros vai aumentando exponencialmente, originando uma estrutura de cerca de 16 a 32 células, que começam a compactar, estabelecendo junções entre si. A compactação permite que os blastómeros comuniquem entre si, sendo que os limites celulares tornam-se indistintos, originando a mórula (4º Dia) (Elder e Dale, 2011; Guyton e Hall, 2016c). A

partir desta fase, começa a formar-se uma cavidade cheia de fluido, o blastocélio, as células perdem a totipotência e começam a diferenciar-se, formando o blastocisto (5<sup>o</sup> Dia) (Jones e Lopez, 2014; Tate, 2012b). O blastocisto é constituído pela trofoectoderme, camada única de células que se dispõe em torno da estrutura embrionária, e a massa celular interna, que constitui um conjunto denso de células acumuladas num dos polos (Jones e Lopez, 2014; Tate, 2012b; Widmaier *et al.*, 2014). Na sequência do desenvolvimento embrionário, a massa celular interna irá dar origem ao feto e a trofoectoderme fará parte da placenta, estando, portanto, envolvida na nutrição e secreção hormonal essenciais para o desenvolvimento fetal (Fox, 2011; Widmaier *et al.*, 2014).

Ao longo do desenvolvimento embrionário, desde o zigoto inicial até à fase de blastocisto, o embrião vai sendo transportado ao longo das trompas de Falópio em direção ao útero. Este transporte é mediado por um fluxo de secreções epiteliais e pelo movimento ciliar do epitélio que reveste as trompas de Falópio, auxiliado por leves contrações musculares destas estruturas (Guyton e Hall, 2016c). Durante aproximadamente 3 a 4 dias após a ovulação, a porção altamente musculada das trompas de Falópio, o Istmo, encontra-se contraída, impedindo a passagem precoce do embrião em desenvolvimento para o útero (Guyton e Hall, 2016c). Durante o tempo de permanência nas trompas de Falópio, o embrião é nutrido pelas grandes quantidades de secreções que aí se encontram (Guyton e Hall, 2016c). O rápido aumento dos níveis de secreção de progesterona pelo corpo lúteo vai promover o relaxamento das células de músculo liso do istmo, permitindo que a mórula entre no útero (Guyton e Hall, 2016c; Sherwood, 2016).

Quando o embrião atinge o útero, este geralmente permanece na cavidade uterina durante um a três dias, sendo nutrido pelas secreções endometriais e aumentando progressivamente as suas dimensões (Guyton e Hall, 2016c). Assim, a implantação do embrião no endométrio ocorre por volta do sétimo dia após a ovulação (Tate, 2012b; Widmaier *et al.*, 2014). À medida que o embrião aumenta de tamanho, a zona pelúcida vai-se tornando mais fina e, na presença de enzimas proteolíticas, ocorre a eclosão do blastocisto (Elder e Dale, 2011; Jones e Lopez, 2014). Este processo vai permitir que as células da trofoectoderme possam entrar diretamente em contacto com o estrato funcional do endométrio, que nesta fase se encontra no pico de espessamento e secreção (Widmaier *et al.*, 2014).



**Figura 11** | Desenvolvimento e transporte embrionário desde a ovulação até à implantação. O óvulo é fertilizado na região da ampola, a partir do qual se inicia a fase de clivagem, adquirindo tipicamente 2 células (Dia 1), 4 células (Dia 2) e 8 células (Dia 3). Ao 4º dia, as células começam a compactar e forma-se a mórula com cerca de 16-32 células. Ao 5º dia, o embrião atinge a fase de blastocisto e vai implantar na parede do endométrio. (Adaptado de Tate, 2011b)

As células da trofoectoderme do embrião em desenvolvimento e, mais tarde, a placenta são responsáveis por produzir a hormona gonadotrofina coriónica humana (do Inglês *human Chorionic Gonadotropin*, hCG), que desempenha uma função semelhante à LH (Fox, 2011; Shier *et al.*, 2012b). Esta hormona vai ser responsável por manter o corpo lúteo funcional, permitindo a manutenção dos níveis de progesterona e estrogénio, que impedem a menstruação e interrompem o ciclo reprodutivo normal. Esta regulação irá promover a proliferação do endométrio, preparando-o para a implantação (Fox, 2011; Shier *et al.*, 2012b; Tate, 2012b).

A implantação depende de um complexo processo de intercomunicação de fatores parácrinos entre as células do embrião e as do endométrio (Widmaier *et al.*, 2014). A camada de trofoblastos que reveste a região da massa celular interna do blastocisto vai ser responsável por aderir ao endométrio da parede uterina, através de moléculas de adesão celular (Sherwood, 2016), posicionando assim a massa celular interna contra o endométrio (Fox, 2011; Widmaier *et al.*, 2014). O contacto inicial entre o blastocisto e o endométrio induz a rápida proliferação das células da trofoectoderme, que penetram entre as células do endométrio, segregando um conjunto de enzimas

proteolíticas responsáveis pela degradação da camada endometrial (Fox, 2011; Jones e Lopez, 2014; Widmaier *et al.*, 2014). À medida que o embrião vai penetrando na parede uterina, as células do endométrio vão também proliferar rapidamente, promovendo a nutrição do embrião (Guyton e Hall, 2016c). Em resposta a um mensageiro químico libertado pelo blastocisto, as células endometriais subjacentes segregam também prostaglandinas, que aumentam localmente a vascularização, assegurando a nutrição adequada para o correto desenvolvimento embrionário (Sherwood, 2016).

## 2. Infertilidade

Atualmente, um pouco por todo mundo, muitos casais têm sofrido com a ansiedade de não conseguirem formar uma família, apesar de nunca desistirem. Reconhecida como uma doença do sistema reprodutivo pela Organização Mundial de Saúde (OMS), a infertilidade é, então, caracterizada pela incapacidade de obter uma gravidez clínica após pelo menos 12 meses de relações sexuais regulares e desprotegidas (Zegers-Hochschild *et al.*, 2009). A infertilidade pode ser classificada como infertilidade primária, quando o casal nunca conseguiu uma concepção, ou infertilidade secundária, quando pelo menos um dos elementos do casal já alcançou uma gravidez anteriormente, mesmo que esta não tenha chegado a termo (Mascarenhas *et al.*, 2012). Esta distinção é essencial para que, em conjunto com a determinação dos fatores de infertilidade e diagnóstico completo do casal, se proceda a uma correta avaliação e aplicação de tratamentos de reprodução humana assistida (RHA).

O conceito de infertilidade não deve ser confundido com esterilidade, que é definida como a total incapacidade de gerar descendência por causa masculina ou feminina, derivada da completa ausência de gâmetas. Nestes casos, poderá aplicar-se também tratamentos de RHA, sendo, no entanto, indispensável recorrer a doação de gâmetas masculinos ou femininos, respetivamente. É também necessário ter em conta que, a fecundabilidade, ou seja, a capacidade de obter uma gravidez durante um ciclo menstrual, é de apenas 20%, mesmo em jovens casais, que não tenham diagnóstico de infertilidade ou subfertilidade.

Estima-se que cerca de 48,5 milhões de casais em todo mundo sejam inférteis, dos quais 19,2 milhões apresentam infertilidade primária e 29,3 milhões apresentam infertilidade secundária (Mascarenhas *et al.*, 2012). Em Portugal, 9 a 10% das mulheres apresentam fatores de infertilidade ao longo da vida, das quais por volta de 60% em idade reprodutora recorrem a consulta médica e apenas 25% são sujeitas a tratamentos de reprodução medicamente assistida. (Silva-Carvalho e Santos, 2009)

O estudo da infertilidade deve ter início após 1 ano de não concepção, no entanto, a avaliação e tratamento do casal deve ser antecipada para 6 meses após relações sexuais regulares e desprotegidas, quando haja um diagnóstico de patologias com implicação conhecida na fertilidade ou em casos em que o elemento feminino tenha mais de 35 anos (Bayer e Alper, 2012). É importante numa primeira consulta

avaliar a história reprodutiva de ambos os elementos do casal, nomeadamente a existência ou não de descendência, se estes apresentam historial de infertilidade prévia e qual a duração da infertilidade atual. Para além disso, é essencial ter em conta a frequência das relações sexuais, assim como fatores de risco de infertilidade, de modo a que o estudo do casal infértil seja o mais completo e elucidativo possível, para se proceder a uma correta abordagem clínica no âmbito dos Centros de Procriação Medicamente Assistida (PMA) (Kamel, 2010).

Atualmente, o estudo da infertilidade e o desenvolvimento de técnicas de RHA têm vindo a ser cada vez mais comuns e acessíveis à população em geral, conhecendo-se já vários fatores de risco associados ao desenvolvimento de infertilidade, sejam eles patológicos ou não patológicos.

## 2.1. Fatores de infertilidade

### 2.1.1. Fatores não patológicos

A **idade** é um fator determinante da capacidade de fertilidade de um casal, podendo afetar tanto o membro feminino como o masculino.

O pico de fertilidade feminina centra-se por volta dos 25 anos, sendo que a partir dos 35 anos há um declínio acentuado da capacidade de engravidar, cessando quando a mulher atinge a menopausa (Bayer, 2012a). Assim, mulheres no pico da fertilidade apresentam uma taxa de conceção de aproximadamente 85% após 1 ano de relações sexuais regulares e desprotegidas. No entanto, para os casais em que o parceiro do sexo feminino tem 35 anos, a taxa de conceção é consideravelmente inferior, de 60% ao fim de 1 ano (Bayer, 2012a; Greenhall e Vessey, 1990). Isto verifica-se porque, à medida que a mulher vai envelhecendo, o processo de atresia folicular é acelerado, levando a um decréscimo acentuado tanto do número, como da qualidade dos ovócitos (Bayer, 2012a). A baixa qualidade ovocitária reflete-se num aumento do risco de anomalias cromossómicas embrionárias com o avançar da idade materna, resultando num risco aumentado de morte fetal, aborto espontâneo e gravidez ectópica (Balasch, 2010; Bayer, 2012a; Ng e Ho, 2007; Sauer, 2015). Em muitas sociedades modernas, a proporção de mulheres que adiam a gravidez para além dos 35 anos, por razões sociais, tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas, contribuindo assim para um decréscimo da natalidade e um aumento da procura de tratamentos de infertilidade (Balasch, 2010).

A idade paterna é também um fator de infertilidade, embora não tão determinante como a idade materna. Parece claro que, apesar de se verificar algum declínio na fertilidade masculina com o avançar da idade, especialmente após os 45 anos, não existe, comprovadamente, uma idade absoluta a partir da qual os homens sejam incapazes de gerar descendência (Balasch, 2010). No entanto, tem sido demonstrado que com o avançar da idade, verificam-se alterações hormonais, disfunções sexuais e alterações na espermatogénese, resultando num volume reduzido de sémen, baixa motilidade e morfologia (Belloc *et al.*, 2014; Kidd *et al.*, 2001; Kühnert e Nieschlag, 2004) A idade paterna avançada está também associada a um aumento significativo na prevalência de anomalias genómicas e epigenéticas dos espermatozoides, acompanhada do aumento de stress oxidativo e, conseqüente, fragmentação do DNA, resultando em menores taxas de gravidez, aumento das taxas de aborto espontâneo e de malformações congénitas, independentes da idade materna (Belloc *et al.*, 2014; Das *et al.*, 2013; Robertshaw *et al.*, 2014).

A **frequência das relações sexuais** é também um importante fator para o sucesso da fertilização, sendo aconselhável que o casal tenha relações em dias alternados de modo a maximizar a probabilidade de gravidez e simultaneamente a qualidade espermática. Para além disso, o casal deve também ter em conta o espaço temporal do período fértil, que compreende o dia de ovulação e os 5 dias antecedentes (Damario, 2014).

O **excesso de peso** pode também ser um fator contributivo para uma diminuição da fertilidade. A acumulação de tecido adiposo poderá relacionar-se com alterações hormonais, uma vez que este tecido desempenha um importante papel no metabolismo de hormonas esteroides, afetando assim o equilíbrio hormonal relativamente a um indivíduo de índice de massa corporal (IMC) normal (Klenov e Jungheim, 2014). Esta condição afeta, conseqüentemente, a função reprodutora feminina, estando relacionada com alterações da composição do líquido folicular, metabolismo e função ovocitária, podendo, por conseguinte, pôr em causa o correto desenvolvimento folicular e a qualidade embrionária (Robker *et al.*, 2009; Valckx *et al.*, 2014). Para além disso, sabe-se que a obesidade feminina pode comprometer a recetividade endometrial, estando, portanto, associada a falhas de implantação, assim como ao risco aumentado de aborto espontâneo (Jungheim *et al.*, 2012). A obesidade masculina, por sua vez, caracteriza-se também por um perfil hormonal alterado, nomeadamente, com diminuição dos níveis circulantes de testosterona e gonadotrofinas (Hammoud *et al.*, 2012). Esta desregulação hormonal contribui para o desenvolvimento de disfunção sexual, associada à baixa concentração e motilidade

dos espermatozoides, com maturação e função alterada (Hammoud *et al.*, 2008; Shukla *et al.*, 2014). Foi também sugerido que a obesidade possa contribuir para o aumento da temperatura local dos testículos, afetando conseqüentemente as condições ideais de espermatogénese (Klenov e Jungheim, 2014).

O consumo de **tabaco**, para além de comprovadamente afetar a saúde geral de um indivíduo, tem também implicações na saúde reprodutiva. O cigarro contém componentes nocivos que podem influenciar negativamente a fertilidade feminina, ao nível da maturação folicular, do transporte de embriões, da recetividade e angiogénese endometrial, do fluxo sanguíneo uterino e do miométrio (Dechanet *et al.*, 2011). Desta forma, mulheres fumadoras ou sujeitas ao fumo do tabaco apresentam um risco aumentado de insuficiência ovárica, ciclos menstruais irregulares e dismenorreia, tal como maior risco de aborto espontâneo (Alvarez, 2015; Freour *et al.*, 2008). A maior preocupação relativa ao consumo de tabaco prende-se, no entanto, quando este acontece durante o período gestacional, sendo que vários efeitos adversos do desenvolvimento fetal foram já relatados (Hackshaw *et al.*, 2011), em particular com graves efeitos na função reprodutiva masculina de bebés de mães fumadoras (Kovac *et al.*, 2015; Sobinoff *et al.*, 2014). No homem, o consumo de tabaco prejudica a função erétil, assim como os parâmetros espermáticos e seminais, por acumulação de espécies reativas de oxigénio (ROS). Como resultado, há uma diminuição da concentração, motilidade, morfologia e vitalidade dos espermatozoides, e ainda da sua capacidade de fertilização (Gaur *et al.*, 2010; Harlev *et al.*, 2015; Murphy *et al.*, 2011). O stress oxidativo pode também provocar danos genéticos e epigenéticos nos gâmetas masculinos, que poderão ser a causa de uma maior incidência de aborto espontâneo (Alvarez, 2015; Harlev *et al.*, 2015; Kovac *et al.*, 2015).

O consumo excessivo de **álcool** tem também sido sugerido como um fator de risco de infertilidade. Na mulher, o álcool tem um efeito direto sobre o amadurecimento ovocitário, a ovulação e o desenvolvimento embrionário, resultando em maior risco de aborto espontâneo, baixas taxas de implantação e gravidez. (Homan *et al.*, 2007; Rooney e Domar, 2014; Wdowiak *et al.*, 2014). No homem, o consumo de álcool pode provocar patologia testicular e alterações dos parâmetros do esperma, nomeadamente, maior percentagem de espermatozoides morfologicamente anormais e diminuição do volume do líquido seminal (Gaur *et al.*, 2010). As alterações dos parâmetros do esperma são, frequentemente, associados à hipotestosteronemia, que resulta dos efeitos do etanol tanto no eixo hipotálamo-hipófise, como a nível testicular (La Vignera *et al.*, 2013). Em último caso, o consumo de álcool pode também provocar



a degeneração de células espermáticas nos tubos seminíferos, contribuindo para o risco de desenvolvimento de azoospermia (La Vignera *et al.*, 2013).

O consumo de elevadas quantidades de **caféina** foi também relacionado com uma diminuição da função reprodutora feminina, causada por alterações na ovulação e na função do corpo lúteo (Alvarez, 2015; Homan *et al.*, 2007). Este hábito pode também associar-se a fatores tubares, incluindo endometriose e aumento do risco de aborto espontâneo (Rooney e Domar, 2014).

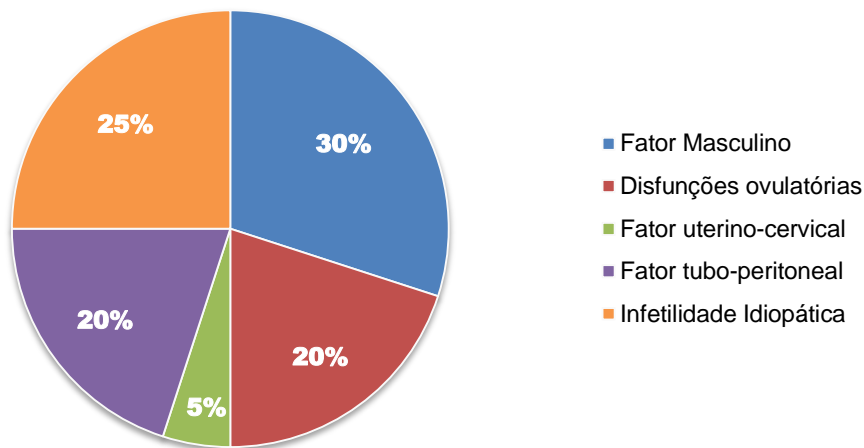
O uso de **drogas** parece ter um impacto negativo na fertilidade masculina e feminina. A marijuana, que é uma das drogas mais consumidas mundialmente, altera a função reprodutiva, diminuindo a espermatogénese, a qualidade espermática e afetando o equilíbrio hormonal tanto masculino, como feminino (Alvarez, 2015; Sharma *et al.*, 2013). O consumo de outra droga muito comum, a cocaína, põe em causa a fertilidade masculina, provocando a longo prazo disfunção erétil e diminuição dos níveis de testosterona, com consequente alteração da espermatogénese. Na mulher, a cocaína pode ter efeitos nefastos a nível da função ovárica (Fronczak *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2013). Outras drogas não ilícitas, tais como anti-hipertensivos, antiepiléticos, antidepressivos, entre outros, podem, igualmente, afetar a capacidade reprodutiva masculina e feminina, originando alterações dos parâmetros espermáticos e disfunções sexuais (Alvarez, 2015; Hayashi *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2013).

Acredita-se que o **stress** possa também ter implicações na fertilidade, embora seja difícil de determinar os mecanismos biológicos inerentes, muito devido à dificuldade da sua definição e avaliação pela comunidade científica. (Lynch *et al.*, 2014) Os próprios tratamentos de infertilidade ou o diagnóstico de infertilidade em si são motivos de stress e ansiedade no casal, e foram já relatados vários casos em que, nestas situações, há uma diminuição do sucesso dos tratamentos de RHA (Bayer, 2012a; Homan *et al.*, 2007). Situações de stress podem também ter impacto na espermatogénese, como resultado de alterações na secreção de testosterona (Nargund, 2015).

A **exposição ambiental ou associada à ocupação profissional** a produtos químicos e poluentes pode também afetar negativamente a fertilidade. Nomeadamente, a exposição a pesticidas, metais pesados, poluentes atmosféricos ou radiação levam à diminuição da qualidade dos parâmetros espermáticos, disrupções endócrinas e taxas de implantação reduzidas. A exposição a estes fatores durante o período gestacional pode também estar relacionada com alterações no desenvolvimento fetal (Sharma *et al.*, 2013).

### 2.1.2. Fatores Patológicos

Os fatores patológicos que afetam a fertilidade masculina ou feminina são todos aqueles que dizem respeito a anomalias anatómicas ou de função, que afetam o correto funcionamento do sistema reprodutor, a capacidade de fertilização ou o desenvolvimento de uma gravidez. Cerca de 30% das causas de infertilidade de um casal devem-se a fator masculino e 45 % a fator feminino, sendo os restantes 25% casos de infertilidade idiopática (Figura 12).



**Figura 12** | Distribuição dos fatores patológicos que afetam a fertilidade de um casal. (Adaptado de Bayer e Alper, 2012)

#### 2.1.2.1. Fator Masculino

Pelo menos 50% dos casais encaminhados para investigação e tratamento de infertilidade apresentam contribuição de fator masculino. Este, por si só, representa perto de 30% dos casos de infertilidade, sendo que os restantes casos resultam de infertilidade conjunta de ambos os elementos do casal (Agarwal *et al.*, 2015; Elder e Dale, 2011).

A infertilidade masculina pode ser causada por **disfunções sexuais ou ejaculatórias**, tais como disfunção erétil, ejaculação retrograda ou anejaculação e agenesia dos canais deferentes (Rizk *et al.*, 2008). As **lesões testiculares** são também causa de infertilidade, incluindo torção testicular, orquites, criptorquidismo,

varicocele ou mesmo anorquia (Rizk *et al.*, 2008). O varicocele é a causa mais frequente de infertilidade masculina, afetando cerca de 40% da população masculina infértil, que se caracteriza pela dilatação de uma veia escrotal ou testicular (Kupis *et al.*, 2015). Esta patologia resulta num aumento local da temperatura, afetando, conseqüentemente, o processo de espermatogénese. Para além disso, ocorre acumulação de stress oxidativo local, com conseqüente aumento da fragmentação de DNA espermático, causando a redução da capacidade de fertilização, concentração, motilidade e vitalidade (Blumer *et al.*, 2012; Walczak *et al.*, 2013).

Deve também ser tida em conta o historial clínico do paciente, nomeadamente, antecedentes cirúrgicos ou de doença pélvica e genital, historial de lesão testicular, doença endócrina, presença e tratamento de neoplasia ou infeções sexualmente transmissíveis (Karavolos *et al.*, 2013).

A infertilidade masculina pode também ser de **causa imunológica**, verificando-se a presença de anticorpos anti-espermatozoides, que resultam em aglutinação espermática, com comprometimento da motilidade (Rizk *et al.*, 2008). Alterações hormonais ou ainda causa genética podem estar na base da infertilidade masculina. Uma das **disfunções hormonais** mais determinantes da função reprodutora masculina é o hipogonadismo hipogonadotrófico congénito, frequentemente associado ao síndrome de Kallmann, que se caracteriza pela falta completa ou parcial de desenvolvimento sexual masculino, como conseqüência de defeitos na migração, síntese, secreção ou ação de GnRH (Fechner *et al.*, 2008; Rizk *et al.*, 2008). Os **fatores genéticos** incluem alterações cromossómicas, sendo as mais comuns o Síndrome de Klinefelter (cariótipo 47, XXY), caracterizado por azoospermia, associada a um hipogonadismo parcial com baixos níveis de testosterona (Maiburg *et al.*, 2012; Plotton *et al.*, 2014); e a Fibrose cística, representada pela ausência bilateral congénita de ductos deferentes e vesículas seminais, com conseqüente azoospermia obstrutiva (Ahmad *et al.*, 2013). Para além disso, microdeleções nas regiões dos fatores de azoospermia (do inglês *Azoospermia Factor*, AZF) do cromossoma Y comprometem também a infertilidade masculina, resultando em oligozoospermia grave ou azoospermia (Rizk *et al.*, 2008).

### 2.1.2.2. Fator Feminino

Um dos principais fatores de infertilidade associados ao elemento feminino do casal relaciona-se com **disfunções ovulatórias**. As disfunções ovulatórias são, normalmente, resultado de déficit hormonal, nomeadamente de gonadotrofinas, que afetam o correto ciclo menstrual, representadas por ciclos menstruais irregulares e anovulação (Blundell, 2007). Assim, os tratamentos dos problemas de disfunção ovulatória são, geralmente, determinados por administração de suplementos hormonais, que restabelecem os níveis de LH e FSH. O diagnóstico desta patologia deve ser efetuado por medição dos níveis de gonadotrofinas ao terceiro dia do ciclo (Bayer e Alper, 2012).

Uma das patologias mais comuns, relativamente a disfunções ovulatórias, é o Síndrome de Ovário Policístico (SOP), caracterizado por um quadro de hiperandrogenismo, anovulação e resistência à insulina (Rachoń e Teede, 2010). A oligomenorreia está, frequentemente, ligada a esta patologia, que se representa, em muitos casos, por excesso de peso ou obesidade. O risco de falha reprodutiva nestes casos não se deve unicamente a falhas na ovulação, mas também ao risco aumentado de parto prematuro, pré-eclampsia e diabetes gestacionais (Unuane *et al.*, 2011).

As disfunções ovulatórias incluem também, falência ovárica prematura, amenorreia hipotalâmica, hiperprolactinemia e anomalias da fase lútea.

A Falência Ovárica Prematura (FOP) define-se por amenorreia prematura, com idade inferior a 40 anos, que pode ser definida por ciclos menstruais irregulares e níveis de FSH elevados (Haller-Kikkatalo *et al.*, 2015; Webber *et al.*, 2016). Esta condição pode estar associada a fatores autoimunes ou genéticos, bem como a fatores iatrogénicos, como a ooforectomia unilateral, cistectomia, quimioterapia ou doenças sistémicas (Busacca *et al.*, 2006; Monnier-Barbarino *et al.*, 2005; Pouresmaeili e Fazeli, 2014).

A amenorreia hipotalâmica é a ausência de fluxo menstrual durante pelo menos 3 ciclos consecutivos, sem a evidência de anomalias anatómicas ou orgânicas (Fourman e Fazeli, 2015; Meczekalski *et al.*, 2014). É, assim, caracterizada por anovulação e ausência de desenvolvimento endometrial, como resultado de uma segregação anormal de GnRH e com consequente diminuição acentuada dos níveis de LH. Esta condição pode ser desencadeada, tipicamente, por déficit nutricional, stress ou exercício físico excessivo (Meczekalski *et al.*, 2014; Unuane *et al.*, 2011).

A hiperprolactinemia pode resultar da segregação excessiva de prolactina por prolactinomas, que são os adenomas pituitários mais comuns (Glezer e Bronstein, 2015; Unuane *et al.*, 2011). A prolactina aumenta também em situações fisiológicas, durante a gravidez, lactação e em situações de stress. No entanto, pode adquirir um contexto patológico com origem na compressão do infundíbulo, hipotireoidismo ou distúrbios renais (Capozzi *et al.*, 2015). Mulheres com esta patologia apresentam, normalmente, ciclos menstruais anormais, galactorreia, diminuição da libido ou dispareunia (Unuane *et al.*, 2011).

Anomalias da fase lútea são causa de infertilidade e abortos recorrentes, uma vez que se caracteriza por baixa segregação de progesterona nesta fase, que é insuficiente para o correto desenvolvimento do endométrio, afetando a implantação e a sua capacidade de suportar uma gravidez (Bayer e Alper, 2012).

Disfunções tiroideias e adernais podem também afetar a fertilidade feminina, como resultado da desregulação hormonal associada a estas patologias (Unuane *et al.*, 2011).

A infertilidade feminina pode ter também como causa **fatores tuboperitoneais**, que afetam aproximadamente 20% dos casais inférteis (Bayer e Alper, 2012). A origem mais frequente de lesão tubar é a doença inflamatória pélvica (DIP), resultante de infeção bacteriana do trato genital superior, maioritariamente, por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* (Abrao *et al.*, 2013; Gradison, 2012). Esta doença afeta, principalmente, mulheres jovens e sexualmente ativas, provocando cicatrização e conseqüente obstrução tubar, com aumento da probabilidade de desenvolvimento de infertilidade ou gravidez ectópica (Gradison, 2012; Haggerty *et al.*, 2010).

As lesões tubares podem também ser causadas por rutura do apêndice, uso de dispositivos intrauterinos (DIU), gravidez ectópica anterior, formação de adesões pós-cirúrgicas ou endometriose (Abrao *et al.*, 2013; Bayer e Alper, 2012). A endometriose é uma doença inflamatória benigna estrogénio-dependente, caracterizada pela presença de tecido endometrial ectópico (Macer e Taylor, 2012). Cerca de 25% a 50% das mulheres inférteis apresentam esta patologia (Buletti *et al.*, 2010), à qual se encontram associados sintomas como a dismenorreia, dor pélvica crónica, dispareunia, problemas intestinais, fadiga e infertilidade (Dunselman *et al.*, 2014). Esta patologia compromete a função tubária de transporte de gâmetas e embriões, assim como o desenvolvimento ovocitário e a ovulação, como resultado do ambiente inflamatório crónico peritoneal, alterações endócrinas, presença de tecido cicatricial e aderências

que podem distorcer a anatomia pélvica da mulher (Buletti *et al.*, 2010; Macer e Taylor, 2012). O diagnóstico de obstrução tubar deve ser realizado através de histerossalpingografia no início da fase folicular, após o final do fluxo menstrual, sendo que, no caso de endometriose, a laparoscopia pode ser particularmente aconselhada, no sentido de constituir também uma medida terapêutica, permitindo a remoção cirúrgica de tecido endometrial ectópico (Bayer e Alper, 2012; Macer e Taylor, 2012).

A cavidade uterina pode também apresentar anomalias estruturais, quer de origem congénita quer adquirida, constituindo no seu conjunto **fatores uterinos** que contribuem para a infertilidade (Abrao *et al.*, 2013). A malformação uterina congénita mais comum é o útero septado, que está ligado a taxas elevadas de aborto recorrente, parto prematuro, anomalias fetais e infertilidade (Abrao *et al.*, 2013; Hassan *et al.*, 2010). A presença de miomas ou aderências intrauterinas podem também ter impacto na fertilidade, por obstruir a passagem dos espermatozoides e dificultar a implantação do embrião no endométrio (Bayer e Alper, 2012).

Também **fatores cervicais** afetam a fertilidade feminina, representando menos de 5% das causas de infertilidade. Uma vez que o muco cervical desempenha um importante papel na passagem dos espermatozoides para a cavidade uterina, apresentando condições ótimas no período da ovulação, quando a sua produção é inadequada, os espermatozoides são retidos nesta barreira, impedindo a fertilização. A produção e as características do muco podem ser alteradas em mulheres sujeitas a cirurgia de alta frequência (CAF) ou cirurgia ablativa do colo do útero, assim como após o uso de determinados lubrificantes na relação sexual. A avaliação do fator cervical pode ser auxiliada por um teste pós-coital, que avalia a qualidade do muco cervical e a quantidade de espermatozoides capazes de o penetrar (Bayer e Alper, 2012).

A infertilidade pode também dever-se a **fatores genéticos**, nomeadamente alterações cromossómicas, tal como o Síndrome de Turner (cariótipo 45, X). Mulheres com este cariótipo apresentam caracteristicamente falência ovárica prematura, ocorrendo, em muitos casos, ainda antes da puberdade (Grynberg *et al.*, 2016; Reindollar, 2011). Esta condição determina uma taxa elevada de infertilidade nestas mulheres, embora em raros casos possa ser possível uma gravidez espontânea (Bernard *et al.*, 2016). No entanto, quer a gravidez seja espontânea ou recorrendo a técnicas de reprodução humana assistida, há um elevado risco de abortos recorrentes e de complicação da saúde materna durante o período gestacional (Karnis, 2012).

## 2.2. Infertilidade Idiopática

A infertilidade de um casal pode, em certos casos, não ter um diagnóstico específico, não se encontrando uma causa aparente, seja ela feminina ou masculina, para o problema de fertilidade. Nestes casos, o casal apresenta o diagnóstico de infertilidade idiopática, ou seja, de causa desconhecida. Apesar dos avanços das técnicas de diagnóstico das causas de infertilidade, cerca de 25% dos casais inférteis têm infertilidade idiopática (Bayer e Alper, 2012).

Atualmente, acredita-se que estes casos possam resultar de fatores moleculares envolventes, essencialmente, no processo de fertilização, podendo estar associada a uma incompatibilidade de casal. A infertilidade sem causa conhecida está muitas vezes relacionada com a idade avançada dos elementos do casal que, embora se saiba ser um fator determinante da fertilidade, não é facilmente diagnosticada a causa exata. Nestes casos, é comum verificar-se uma falha na reação acrossómica ou ligação dos espermatozoides à zona pelúcida, assim como alterações ovocitárias ou na motilidade tubária, entre outros fatores, que não são detetados pelos testes de diagnóstico padrão (Ray *et al.*, 2012; Rizk *et al.*, 2008; Somigliana *et al.*, 2016).

A infertilidade idiopática é, portanto, um diagnóstico de exclusão, uma vez que resulta da falta de eficácia da avaliação médica do casal. Assim, é essencial desenvolver e tornar acessíveis novos métodos de diagnóstico quando, com base no procedimento padrão, não é possível diagnosticar corretamente o fator de infertilidade.

# Capítulo II

---

Técnicas de Reprodução Humana  
Assistida





## 3. Recolha, avaliação e processamento de gâmetas masculinos

No sentido de melhorar o sucesso das técnicas de RHA, vários têm sido os progressos no âmbito dos métodos de recolha, análise e processamento dos gâmetas masculinos. Esta evolução permitiu não só a melhoria das técnicas de RHA, como o acesso às mesmas por parte de pacientes com fator de infertilidade masculino severo, que de outra forma não teriam a capacidade de gerar descendência.

Assim, uma detalhada análise da qualidade e função espermática é importante para determinar um possível diagnóstico de infertilidade e consequentemente definir a estratégia de tratamento adequada. No entanto, é necessário ter em conta que a qualidade da amostra seminal recolhida para análise ou técnicas de RHA depende de vários fatores, nomeadamente da atividade das glândulas anexas, do período de abstinência, da completa colheita da amostra e do volume testicular (World Health Organization, 2010).

O fluido seminal, à semelhança de qualquer fluido corporal humano, é potencialmente infeccioso, podendo estar contaminado com microrganismos tais como o vírus da imunodeficiência humana (VIH), os vírus da hepatite B e C (VHB e VHC) ou o vírus *herpes simplex*. Assim, todas as amostras biológicas devem ser tratadas como risco biológico e, consequentemente, manuseadas com especial cuidado (World Health Organization, 2010).

### 3.1. Métodos de colheita de gâmetas masculinos

O principal método de colheita de espermatozoides é a masturbação, sempre que esta é possível. Neste caso, a amostra deve ser colhida numa sala privada perto do laboratório, à temperatura ambiente, de modo a limitar a exposição do esperma a flutuações de temperatura e a controlar o tempo entre a recolha e a análise. A amostra deve ser recolhida após um período mínimo de 2 dias e um máximo de 7 dias de abstinência sexual, devendo ser obtida por masturbação e ejaculada para um recipiente limpo e comprovadamente não tóxico para os espermatozoides (World Health Organization, 2010).

Em circunstâncias excepcionais, a colheita da amostra pode ser também feita em casa, sendo que deve ser entregue no laboratório até 1 hora após a colheita. Durante o transporte para o laboratório, a amostra deverá ser mantida entre 20 °C e 37 °C, de modo a não afetar a qualidade dos parâmetros espermáticos (World Health Organization, 2010)

O tempo de abstinência é essencial para a qualidade espermática, uma vez que, após ejaculação, alguns espermatozoides permanecem ainda no epidídimo, aos quais se vão acumulando novos espermatozoides, na ausência de ejaculações subsequentes. Estes vão perdendo qualidade ao longo do tempo, pelo que quanto maior o período de abstinência, mais as características do esperma serão afetadas, nomeadamente a sua motilidade (Silverberg e Turner, 2012; World Health Organization, 2010). Por outro lado, um curto período de tempo pode afetar negativamente o volume de fluido seminal e a concentração de espermatozoides, embora possa melhorar a sua motilidade (Silverberg e Turner, 2012).

A porção inicial de sémen expelido aquando da ejaculação é rico em espermatozoides e fluidos prostáticos, enquanto as porções seguintes são principalmente fluidos das vesículas seminais, apresentando, portanto, uma concentração de espermatozoides muito inferior ao que na realidade o indivíduo é capaz de produzir. Assim, é essencial informar que toda a amostra deve ser colhida e caso haja perda de amostra durante a colheita, esta deve ser mencionada, principalmente caso se trate da primeira porção (World Health Organization, 2010).

Quando há incapacidade de obter a amostra por masturbação é também possível fazer a colheita recorrendo a um preservativo não tóxico, sem espermicidas, especialmente desenhado para a recolha de esperma, durante a relação sexual (NAFA e ESHRE-SIGA, 2002). Os preservativos de látex comuns não podem ser utilizados para a colheita de esperma, uma vez que contêm substâncias nocivas que interferem com a motilidade dos espermatozoides (World Health Organization, 2010). Também o coito interrompido não é um método aceitável para a colheita de espermatozoides, devido ao risco de contaminação bacteriana e perda da primeira fração de ejaculado (Silverberg e Turner, 2012; World Health Organization, 2010).

Em casos em que não seja possível obter uma amostra de esperma para avaliação, pode recorrer-se ao teste pós-coital para obter algumas informações relativamente à qualidade espermática, embora nestes casos as técnicas de RHA com utilização de amostra espermática a fresco não sejam uma opção (World Health Organization, 2010).

### 3.1.1. Outros métodos de colheita para tratamentos de RHA

Nos casos de azoospermia obstrutiva e não obstrutiva, a recolha de uma amostra por masturbação não é possível, pelo que é necessário recorrer a métodos de colheita cirúrgicos.

Em casos de azoospermia obstrutiva, várias técnicas de recolha de espermatozoides têm sido desenvolvidas entre elas a recolha diretamente dos vasos deferentes, através da técnica de MVSA (do Inglês *Microscopic Vasal Sperm Aspiration*) e PVSA (do Inglês *Percutaneous Vasal Sperm Aspiration*), ou ainda do epidídimo recorrendo às técnicas de MESA (do Inglês *Microscopic Epididymal Sperm Aspiration*) e PESA (do Inglês *Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration*). Em ambos os casos, as técnicas percutâneas permitem a recolha de espermatozoides sem manipulação invasiva, enquanto as técnicas microscópicas pressupõem a realização de uma pequena incisão que permita manipular diretamente os ductos (Shin e Turek, 2013).

A principal vantagem da extração de espermatozoides dos vasos deferentes é a maior maturidade da colheita, uma vez que os espermatozoides presentes nestas estruturas, já completaram, teoricamente, todo o processo de maturação após passagem pelo epidídimo (Shin e Turek, 2013). No entanto, estas técnicas não permitem, na maioria dos casos, obter um número aceitável de espermatozoides, pelo que foram progressivamente substituídas pelas técnicas de recolha através do epidídimo.

A técnica de MESA, embora mais eficaz, é muito demorada e dispendiosa, pelo que recorrentemente se passou a utilizar à técnica de PESA. No entanto, esta, por seu lado, apresenta também como desvantagem um risco aumentado de lesões do epidídimo, devendo a sua utilização ser bem estudada (Leung *et al.*, 2014).

Quando a recolha de espermatozoides não é conseguida através destas técnicas, pode recolher-se diretamente à aspiração de espermatozoides do testículo pela técnica de TESA (do Inglês *Testicular Sperm Aspiration*). No entanto, tal como todas as técnicas aspirativas, a TESA tem como desvantagem os efeitos nefastos da pressão exercida para a aspiração dos espermatozoides, tornando-a menos aconselhável para recolha de gâmetas masculinos para técnicas de RHA (Leung *et al.*, 2014).

Assim, foi desenvolvida a técnica de extração de espermatozoides do testículo, a TESE (do Inglês *Testicular Sperm Extraction*), que pode também ser aplicada a pacientes com azoospermia não obstrutiva (Bernie *et al.*, 2015). Esta técnica consiste na realização de uma pequena incisão no escroto, que permite expor o testículo, do qual são biopsiados vários fragmentos de tecido. O risco de lesões testiculares, assim como o baixo número de espermatozoides recolhidos através deste procedimento, levou ao desenvolvimento de uma outra técnica de recolha, a micro-TESE (do Inglês *Microdissection Testicular Sperm Extraction*) (Bernie *et al.*, 2015). Esta envolve a utilização de um microscópio para ajudar a identificar os túbulos seminíferos que aparentam conter um maior número de células germinativas, permitindo obter resultados mais favoráveis (Leung *et al.*, 2014).

As técnicas cirúrgicas de recolha de espermatozoides podem também ser úteis em casos de disfunção ejaculatória, sem obstrução física, tal como acontece em pacientes com lesão medular, esclerose múltipla ou diabetes *mellitus*. Alternativamente, é possível recorrer a métodos de ejaculação assistida, como a eletroejaculação com sonda retal e a estimulação vibratória peniana. Estes são métodos não-evasivos e que permitem a recolha de amostras espermáticas de elevada qualidade, quando estas patologias não se encontram associadas a nenhum fator de infertilidade (Ibrahim *et al.*, 2016; Shin e Turek, 2013).

### 3.2. Espermograma

O estudo do fator masculino deve ser iniciado por um exame citomorfobioquímico do esperma, ou espermograma, que pertence avaliar a qualidade do fluido seminal e determinar um possível diagnóstico de infertilidade. Este exame consiste na avaliação de diversos parâmetros de qualidade espermática de uma amostra de esperma colhida para o efeito, sendo avaliados parâmetros macroscópicos e microscópicos. A análise macroscópica inclui a avaliação da liquefação, pH, volume, viscosidade, aparência visual e cheiro, enquanto o exame microscópico avalia a motilidade, vitalidade, morfologia, concentração de espermatozoides e a presença de aglutinação ou de células não espermáticas, tais como leucócitos e células germinativas imaturas.

É de notar que a avaliação de apenas uma amostra de espermatozoides não é suficiente para determinar inequivocamente a qualidade espermática de um homem, dado que esta varia consideravelmente em concentração e número ao longo do tempo (World Health Organization, 2010).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) desenvolveu, assim, um conjunto de normas para uniformização da análise da amostra seminal e estabeleceu valores de referência para os parâmetros espermáticos avaliados (Tabela 1).

**Tabela 11** | Valores mínimos de referência estabelecidos pela OMS para os parâmetros de avaliação da qualidade da amostra espermática. (Adaptado de World Health Organization, 2010)

Parâmetro	Valor mínimo de referência
Liquefação	Completa aos 60 minutos
pH	7,2
Volume	1,5 mL
Concentração	$15 \times 10^6$ epz / mL
Nº total de espermatozoides	$38 \times 10^6$ epz / ejaculado
Motilidade total (% <i>in situ</i> e progressiva)	40%
Motilidade progressiva (% lenta e rápida)	32%
Vitalidade (% epz vivos)	58%
Morfologia (% epz normais)	4%
Leucócitos	$< 1 \times 10^6$ leucócitos/mL
Células germinativas imaturas	$< 3$ células / 100 epz
Aglutinação	Ausente

Como resultado, foi também proposta terminologia específica para o diagnóstico espermático, tendo em conta os resultados da qualidade dos diferentes parâmetros (Tabela 2).

**Tabela 12** | Terminologia utilizada para classificar as amostras seminais consoante a qualidade dos seus parâmetros espermáticos. VR - Valor de Referência. (Adaptado de World Health Organization, 2010)

Terminologia	Descrição da qualidade espermática
Normozoospermia	Parâmetros espermáticos normais acima dos valores mínimos de referência
Oligozoospermia	Concentração de espermatozoides inferior ao VR
Criptozoospermia	Ausência de espermatozoides a fresco, mas observados após centrifugação
Azoospermia	Ausência de espermatozoides no ejaculado
Astenozoospermia	Motilidade progressiva inferior ao VR
Teratozoospermia	Morfologia normal inferior ao VR
Necrozoospermia	Vitalidade reduzida e imobilidade aumentada
Hipospermia	Volume de ejaculado reduzido
Aspermia	Ausência de ejaculado
Hematospermia	Presença de eritrócitos no ejaculado
Leucocitospermia	Presença de leucócitos superior ao VR

Para realizar o espermograma, após colheita da amostra espermática por masturbação, o frasco de produtos biológicos deve ser colocado na estufa, de modo a manter uma temperatura adequada até completa liquefação da amostra. Quando é iniciado o estudo citomorfobioquímico do esperma, a amostra é retirada da estufa e colocada numa placa de aquecimento, a 37°C, onde deve permanecer até ao final da avaliação. Isto permite que a amostra mantenha uma temperatura estável ao longo da análise, de modo a que a qualidade dos parâmetros avaliados não seja afetada (Elder e Dale, 2011; World Health Organization, 2010).

### 3.2.1. Caraterísticas macroscópicas

#### 3.2.1.1. Liquefação

A liquefação é um processo natural pelo qual a amostra de esperma se torna fluída e homogénea por ação de enzimas fibrinolíticas, que atuam para desfazer o coágulo inicial que é formado assim que se dá a ejaculação, como resultado da presença da enzima vesiculase (Jones e Lopez, 2014). Este processo é essencial para que os espermatozoides possam progredir livremente no trato feminino e atingir o ovócito. Em condições normais, a liquefação ocorre cerca de 15 a 20 minutos após a ejaculação, não devendo, no entanto, ultrapassar os 60 minutos (World Health Organization, 2010). Esta alteração pode ser avaliada tanto macroscopicamente, sendo que a amostra se torna visualmente mais fluída e clarificada quando liquefeita, como microscopicamente, verificando-se um aspeto homogéneo do fluido, sem retenção dos espermatozoides.

Algumas amostras de esperma normais liquefeitas podem conter pequenos grânulos de aspeto gelatinoso, que não liquefazem, mas que não parecem apresentar qualquer significado clínico (World Health Organization, 2010).

#### 3.2.1.2. pH

O pH do esperma é essencial para manter a qualidade e vitalidade espermática e resulta do equilíbrio entre as secreções das glândulas acessórias, nomeadamente, as secreções alcalinas das vesículas seminais e as secreções ácidas da próstata (Jones e Lopez, 2014). Assim, o valor de referência de pH ronda os 7,2 para uma amostra de esperma normal, sendo que baixos valores de pH podem dever-se à obstrução do ducto ejaculatório ou à ausência congénita bilateral dos vasos deferentes (World Health Organization, 2010).

O pH deve ser medido, após a liquefação, recorrendo a uma fita indicadora de pH, preferencialmente, 30 minutos após ejaculação, nunca excedendo 1 hora, uma vez que o seu valor pode ser influenciado pela perda de CO<sub>2</sub> que ocorre após a recolha da amostra (World Health Organization, 2010).



### 3.2.1.3. Volume

A medição do volume é essencial na avaliação da amostra de esperma, permitindo determinar o número total de espermatozoides e outros tipos celulares no ejaculado. O volume da amostra de esperma depende, principalmente, da contribuição das secreções prostáticas e das vesículas seminais, com uma pequena contribuição das glândulas bulbouretrais e do epidídimo (Jones e Lopez, 2014).

O volume pode ser medido recorrendo a uma pipeta graduada, não devendo ser inferior a 1,5mL (Silverberg e Turner, 2012; World Health Organization, 2010). Uma amostra com um baixo volume pode indicar obstrução do ducto ejaculatório, ausência congênita bilateral dos vasos deferentes, associada a vesículas seminais pouco desenvolvidas, ejaculação retrógrada parcial, deficiência androgénica ou perda de amostra durante a colheita. Por outro lado, uma amostra com um volume elevado pode refletir exsudação ativa em casos de inflamação das glândulas acessórias (World Health Organization, 2010).

### 3.2.1.4. Viscosidade

A viscosidade de uma amostra pode interferir na capacidade de progressão dos espermatozoides, sendo, portanto, um importante parâmetro de determinação da qualidade espermática (World Health Organization, 2010). A sua avaliação é realizada recorrendo à aspiração da amostra com o auxílio de uma pipeta de vidro e deixando a amostra cair por gravidade. Uma amostra normal deve cair da pipeta em gotas, no entanto, quando a viscosidade é aumentada irá cair em fio, tanto maior quanto maior a viscosidade (NAFA e ESHRE-SIGA, 2002; World Health Organization, 2010).

### 3.2.1.5. Aparência visual

Uma amostra de esperma normal e liquefeita deve apresentar uma aparência homogénea e opaca, sendo que quando a concentração de esperma é muito baixa a amostra pode apresentar-se mais translúcida. Uma amostra de esperma normal apresenta uma cor branco acinzentado, contudo esta pode ser afetada pela presença de glóbulos vermelhos (hematospermia), adquirindo uma cor vermelho-acastanhado. Em casos de icterícia ou como resultado da ingestão de determinadas vitaminas e

medicamentos, o fluido seminal pode apresentar uma cor amarela (World Health Organization, 2010).

#### 3.2.1.6. Cheiro

O fluido seminal apresenta um cheiro tipicamente *sui generis*, que pode ser modificado pela presença de urina na amostra, tornando-se bastante intenso. Qualquer alteração do cheiro é facilmente detetado aquando da avaliação da amostra espermática (Jeyendran, 2003; NAFA e ESHRE-SIGA, 2002).

### 3.2.2. Características microscópicas

O estudo da amostra espermática deve ser iniciado pela avaliação da motilidade e vitalidade, o mais rapidamente possível, assim que se encontre liquefeita. A avaliação destes parâmetros deve ser realizada, preferencialmente, até 30 minutos após a ejaculação, nunca ultrapassando 1 hora, para evitar perda de função e qualidade da amostra que se verifica como resultado da desidratação, oscilações de temperatura ou pH (World Health Organization, 2010).

Antes de cada análise, a amostra deve ser homogeneizada, de modo a que cada alíquota retirada seja representativa da totalidade do fluido seminal.

#### 3.2.2.1. Motilidade

A motilidade é um dos parâmetros mais importantes para avaliar a qualidade do esperma, uma vez que traduz a capacidade dos espermatozoides atravessarem todo o trato feminino, até atingirem o ovócito e penetrarem nas suas camadas envolventes, como a coroa radiata e a zona pelúcida.

Os espermatozoides podem ser classificados, quanto à sua motilidade, em 4 categorias: imóveis, quando o espermatozoides não apresentam qualquer movimento; móveis *in situ*, quando há movimento flagelar mas o espermatozoide não progride; móveis progressivos lentos, quando há movimento flagelar com progressão não superior a 25  $\mu\text{m}/\text{segundo}$  a 37°C e móveis progressivos rápidos, quando há movimento flagelar com progressão superior a 25  $\mu\text{m}/\text{segundo}$  a 37°C e trajetória linear (NAFA e ESHRE-SIGA, 2002).

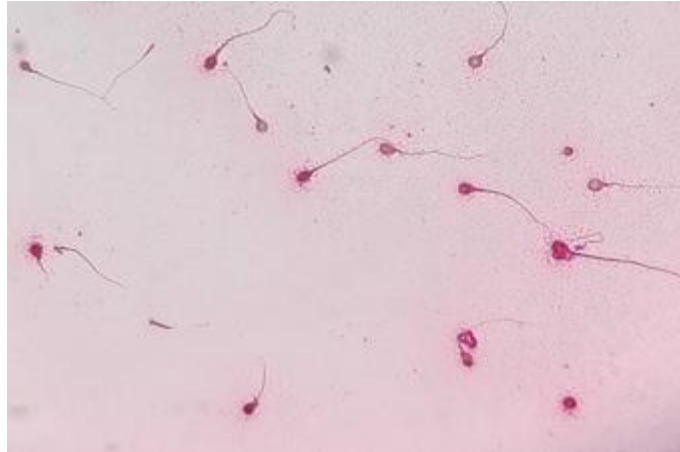
Atualmente, a OMS defende a classificação da motilidade dos espermatozoides em apenas 3 categorias (nula, *in situ* e progressiva), por defender que a classificação de espermatozoides em progressivos rápidos e lentos é de difícil distinção para os técnicos de laboratório (World Health Organization, 2010). No entanto, a classificação das 4 categorias parece continuar a ser mais aconselhável, uma vez que permite prever com maior exatidão a capacidade de fecundação e qualidade da amostra, dado que os espermatozoides progressivos rápidos serão aqueles com maior capacidade de penetração da zona pelúcida e, conseqüente, fecundação.

Para avaliar a motilidade de uma amostra procede-se à recolha de uma alíquota de esperma, cerca de 10  $\mu\text{L}$ , que é colocada numa lâmina de vidro, posteriormente coberta com uma lamela (22 x 22 mm). A amostra é observada ao microscópio ótico a uma ampliação de 400x, procedendo-se à contagem diferencial dos espermatozoides por categoria. Sempre que possível, são contados um mínimo de 200 espermatozoides completos (contendo cabeça, peça intermédia e cauda), a uma distância de pelo menos 5mm das bordas da lamela, de modo a evitar os efeitos deletérios da secagem, e evitando a proximidade de bolhas de ar. A escolha do campo de observação deve ser aleatória e devem ser contados pelo menos 5 campos de observação distintos, de modo a obter uma contagem o mais representativa possível da amostra. A contagem deve ser rápida para que não se sobrestime o número de espermatozoides progressivos relativamente às restantes categorias e o procedimento é repetido até que sejam encontradas duas réplicas concordantes, segundo os parâmetros da OMS (World Health Organization, 2010). O resultado final de cada categoria é expresso em percentagem e deve refletir a média das duas contagens concordantes. O limite de referência mínimo para o total de motilidade (*in situ* e progressiva) é de 40%, enquanto o de motilidade progressiva (lenta e rápida) é de 32% (World Health Organization, 2010).

#### 3.2.2.2. Vitalidade

A vitalidade pode ser avaliada com base no pressuposto da integridade de membranas, recorrendo-se para tal ao **teste de coloração com eosina Y**. Assim, espermatozoides com membrana citoplasmática intacta não irão permitir a entrada de corante, mantendo-se incolores. Pelo contrário, espermatozoides com danos membranares serão impregnados com eosina Y, que se fixará no citoplasma, adquirindo uma cor rosa (Silverberg e Turner, 2012; World Health Organization, 2010).

Para tal, a 10  $\mu$ L de amostra de espermatozoides são adicionados 10  $\mu$ L de corante, numa solução final de diluição 1:2, deixando-se atuar por 5 minutos. Posteriormente, é recolhida uma alíquota da solução, com a qual é preparado um esfregaço, sendo observado ao microscópio ótico, a uma ampliação de 400x, em contraste de fase negativo, que permite discernir com maior facilidade os espermatozoides corados de rosa (Figura 13). Sempre que possível, são contados diferencialmente 200 espermatozoides completos.



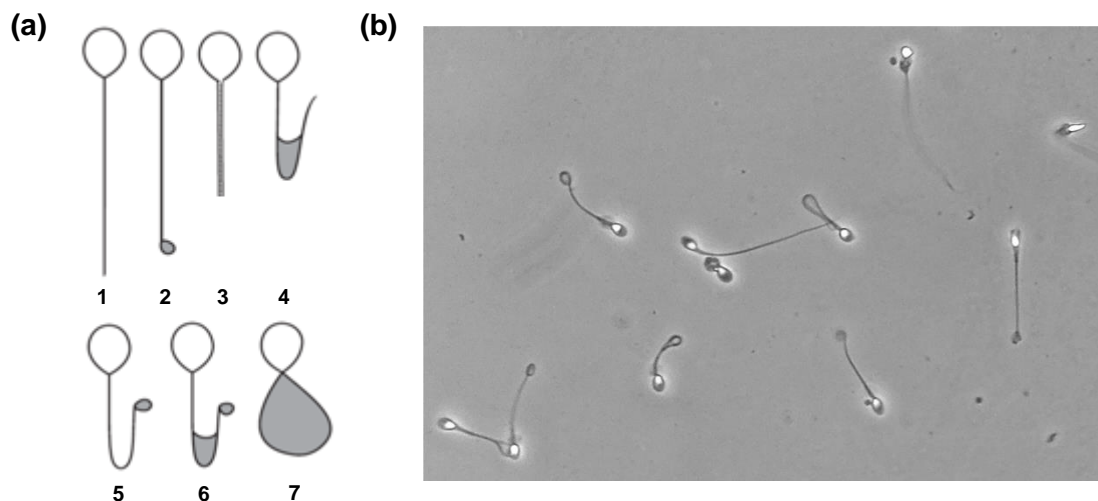
**Figura 13** | Imagem microscópica de espermatozoides sujeitos ao teste de vitalidade com corante de eosina. Os espermatozoides com membrana intacta, considerados vivos, não permitem a penetração do corante e mantêm-se incolores. Os espermatozoides que permitem a penetração do corante apresentam uma coloração rosa e são considerados mortos.

O teste de hipoosmolaridade pode também ser utilizado para avaliar a vitalidade de uma amostra. Este teste baseia-se no pressuposto de que espermatozoides com membranas intactas irão reagir, em ambiente hipoosmótico, resultando em alterações da cauda (Figura 14a). Assim espermatozoides vivos e reativos irão apresentar cauda enrolada, enquanto espermatozoides não reativos e mortos mantêm a sua cauda intacta (Silverberg e Turner, 2012). Este é, portanto, um parâmetro de avaliação complementar ao da vitalidade, esperando-se valores semelhantes, mas nunca superiores (World Health Organization, 2010).

O teste de hipoosmolaridade pode também constituir uma alternativa na seleção de espermatozoides viáveis, para tratamentos de RHA como a ICSI, sendo que a coloração com eosina Y deve ser evitada, por apresentar toxicidade para os espermatozoides (World Health Organization, 2010).

Neste teste, são incubados 10  $\mu$ L de amostra de espermatozoides com 90  $\mu$ L de solução hipoosmótica, numa solução final de diluição 1:10 durante 30 minutos a 35°C,

para que todas as formas flagelares sejam estabilizadas (World Health Organization, 2010). Após incubação, é retirada uma alíquota da solução que é avaliada ao microscópio ótico, a uma ampliação de 400x. Sempre que possível, são contados diferencialmente 200 espermatozoides completos, considerando-se que são reativos todos aqueles que apresentarem alterações flagelares (Figura 14b).



**Figura 14** | Imagens exemplificativas de alterações flagelares após teste de hipoosmolaridade. (a) Imagens esquemáticas de espermatozoides sem (1) e com vários tipos de alterações flagelares (2 a 7) (Adaptado de World Health Organization, 2010); (b) Imagem microscópica de espermatozoides sujeitos ao teste de hipoosmolaridade. Os espermatozoides com membrana intacta são todos aqueles que apresentam a cauda enrolada. Os espermatozoides não reativos e mortos mantêm a cauda inalterada.

A vitalidade da amostra é calculada e apresentada em percentagem, não devendo ser inferior a 58%, para que a amostra de esperma seja considerada normal, no que diz respeito a este parâmetro (World Health Organization, 2010).

O resultado da avaliação da vitalidade pode também funcionar como confirmação da avaliação da motilidade, uma vez que a quantidade de espermatozoides mortos não pode ser superior à de imóveis, embora seja recorrentemente inferior. Esta é uma importante relação, dado que uma amostra com grande percentagem de imobilidade pode não corresponder a uma amostra de baixa vitalidade, sendo uma informação importante para a utilização dos espermatozoides para técnicas de RHA. A presença de uma grande proporção de células vivas, mas imóveis pode ser indicativa de defeitos estruturais no flagelo, enquanto uma elevada percentagem de espermatozoides imóveis e não viáveis (necrozoospermia) pode indicar uma patologia do epidídimo (World Health Organization, 2010).

### 3.2.2.3. Concentração

A concentração de espermatozoides de uma amostra pode ser um fator preditivo da capacidade de concepção, estando diretamente relacionada com as taxas de gravidez (World Health Organization, 2010). Sabe-se que o número de espermatozoides no ejaculado, num homem normal sem fator de infertilidade e com o período de abstinência recomendado, relaciona-se com o volume testicular, pelo que quanto maior o testículo maior será a concentração espermática (World Health Organization, 2010).

Para determinar a concentração de uma amostra de esperma, é preparada uma diluição da amostra com uma solução fixadora de hidrogenocarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) e formaldeído ( $\text{H}_2\text{CO}$ ). A diluição adequada da amostra deve ser determinada durante a avaliação microscópica inicial e depende do número médio de espermatozoides visualizados por cada campo de observação (Tabela 3).

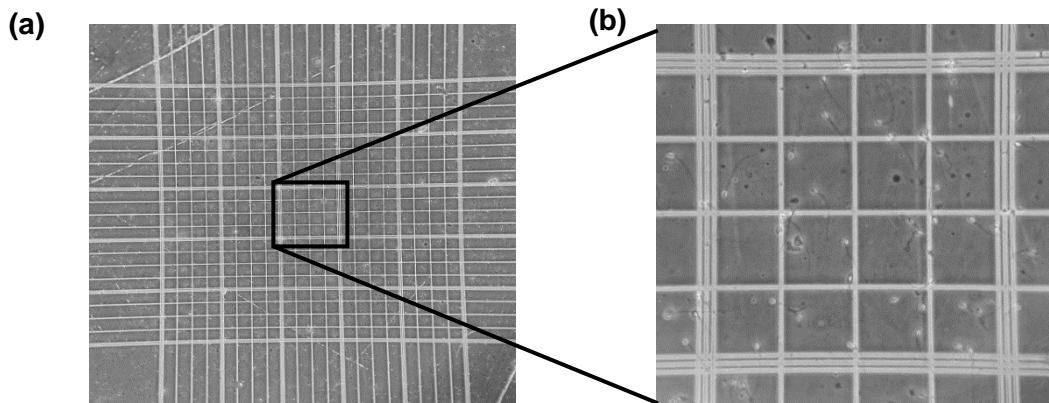
**Tabela 13** | Diluições adequadas em função do número de espermatozoides visualizados a fresco por cada campo de observação (ampliação de 400x) e respetivos volumes de amostra seminal e fixador. (Adaptado de (World Health Organization, 2010))

Nº de epz por campo (400X)	Diluição	Volume de amostra ( $\mu\text{L}$ )	Volume de Fixador ( $\mu\text{L}$ )
$\leq 15$	1:2	50	50
16-100	1:5	50	200
$\geq 101$	1:20	50	950

Para a preparação da diluição, o volume de amostra seminal deve ser medido com o auxílio de uma pipeta de deslocamento positivo, para uma maior confiança nos resultados, uma vez que apresenta um erro associado pouco significativo relativamente às pipetas convencionais (NAFA e ESHRE-SIGA, 2002). A câmara de Neubauer é carregada por capilaridade e deixam-se as células assentarem à temperatura ambiente e em câmara húmida, durante pelo menos 10 minutos.

O número total de espermatozoides é contado ao microscópio ótico, a uma ampliação de 400x, em 5, 10 ou no total dos 25 quadrados, consoante o número de células presentes (Figura 15). Assim, se no quadrado superior esquerdo forem visualizados mais de 40 espermatozoides, devem ser contados no total apenas 5 quadrados, o que acontece normalmente. No entanto, se forem visualizados apenas 10 a 40 espermatozoides devem contar-se 10 quadrados, e se existirem menos de 10

espermatozoides devem contar-se a totalidade dos 25 quadrados (NAFA e ESHRE-SIGA, 2002). Sempre que possível devem ser contados no total pelo menos 200 espermatozoides completos, adequando-se para tal a diluição da amostra, se necessário. O procedimento é repetido até que sejam encontradas duas réplicas concordantes, segundo os parâmetros da OMS (World Health Organization, 2010).



**Figura 15** | Imagem da grelha central de contagem da Câmara de Neubauer evidenciando (a) os 25 quadrados (ampliação de 100x) e (b) um dos quadrados, subdividido em 16 pequenos quadrados, com espermatozoides previamente fixados para contagem (ampliação de 400x).

A concentração de espermatozoides de uma amostra seminal é determinada segundo a seguinte equação:

$$C = \frac{25 \text{ quadrados}}{n^{\circ} \text{ quadrados contados}} \times n^{\circ} \text{ spz} \times \text{fator de diluição} \times \text{profundidade} \times \text{volume}$$

Esta está dependente do número de espermatozoides contados e respetivos quadrados da grelha. O fator de diluição utilizado, a profundidade e o volume da câmara de contagem são também fatores a ter em consideração no cálculo da concentração de espermatozoides.

No entanto, dado que a profundidade e o volume da câmara são constantes, é possível estimar fatores de conversão tendo em conta o número de quadrados contados e a diluição utilizada (Tabela 4). Assim, a concentração espermática é facilmente calculada, dividindo o número total de espermatozoides das duas contagens concordantes pelo respetivo fator de conversão.

**Tabela 14** | Fatores de conversão indicados para o cálculo da concentração de uma amostra seminal, em função da diluição utilizada e número de quadrados contados. (Adaptado de NAFA e ESHRE-SIGA, 2002)

Nº Quadrados Contados	Diluição		
	1:2	1:5	1:20
<b>5</b>	20	8	2
<b>10</b>	40	16	4
<b>25</b>	100	40	10

A concentração é expressa em número de espermatozoides por unidade de volume de ejaculado e não deve ser inferior a  $15 \times 10^6$  espermatozoides/mL para uma amostra normal (World Health Organization, 2010). Como a concentração de espermatozoides tem em conta o volume seminal, esta não é um indicador fiável da função testicular, uma vez que está dependente da função glandular responsável por grande parte do volume. Assim, é importante determinar o número total de espermatozoides no ejaculado, que pode ser calculado multiplicando a concentração obtida para uma dada amostra pelo respetivo volume. O limite de referência mínimo para o número total de espermatozoides é de  $39 \times 10^6$  (World Health Organization, 2010).

Baixos níveis de espermatozoides podem indicar um quadro de criptozoospermia, enquanto a ausência total de espermatozoides é designada por azoospermia, quando nenhum espermatozoide é encontrado no sedimento da amostra seminal após centrifugação (World Health Organization, 2010).

#### 3.2.2.4. Morfologia

A fertilidade masculina e qualidade de uma amostra de esperma é significativamente afetada pela sua morfologia, sendo que quanto maior a percentagem de espermatozoides normais maior a probabilidade de gravidez (World Health Organization, 2010).

A morfologia dos espermatozoides humanos é bastante variável, tornando difícil a sua avaliação. Em termos gerais, um espermatozoide normal deve ser constituído pelas 3 porções principais – cabeça, peça intermédia e cauda - sem anomalias. A cabeça deve apresentar uma forma oval, de contornos regulares, com

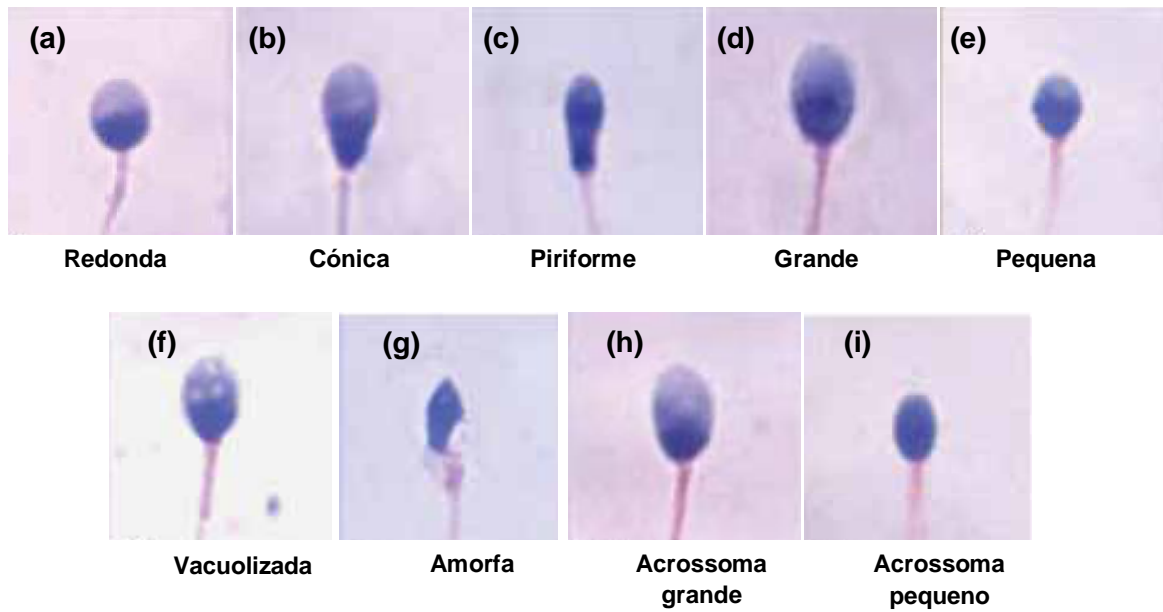


uma região acrossomal bem definida que deve ocupar 40 a 70% da área da cabeça, sem vacúolos de grandes dimensões e não mais do que dois vacúolos. A peça intermédia deve estar alinhada com o eixo da cabeça e apresentar aproximadamente o mesmo comprimento que esta, sem restos citoplasmáticos superiores a 1/3 do tamanho da cabeça. A cauda deve ter uma espessura uniforme ao longo de todo o seu comprimento, que deve ser de aproximadamente 45  $\mu\text{m}$  (cerca de 10 vezes superior ao tamanho da cabeça), e mais fina que a peça intermédia (World Health Organization, 2010).

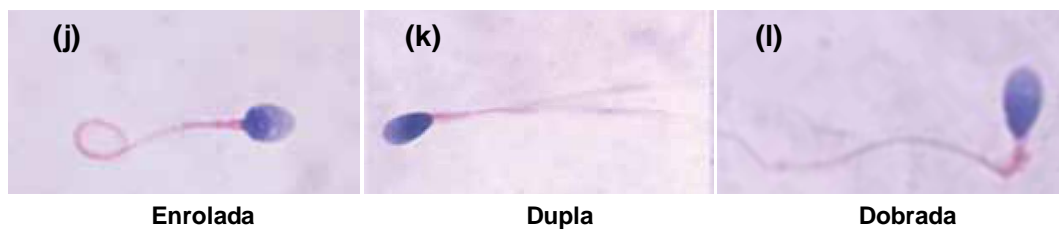
Para avaliação da morfologia de uma amostra de esperma, é retirada uma alíquota de amostra e preparado um esfregaço. Em amostras com baixa concentração de espermatozoides, pode ser necessário proceder-se à centrifugação prévia da amostra, 10 minutos a 600 g. O sobrenadante é de seguida removido e retira-se uma alíquota do *pellet* para preparar o esfregaço. Após secagem à temperatura ambiente, a lâmina é fixada numa solução de metanol, seguindo posteriormente o processo de coloração com os corantes Papanicolau e Shorr. Estes promovem, respetivamente, uma coloração azulada aos ácidos nucleicos e rosa nas restantes estruturas. As preparações são avaliadas ao microscópio ótico, a uma ampliação de 1000x com óleo de imersão. Sempre que possível são contados diferencialmente 200 espermatozoides completos.

A classificação dos espermatozoides quanto à morfologia é realizada distinguindo espermatozoides normais e anormais, sendo indicada o tipo de anomalia, nomeadamente, se apresenta restos citoplasmáticos, anomalias de cabeça, peça intermédia e/ou cauda (Figura 16). Células espermáticas imaturas e leucócitos devem também ser contados, sempre que se verifique a sua presença (Figura 17). Uma concentração de leucócitos superior a  $1 \times 10^6$  pode ser indicativa de inflação dos órgãos do sistema reprodutor masculino, podendo afetar a motilidade e a integridade do DNA espermático, através da libertação de ROS. Por outro lado, valores de células espermáticas imaturas elevados, mais de 3 por cada 100 espermatozoides, podem ser indicativos de má função testicular (World Health Organization, 2010).

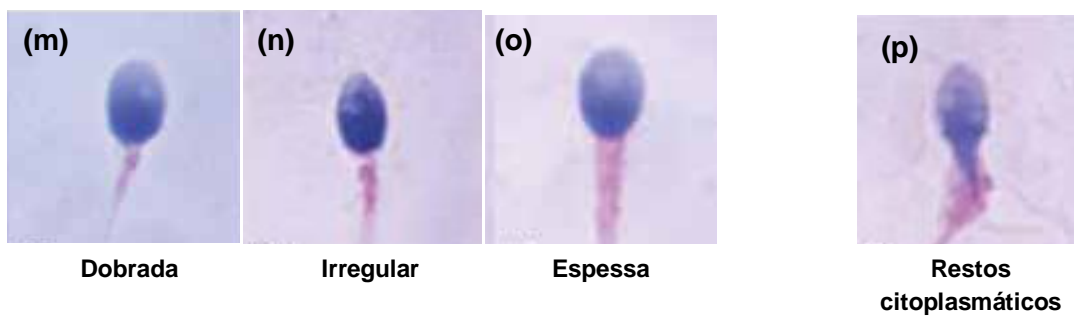
### Anomalias de Cabeça



### Anomalias de Cauda

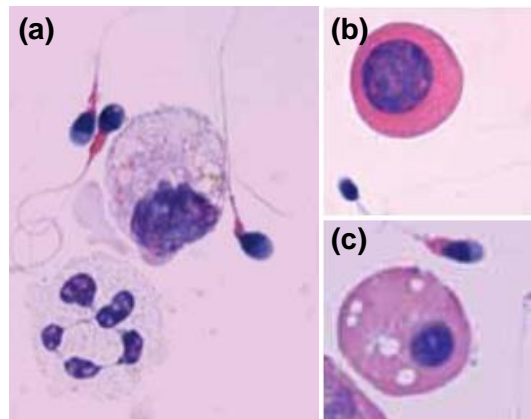


### Anomalias de Peça Intermédia



**Figura 16** | Imagens exemplificativas de anomalias morfológicas de cabeça [(a) a (i)], de cauda [(j) a (l)], de peça intermédia [(m) a (o)] e restos citoplasmáticos (p) encontradas em espermatozoides durante a avaliação morfológica do esperma. (Adaptado de World Health Organization, 2010)

Os resultados da avaliação da morfologia devem ser apresentados em percentagem, sendo o limite de referência para as formas normais de 4%. O índice de teratozoospermia é também calculado, dividindo o número total de anomalias contabilizadas pela percentagem de espermatozoides anormais, o que reflete a quantidade média de anomalias por espermatozoide anormal (World Health Organization, 2010).



**Figura 17** | Imagens exemplificativas de leucócitos e células espermáticas imaturas presentes em amostras seminais. (a) Neutrófilo (inferior) e macrófago (superior); (b) Espermatócito; (c) Espermatíde. (Adaptado de World Health Organization, 2010)

#### 3.2.2.5. Aglutinação

Aquando da avaliação microscópica inicial da amostra de esperma, deve ser avaliada a aglutinação de espermatozoides, quando se encontrar presente.

A aglutinação específica refere-se à aderência de espermatozoides móveis entre si, podendo ser do tipo cabeça-cabeça, cauda-cauda ou mista. Para além do tipo de aglutinação deve ser também registado o grau de aglutinação, consoante esta se apresenta desde dispersa a muito intensa. Um elevado grau de aglutinação pode dificultar a avaliação de outros parâmetros microscópicos, tais como a motilidade e a concentração (World Health Organization, 2010).

Os espermatozoides imóveis podem também encontrar-se aderidos entre si e os espermatozoides móveis aderidos a células não espermáticas, restos celulares ou muco, sendo, nestes casos, designados por agregação não específica, o que não deve ser registado. A presença de aglutinação não é uma evidência suficiente para diagnosticar infertilidade de causa imunológica, no entanto sugere a presença de anticorpos anti-espermatozoides, que pode ser comprovada, recorrendo a um teste de *Mixed Antiglobulin Reaction* (MAR) ou teste *Immunobead* (IB) (World Health Organization, 2010).

### 3.3. Processamento de amostras seminais para tratamentos de RHA

A preparação de amostras seminais para tratamentos de RHA tem como objetivo a separação dos espermatozoides do plasma seminal e a remoção de restos celulares, células não germinativas e espermatozoides não viáveis, de modo a obter-se uma preparação final, contendo uma elevada percentagem de espermatozoides móveis e morfológicamente normais.

Embora o plasma seminal desempenhe um importante papel na penetração dos espermatozoides através do muco cervical, alguns dos seus componentes, tais como as prostaglandinas e os iões de zinco, podem afetar o sucesso de uma gravidez, quando as barreiras naturais são ultrapassadas, tal como acontece nas técnicas de inseminação intrauterina (IIU) ou fertilização *in vitro* (FIV) (World Health Organization, 2010).

Um dos métodos mais comuns de tratamento de amostras espermáticas é o método de gradientes de densidade descontínuos, que consiste na separação de detritos e células não espermáticas por centrifugação, com base na densidade dos diferentes componentes, permitindo uma ótima seleção de espermatozoides de boa qualidade. Esta técnica é usada para recuperar e preparar espermatozoides para utilização em técnicas de IIU, FIV e ICSI.

A amostra espermática deve ser recolhida para um recipiente estéril, preferencialmente, por masturbação e deve ser mantida a 37°C até que se encontre totalmente liquefeita (World Health Organization, 2010). Posteriormente, devem ser avaliados os parâmetros de motilidade, concentração e morfologia da amostra, para confirmação dos dados do espermograma. Esta avaliação é essencial dada a variabilidade dos parâmetros espermáticos ao longo do tempo (World Health Organization, 2010).

Para o processamento da amostra espermática, são preparadas duas soluções de partículas de sílica coloidal revestidas por silano a 80% (v/v) e 40% (v/v) em meio de cultura tamponado, sendo colocadas uma sob a outra, respetivamente. Após liquefação completa, a amostra é transferida, cuidadosamente, para o topo dos dois gradientes, procedendo-se à sua centrifugação durante 25 minutos, a 1200 rpm e 35°C. Após centrifugação, deverá ser possível observar a separação dos diferentes componentes da amostra seminal, com base na sua densidade (Figura 18). O

sobrenadante, contendo o plasma seminal e as camadas de detritos celulares, espermatozoides não viáveis e células não espermáticas retidos entre as duas camadas de gradientes, deve ser removido. O pellet restante de espermatozoides viáveis é transferido para um novo tubo, ao qual são adicionados 2 mL de meio de cultura tamponado, pré-aquecido a 37°C, seguindo, novamente, uma centrifugação de 10 minutos, a 1200 rpm e 35°C. Por fim, todo o sobrenadante deve ser removido, de modo a eliminar o máximo de impurezas possível, e são adicionados cerca de 0,5 mL de meio cultura tamponado, pré-aquecido a 37°C, sem perturbação do pellet de espermatozoides. O volume de meio adicionado está dependente do número de espermatozoides e da qualidade da amostra, assim como da técnica de RHA para a qual serão utilizados.

Este método de processamento pode ser adaptado a cada amostra seminal, de modo a otimizar os resultados. Nomeadamente, o volume total dos gradientes de densidade pode ser reduzido, em amostras de menor concentração, limitando a distância de migração a que os espermatozoides estão sujeitos. Por outro lado, o tempo de centrifugação pode ser aumentado, em casos de amostras de elevada viscosidade, permitindo a completa separação dos espermatozoides viáveis (World Health Organization, 2010).



**Figura 18** | Preparação de amostras seminais por gradientes de densidade descontínuos, após centrifugação, evidenciando a separação do plasma seminal acima dos gradientes, detritos celulares, espermatozoides não viáveis e células não espermáticas retidos na interface dos gradientes de 40% e 80% e espermatozoides morfologicamente normais e progressivos acumulados no fundo do tubo.

A amostra final é incubada a 37°C, 6% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub>, numa inclinação de 45°, para maximizar a interface com a atmosfera controlada, e com a tampa parcialmente aberta para permitir as trocas gasosas. Estas condições irão garantir a manutenção de valores de pH adequados à sobrevivência dos espermatozoides

(World Health Organization, 2010). A incubação deve ser de pelo menos 30 minutos, nunca excedendo as 2 horas, para evitar a acumulação de formas espermáticas anormais, que aumentam ao longo do tempo (Elder e Dale, 2011; World Health Organization, 2010).

Durante o período de incubação, os espermatozoides libertam-se do *pellet* e progridem no meio de cultura em direção ao topo. Este processo, designado de *Swim-up*, irá permitir um ótimo isolamento das formas espermáticas viáveis, móveis e morfologicamente normais, para posterior utilização em técnicas de RHA.

### 3.3.1. Processamento de amostras recolhidas por TESE

Nos casos de azoospermia em que se recorre à técnica de TESE para recolha de espermatozoides, os fragmentos biopsiados são colocados no meio de cultura, pré-equilibrado a 37 °C, 6% de CO<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub>, para posterior pesquisa de gâmetas. É importante que esta pesquisa seja realizada imediatamente após a biopsia dos fragmentos para avaliar a quantidade de células espermáticas recolhidas e a necessidade da continuidade da biopsia (Neri *et al.*, 2012). Os fragmentos testiculares são lavados para remoção dos coágulos de sangue e, posteriormente, divididos em porções mais pequenas, que são observadas ao microscópio ótico para confirmar a presença de espermatozoides. De seguida, a amostra é centrifugada durante 10 minutos a 1200 rpm e 35°C, após a qual o sobrenadante é removido e o pellet é ressuspenso em meio de cultura pré-equilibrado. A amostra é incubada durante 4 horas, até um máximo de 24 horas, a 37 °C, 6% de CO<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub>. Caso a ICSI não seja realizada no dia da biopsia, o tecido testicular ou os espermatozoides podem ser criopreservados, para posterior utilização (Neri *et al.*, 2012).

## 4. Recolha, avaliação e processamento de gâmetas femininos

### 4.1. Estimulação ovárica

A estimulação ovárica tem como objetivo a indução do desenvolvimento de vários folículos num ciclo reprodutivo, ao contrário do que acontece num ciclo natural em que apenas um folículo dominante completa o processo de maturação, sendo que os restantes folículos em desenvolvimento entram em atresia (Fatemi *et al.*, 2012). Assim, o desenvolvimento de protocolos de indução da poliovulação são um importante passo nos tratamentos de RHA, permitindo obter um maior número de ovócitos e consequentemente embriões de qualidade.

A estimulação ovárica foi desenvolvida, originariamente, com o intuito de tratar disfunções ovulatórias, recorrendo-se para tal à administração de citrato de clomifeno (CC) (Beall e Decherney, 2012; Shoham e Howles, 2009). Este composto é um análogo do estrogénio, capaz de se ligar aos seus recetores no hipotálamo, inibindo o efeito ação de feedback negativo exercida por este esteroide. Assim, a administração prolongada de CC levará à secreção aumentada de GnRH, e consequentemente aumento de FSH e LH, que serão responsáveis pelo recrutamento e desenvolvimento folicular (Oskowitz, 2012; Shoham e Howles, 2009). Este protocolo deve ser iniciado ao dia 5 do ciclo menstrual, tendo a duração de cinco dias (Shoham e Howles, 2009).

Em casos de ausência de resposta ao tratamento com CC, recorre-se à estimulação ovárica diretamente com gonadotrofinas exógenas. Ao longo dos anos, os métodos de isolamento, síntese e purificação de gonadotrofinas foram sendo desenvolvidos, sendo que atualmente estão disponíveis a hMG urinária (conjunto de gonadotrofinas extraídas da urina humana de mulheres pós-menopausa; do inglês *human Menopausal Gonadotropin*), a FSH recombinante (rFSH) e a LH recombinante (rLH), sendo que estes últimos são de produção ilimitada e altamente purificados, evitando reações de hipersensibilidade a contaminações proteicas (Beall e Decherney, 2012; Fatemi *et al.*, 2012).

Com o desenvolvimento dos protocolos de estimulação com gonadotrofinas exógenas, foi necessário estabelecer métodos de controlo da ovulação, de modo a que esta não ocorra antes da punção folicular. Para tal, são administrados análogos

de GnRH, que inibem o pico precoce de LH, impedindo a ovulação prematura e consequentes perdas de ovócitos e ciclos cancelados (Alper, 2012; Rienzi e Ubaldi, 2012). Os agonistas de GnRH são moléculas análogas desta hormona, capazes de se ligarem aos seus recetores na hipófise, provocando um aumento inicial de gonadotrofinas, seguida por uma dessensibilização hipofisária, com consequente inibição da produção de FSH e LH. Por outro lado, a administração de antagonistas de GnRH causa uma supressão imediata de gonadotrofinas, por impedir a ligação da GnRH endógena aos seus recetores, tratando-se, portanto, de um ciclo de tratamento significativamente mais curto, sem o aumento inicial de gonadotrofinas, o qual, por sua vez, pode causar cistos ovários (Fatemi *et al.*, 2012; Huirne e Schats, 2009; Ludwig, 2009). O desenvolvimento de protocolos de estimulação ovária utilizando antagonistas de GnRH, levou a uma grande discussão relativamente à sua eficácia quando comparados com os protocolos de agonistas de GnRH (Orvieto e Patrizio, 2013). Recentemente, uma revisão Cochrane demonstrou não existirem diferenças estatisticamente significativas nas taxas de gravidez entre ambos os protocolos, sendo no entanto ainda uma conclusão muito controversa (Al-Inany *et al.*, 2011).

O principal risco da estimulação ovária é o desenvolvimento da síndrome de hiperestimulação ovária (SHO), que se caracteriza por uma resposta sistémica exagerada à administração de hCG, caracterizada por um amplo espectro de manifestações clínicas, tais como distensão abdominal, aumento do volume ovário e complicações respiratórias, hemodinâmicas e metabólicas (Zegers-Hochschild *et al.*, 2009). Assim, devem ser tomadas várias precauções para evitar o desenvolvimento desta síndrome e a evolução do estado da paciente deve ser cuidadosamente controlado ao longo do tratamento (Beall e Decherney, 2012; Corbett *et al.*, 2014).

Durante o tratamento de estimulação ovária, o desenvolvimento folicular deve ser monitorizado ecograficamente. Assim que pelo menos um folículo atinja um diâmetro de 17 mm ou mais, deve ser administrada uma injeção de hCG, que irá promover a maturação ovocitária e induzir a ovulação, num período de pelo menos 40 horas (Alper, 2012).



## 4.2. Punção folicular

A recolha de gâmetas femininos é realizada através da aspiração por sistema de vácuo durante a punção folicular, que deve ser realizada cerca de 36 horas após administração de hCG (Rienzi e Ubaldi, 2012).

A punção folicular é realizada sob anestesia geral e ecoguiada com sonda vaginal. Para a recolha dos ovócitos, é utilizada uma agulha de punção que deve perfurar, através da parede vaginal, preferencialmente, uma única vez a cápsula do ovário, permitindo aspirar todos os folículos aí presentes. Estes devem ser totalmente esvaziados a uma pressão negativa de 110 a 150 mmHg (para folículos de dimensões iguais ou superiores a 1,5 cm), recolhendo-se o líquido folicular para tubos cónicos mantidos a uma temperatura estável de 37°C, em placa de aquecimento. Ambos os ovários devem ser puncionados e a pesquisa de ovócitos deve ter início imediatamente após a colheita do líquido folicular.

Caso se verifique que ocorreu ovulação espontânea anterior à punção folicular, o líquido presente no fundo de saco de Douglas deve ser recolhido, para pesquisa de ovócitos que eventualmente ainda possam estar presentes.

A pesquisa de ovócitos é realizada em superfície aquecida, recorrendo à observação ao estereomicroscópio do líquido folicular, previamente transferido para uma placa de Petri. Os ovócitos recolhidos são lavados para remoção de fragmentos teciduais e eventuais vestígios de sangue, em meio tamponado pré-aquecido a 37°C. Posteriormente, são transferidos para meio de incubação pré-equilibrado e incubados a 37°C, 6% de CO<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub>.

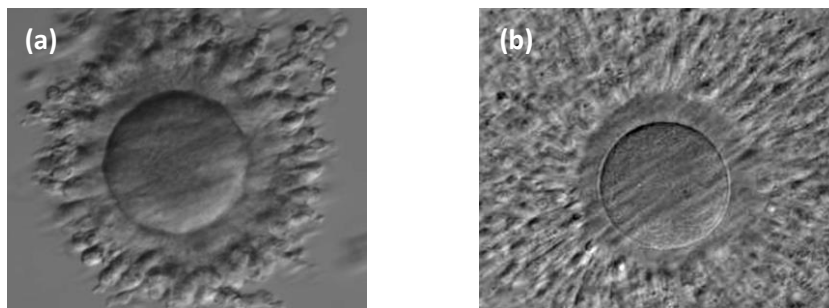
## 4.3. Avaliação da Maturidade e Qualidade ovocitária

Durante o desenvolvimento folicular, em paralelo com o processo de oogénese, os ovócitos vão sendo rodeados por um conjunto de células foliculares, designadas *cumulus oophorus*, formando o complexo *cumulus-ovócito* (CCO). Este é libertado aquando da ovulação, num ciclo natural ou recolhido por punção folicular, para tratamentos de RHA.

Após a identificação de um CCO, durante a pesquisa do líquido folicular, este deve ser inicialmente avaliado quanto à sua maturidade e, posteriormente, sempre que possível, deverá ser avaliada a qualidade ovocitária.

#### 4.3.1. Maturidade ovocitária

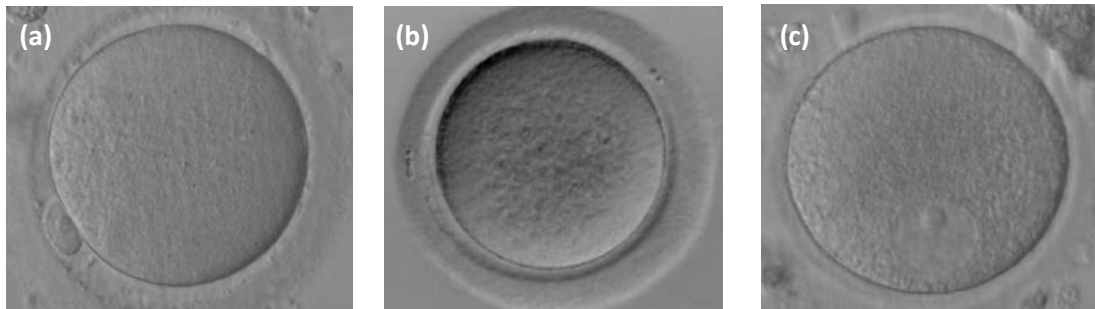
A aparência do CCO pode ser indicativa do seu estado de maturidade, sendo que um CCO imaturo parece apresentar as células do *cumulus* compactas à volta do ovócito (Figura 19a). Por outro lado, um CCO maduro deve apresentar as células da coroa radiata expandidas, rodeadas pelas restantes células do *cumulus*, que devido à secreção ativa de ácido hialurónico apresentam-se expandidas, formando uma massa de aspeto fofo (Figura 19b) (Elder e Dale, 2011; Rienzi e Ubaldi, 2012). O facto da expansão do conjunto células do *cumulus*-coroa poder não estar sincronizada com a maturidade nuclear, como parece verificar-se em muitos casos após ciclos de estimulação ovocitária, esta avaliação, por si só, não é suficiente para confirmar a maturidade do ovócito (Rienzi *et al.*, 2012a).



**Figura 19** | Imagens exemplificativas da maturidade do complexo *cumulus*-ovócito (CCO) (ampliação de 400x).  
(a) CCO evidenciando as células envolventes compactas; (b) CCO evidenciando células envolventes expandidas. (Adaptado de Rienzi *et al.*, 2012)

Embora o conjunto de células envolventes possa impedir a visualização do ovócito, ocasionalmente ele pode ser observado, permitindo a avaliação da maturidade nuclear. Em casos de ICSI, os ovócitos são previamente desnudados das células do *cumulus* e coroa radiata, facilitando a avaliação ovocitária (Elder e Dale, 2011; Rienzi *et al.*, 2012a).

A maturidade nuclear é determinada pela presença do 1º glóbulo polar (GP) no espaço perivitelino (EPV), indicando que o ovócito se encontra em Metafase II (MII) (Rienzi e Ubaldi, 2012; Rienzi *et al.*, 2012a). Quando o ovócito está imaturo, ele pode encontrar-se em Metafase I (MI), ou seja sem a presença de vesícula germinativa nem glóbulo polar, ou ainda bastante imaturo, em estado de vesícula germinativa (VG), indicando que se encontra parado em prófase I (Figura 20) (Rienzi e Ubaldi, 2012).



**Figura 20** | Imagens exemplificativas da maturidade nuclear dos ovócitos após desnudação (ampliação de 400x). (a) Ovócito maduro em MII, evidenciando o 1º GP no EPV; (b) Ovócito imaturo em MI, sem a presença de VG e 1ºGP; (c) Ovócito imaturo em VG, com um núcleo excêntrico e um único nucléolo proeminente. (Adaptado de Rienzi *et al.*, 2012)

Os ovócitos imaturos podem ser mantidos em cultura para maturação *in vitro*, devendo ser incubados a 37°C, 6% de CO<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub>, durante 24 horas nos casos de VG ou durante 12 horas nos casos de MI (Elder e Dale, 2011). Caso se verifique maturidade após o período de incubação, os ovócitos poderão ser posteriormente inseminados.

#### 4.3.2. Qualidade ovocitária

A qualidade ovocitária e, conseqüentemente, a sua capacidade de fertilização e correto desenvolvimento embrionário, são determinadas pela sincronia da maturação nuclear e citoplasmática (Rienzi *et al.*, 2012a). Assim, para além da maturidade nuclear, outras características podem ser determinantes da qualidade ovocitária, tais como anomalias intracitoplasmáticas e extracitoplasmáticas.

A morfologia dos ovócitos pode fornecer importantes indicadores da capacidade de fertilização, desenvolvimento embrionário e gravidez. No entanto, esta relação está dependente do tipo e da extensão da anomalia, sendo que não é imperativo que ovócitos morfologicamente anormais tenham um mau prognóstico.

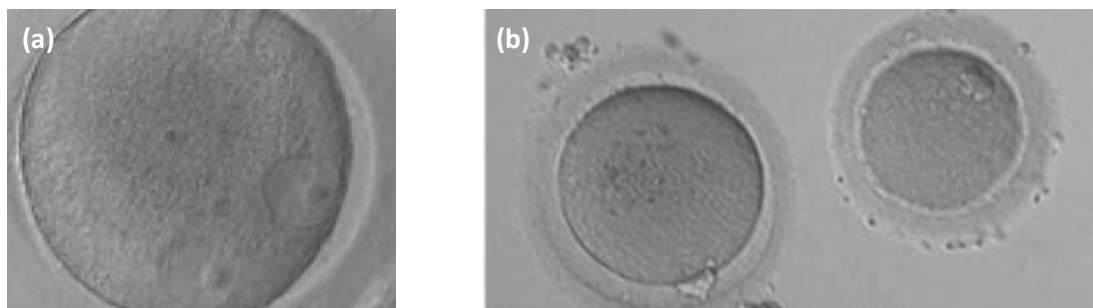
Um ovócito MII normal e de boa qualidade deve apresentar uma morfologia esférica, com citoplasma translúcido sem inclusões, rodeado por uma zona pelúcida uniforme, com um pequeno espaço perivitelino, contendo um único glóbulo polar, não fragmentado (Figura 21) (ASiRM e ESIGoE, 2011).



**Figura 21** | Imagem exemplificativa de um ovócito MII com forma esférica, citoplasma translúcido e rodeado por uma ZP uniforme, contendo o 1º GP no EPV. (Adaptado de Rienzi *et al.*, 2012)

No entanto, a maioria dos ovócitos recolhidos após estimulação ovárica controlada apresentam uma ou mais anomalias morfológicas, que podem afetar negativamente a qualidade ovocitária (Rienzi e Ubaldi, 2012).

O tamanho do ovócito é um importante fator de qualidade, uma vez que um ovócito com volume aumentado, ovócito gigante (cerca de duas vezes o tamanho de um ovócito normal,  $\sim 200\mu\text{m}$ ), pode apresentar o dobro do conteúdo cromossômico, e assim aparecer como ovócitos VG binucleados (Figura 22) (Rienzi e Ubaldi, 2012; Rienzi *et al.*, 2012a). Todos os embriões resultantes de ovócitos gigantes apresentam anomalias cromossômicas, cuja transferência se pode refletir na prevalência de abortos espontâneos, embora possam ter um padrão de clivagem e desenvolvimento até à fase de blastocisto normal (Rienzi e Ubaldi, 2012).



**Figura 22** | Imagens exemplificativas de ovócitos gigantes. (a) Ovócito gigante em VG evidenciando dois núcleos excêntricos, cada uma com o respetivo nucléolo proeminente; (b) Ovócito gigante (esquerda) em comparação com um ovócito de dimensões normais (direita) (Adaptado de Rienzi *et al.*, 2012 e Rienzi e Ubaldi, 2012).

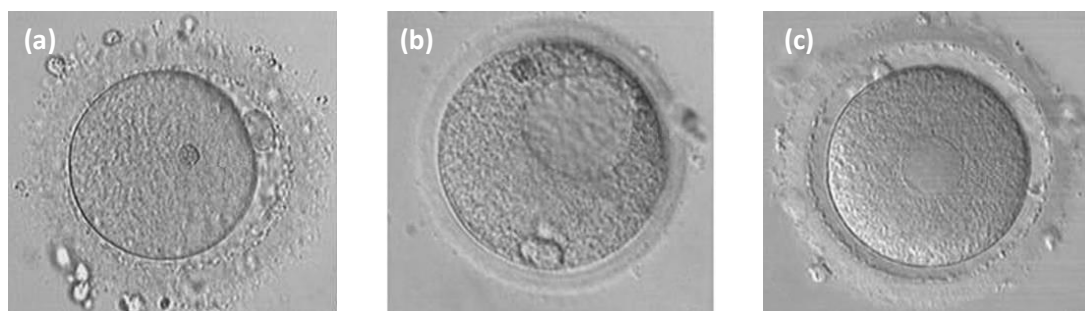
#### 4.3.2.1. Anomalias intracitoplasmáticas

O citoplasma ovocitário, ou ooplasma, pode apresentar alterações na sua textura, nomeadamente, granulosidade ou a presença de inclusões citoplasmáticas, tais como corpos refráteis (CR), vacúolos e agregados de retículo endoplasmático (RE) liso (Figura 23). Estas anomalias citoplasmáticas parecem estar associadas a baixo potencial de implantação, como resultado de um desenvolvimento embrionário deficiente (Rienzi e Ubaldi, 2012).

Os CR são estruturas que podem conter frequentemente lipofuscina, um pigmento resultante da incompleta eliminação de detritos celulares, que quando de grandes dimensões ( $> 5\mu\text{m}$ ) se encontram associados a uma redução significativa da fertilização e um desenvolvimento desfavorável de blastocistos (Otsuki *et al.*, 2007).

A presença de pequenos vacúolos (5 a 10 $\mu$ m de diâmetro) não parece afetar a qualidade ovocitária, ao contrário dos grandes vacúolos (>14 $\mu$ m de diâmetro) que quando presentes parecem afetar as taxas de fertilização (ASiRM e ESIGoE, 2011; Rienzi e Ubaldi, 2012). Os vacúolos que permaneçam nos ovócitos após fertilização poderão também afetar a divisão celular, prejudicando o desenvolvimento até à fase de blastocisto (ASiRM e ESIGoE, 2011).

Os agregados de RE são uma das características intracitoplasmáticas mais importantes, uma vez que os embriões resultantes de ovócitos com este tipo de disfunção apresentam frequentemente graves anomalias, levando a elevadas taxas de morte fetal precoce (ASiRM e ESIGoE, 2011; Rienzi *et al.*, 2012a).



**Figura 23** | Imagens exemplificativas de inclusões intracitoplasmáticas (ampliação de 400x). (a) Ovócito com a presença de um corpo refrátil; (b) Ovócito com um vacúolo de grandes dimensões (>14 $\mu$ m); (c) Ovócito com agregado de RE liso ao centro. (Adaptado de Rienzi e Ubaldi, 2012)

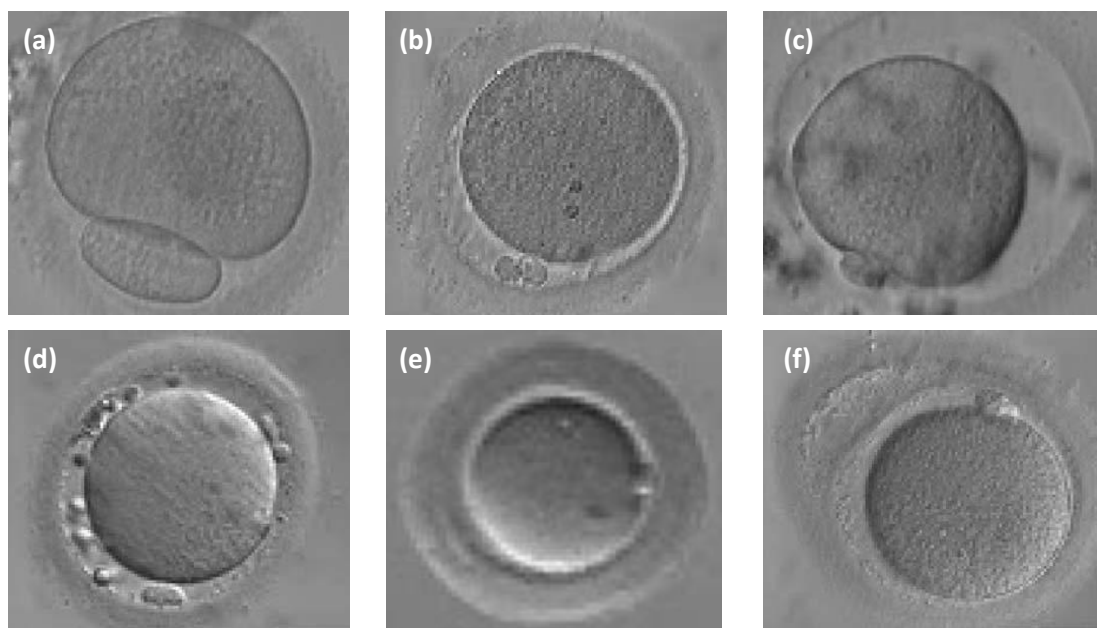
#### 4.3.2.2. Anomalias extracitoplasmáticas

A presença ou ausência do 1<sup>o</sup> glóbulo polar é um forte indicador da maturidade ovocitária, sendo que este deve ser de pequenas dimensões. Quando o tamanho do glóbulo polar é excessivamente grande, este pode indicar risco de aneuploidia ovocitária (Figura 24a) (ASiRM e ESIGoE, 2011). Por outro lado, a presença de um glóbulo polar degenerado pode refletir uma assíncrona na maturidade nuclear e citoplasmática (Rienzi e Ubaldi, 2012). O 1<sup>o</sup> glóbulo polar pode também aparecer fragmentado, no entanto esta anomalia parece ser uma característica de pós-maturidade do ovócito (Figura 24b) (Rienzi e Ubaldi, 2012).

O espaço perivitelino (EPV) pode apresentar-se aumentado, como resultado da pós-maturidade ovocitária ou ainda da excessiva extrusão de citoplasma aquando da formação do 1<sup>o</sup> glóbulo polar (Figura 24c) (Rienzi *et al.*, 2012a). Esta característica parece refletir falhas na fecundação e fraca qualidade embrionária (Rienzi e Ubaldi,

2012; Rienzi *et al.*, 2012a). Podem verificar-se também inclusões no espaço perivitelino, possivelmente indicativas da baixa qualidade ovocitária (Figura 24d) (ASiRM e ESIGoE, 2011).

A zona pelúcida (ZP) do ovócito pode, em certos casos, apresentar-se excessivamente espessa (Figura 24e) ou com coloração alterada, sendo estas alterações resultantes de problemas na secreção e organização da matriz glicoproteica (ASiRM e ESIGoE, 2011; Rienzi *et al.*, 2012a). A zona pelúcida pode também apresentar-se ausente ou deformada (Figura 24f), no entanto, dado que a sua aparência é bastante variável, apenas grandes alterações da espessura e coloração devem ser avaliadas.



**Figura 24** | Imagens exemplificativas de anomalias extracitoplasmáticas (ampliação 400x). (a) Ovócito com 1º GP gigante; (b) Ovócito com 1º GP fragmentado; (c) Ovócito com EPV aumentado; (d) Ovócito evidenciando fragmentos no EPV; (e) Ovócito com ZP espessa e densa; (f) Ovócito com ZP de forma anormal, com o que parece uma rutura ou duplicação da camada interna da ZP. (Adaptado de Rienzi *et al.*, 2012)

## 5. Técnicas de RHA

### 5.1. Inseminação Intrauterina (IIU)

A inseminação intrauterina (IIU) é uma técnica que consiste na deposição de amostra seminal, previamente tratada, no útero feminino, com o auxílio de um cateter de inseminação. A IIU foi introduzido há mais de 50 anos (Cohen, 1962) e é um dos tratamentos de fertilidade administrado mais recorrente (Bayer, 2012b). Este é um método relativamente simples e eficaz de tratamento para casais com fator de infertilidade, sendo a técnica de RHA menos invasiva e dispendiosa (Marcus, 2005).

A IIU é a técnica de inseminação artificial mais utilizada, embora outros métodos tenham sido desenvolvidos para deposição da amostra de esperma no trato feminino, nomeadamente, a inseminação intravaginal, intracervical ou intratubárica. Este procedimento tem como objetivo facilitar o transporte dos gâmetas masculinos ao longo do trato feminino, até que estes atinjam o ovócito, permitindo ultrapassar os obstáculos naturais. A IIU é, portanto, um tratamento indicado em casos de fator cervical, fator masculino de infertilidade leve ou disfunção ejaculatória, mas, principalmente, é considerado um tratamento de primeira linha para casos de infertilidade inexplicada (Bayer, 2012b). Por outro lado, esta técnica não é indicada para casos de mulheres com obstrução tubar, disfunção ovulatória ou endometriose de grau moderado ou grave, por se tratarem de patologias que dificultam gravemente a capacidade de uma fertilização em ambiente natural (Marcus, 2005). Quando se recorre a esperma de dador masculino, em casais com grave fator de infertilidade masculino sem fator feminino, a IIU é também a melhor abordagem, sendo neste caso designada por IIU-heteróloga (Bayer, 2012b).

A IIU pode ser utilizada em ciclos naturais ou recorrendo a estimulação ovárica controlada, com indução da ovulação com hCG, assim que se verifique pelo menos um folículo com as dimensões adequadas. A inseminação deve ser realizada 32 a 36 horas após a administração de hCG (ESHRE Capri Workshop Group, 2009).

A recolha da amostra seminal deve ser efetuada, preferencialmente, no dia da inseminação, após a qual é preparada pelo método de gradientes de densidade (Secção 3.3.), de modo a remover contaminantes e obter uma preparação final com elevada qualidade espermática. Após preparação da amostra, cerca de 0,2 a 0,5 ml de suspensão espermática, após *swim-up*, deve ser aspirada para uma seringa, que é

posteriormente acoplada ao cateter de inseminação. Este encontra-se previamente inserido no canal cervical, permitindo a deposição da amostra na cavidade uterina. A motilidade espermática deve ser novamente avaliada ao microscópio ótico antes da inseminação.

O sucesso da IIU é determinado por vários fatores, incluindo a idade do casal, em particular da mulher, o protocolo de estimulação utilizado, a qualidade espermática, nomeadamente, a sua motilidade e morfologia, e ainda a duração e o fator de infertilidade (ESHRE Capri Workshop Group, 2009; Marcus, 2005).

## 5.2. Fertilização *In Vitro* (FIV)

A fertilização *in vitro* (FIV) é um dos avanços mais significativos no campo da medicina reprodutiva. Desde a sua introdução, com o nascimento do primeiro bebé de proveta, Louise Brown, em 1978, todas as etapas envolvidas nos protocolos de FIV têm sido melhoradas, levando a que esta seja atualmente a técnica de RHA mais eficaz no tratamento da infertilidade (Alper, 2012). O tratamento por FIV é indicado para casos de obstrução tubar, disfunção ovulatória ou fator masculino não grave (Gianaroli *et al.*, 2012), sendo também aconselhável quando o tratamento por IIU falha (Marcus, 2005).

A FIV tem como objetivo mimetizar o processo de fertilização natural, sendo que para tal os CCO recolhidos são colocados em contacto com os espermatozoides que, de uma forma natural, progridem até atingir o ovócito, penetrando ativamente através das suas camadas envolventes.

O tratamento de FIV é realizado em associação a um protocolo de estimulação ovárica adequado (Secção 4.1.), de modo a que se obtenham vários folículos maduros num único ciclo. Este procedimento permite aumentar a probabilidade de sucesso da técnica, uma vez que quanto maior for o número de ovócitos recolhidos, maior será o número de embriões de qualidade que é possível obter, e consequentemente, maior a probabilidade de gravidez (Alper, 2012).

A punção folicular deve ser realizada cerca de 32 a 36 horas após indução da ovulação com hCG (Secção 4.2.), após a qual é realizada a pesquisa do líquido folicular, para recolha dos CCO. Depois da lavagem em meio tamponado previamente aquecido a 37°C, os CCO encontrados são incubados a 37°C, 6% de CO<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub>,



em placas de 4 poços com 0,5 mL de meio de incubação pré-equilibrado coberto por uma camada de óleo de parafina, o qual permite prevenir variações bruscas de temperatura, pH e osmolaridade (Elder, 2005).

A amostra de esperma deve ser recolhida, preferencialmente, no dia da punção, sendo tratada de seguida pelo método dos gradientes de densidade (Secção 3.3.). Após processamento da amostra espermática e *swim-up* de pelo menos 30 minutos, é realizada a contagem de espermatozoides progressivos, para determinação do volume a inseminar. Para tal, é retirada uma alíquota da suspensão espermática e carregada a câmara de Neubauer, procedendo-se à contagem dos espermatozoides progressivos, o mais rapidamente possível, em 5 quadrados. Tendo em conta que os ovócitos devem ser inseminados com 50 000 a 100 000 espermatozoides progressivos por mL, é calculado o volume de suspensão espermática que deve ser adicionado a cada poço.

Aproximadamente 3 horas após a punção folicular, os CCO devem ser inseminados com o volume adequado de suspensão espermática em cada poço, sendo posteriormente incubados a 37°C, 6% de CO<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub>. O meio de incubação, que deverá conter uma fonte proteica na sua constituição, tal como a albumina, irá promover a capacitação dos espermatozoides, mimetizando o processo natural que ocorre, aquando do transporte dos gâmetas masculinos ao longo do trato feminino (Balaban *et al.*, 2014).

O sucesso da fertilização deve ser avaliada 16 a 18 horas após inseminação, posteriormente à desnudação mecânica dos ovócitos (ASiRM e ESIGoE, 2011). Este procedimento é efetuado pipetando sucessivamente os ovócitos com uma pipeta de diâmetro adequado, até que todas as células envolventes sejam removidas. Neste tipo de técnica de RHA, o procedimento de desnudação é facilitado, porque durante o processo de fertilização, os espermatozoides vão libertando enzimas acrossomais que promovem a dispersão das células do *cumulus*-coroa. A fertilização é confirmada pela presença de dois glóbulos polares e dois pronúcleos, devendo os pré-zigotos ser posteriormente transferidos para meio de cultura e incubados a 37°C, 6% de CO<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub>, para desenvolvimento embrionário, até à data da transferência.

A principal causa de falha dos ciclos de FIV é atribuída à falta de capacidade de penetração dos espermatozoides nas camadas envolventes e membrana do ovócito, embora a etiologia da falha de fertilização seja bastante complexa (Gianaroli *et al.*, 2012).

### 5.3. Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI)

No sentido de melhorar o sucesso das taxas de fertilização dos programas de fertilização *in vitro*, foram desenvolvidas técnicas de micromanipulação de ovócitos. Assim, na década de 80 surgiu a técnica de perfuração da zona pelúcida (ZD, do inglês *Zona Drilling*) com solução ácida de Tyrode (pH 2), e mais tarde a técnica mecânica de dissecação parcial da zona pelúcida (PZD, do inglês *Partial Zona Dissection*), sendo que ambas permitiam a execução de uma pequena abertura da zona pelúcida, facilitando a penetração dos espermatozoides (Elder e Dale, 2011; Palermo *et al.*, 2012). Contudo, estas apresentavam uma elevada incidência de polispermia e de risco de danificar o ovócito (Palermo *et al.*, 2012). Posteriormente, foi desenvolvida outra técnica de micromanipulação, a injeção sub-zonal de espermatozoides (SUZI, do Inglês *Subzonal sperm Injection*), que consiste na inserção de espermatozoides no espaço perivitelino do ovócito, apresentando desta forma uma primeira alternativa para tratamento da infertilidade masculina grave (Elder e Dale, 2011). A grande evolução no campo da micromanipulação surgiu por fim com a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI, do Inglês *Intracytoplasmic Sperm Injection*), realizada pela primeira vez em ovócitos humanos por Lazendorf *et al.* em 1988, tendo sido reportada a primeira gravidez após ICSI por Palermo *et al.* apenas em 1992.

A injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) consiste na deposição de um único espermatozoide diretamente no citoplasma do oócito, através da penetração da zona pelúcida e oolema por micromanipulação (Alper, 2012). Este procedimento permite assim ultrapassar os passos naturais de fertilização, tais como a capacitação dos espermatozoides e posterior reação acrossômica, assim como a capacidade de penetração no ovócito.

A ICSI é especialmente eficaz no tratamento da infertilidade de fator masculino grave, nomeadamente, com função testicular diminuída ou obstrução dos canais excretórios, resultando em oligozoospermia, astenozoospermia, teratozoospermia, ou ainda em casos de maior gravidade, de azoospermia obstrutiva e não obstrutiva, em que é necessária a recolha cirúrgica de espermatozoides (Vos e Steirteghem, 2005). Esta técnica é também utilizada em casos de baixo número ou má morfologia ovocitária, uma vez que permite avaliar com maior facilidade a maturidade e qualidade dos ovócitos. Também em casos de ovócitos com zona pelúcida espessa, o que dificulta a penetração espermática, e ainda em casos de polispermia recorrente, a ICSI pode constituir uma ótima alternativa (Palermo *et al.*, 2015).

Para além de ser uma técnica altamente especializada para o tratamento da infertilidade grave, a ICSI é indicada para algumas situações específicas, tais como casais em que apenas um dos elementos é portador de VIH, devendo estes recorrer a técnicas de RHA para evitar a transmissão do vírus ao parceiro e descendência; em ovócitos criopreservados, uma vez que estes parecem apresentar a zona pelúcida enrijecida, como resultado da criopreservação; ou ainda em casos de diagnóstico genético pré-implantação (DGPI), uma vez que, sendo necessária a desnudação ovocitária prévia, evita a contaminação com DNA espermático ou células do complexo *cumulus-coroa* (Neri *et al.*, 2012; Palermo *et al.*, 2015).

A técnica de ICSI é sempre associada a um protocolo de estimulação ovárica adequado, de modo a que seja possível recolher, por punção folicular vários ovócitos em apenas um ciclo (secções 4.1. e 4.2.). Após punção folicular, 32 a 36 horas depois da indução da ovulação com hCG, é realizada a pesquisa do líquido folicular, para recolha dos CCO, que posteriormente são lavados em meio tamponado pré-aquecido a 37°C e incubados a 37°C, 6% de CO<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub> em meio de incubação pré-equilibrado, coberto por óleo de parafina, tal como descrito para a técnica de FIV (Secção 5.2.).

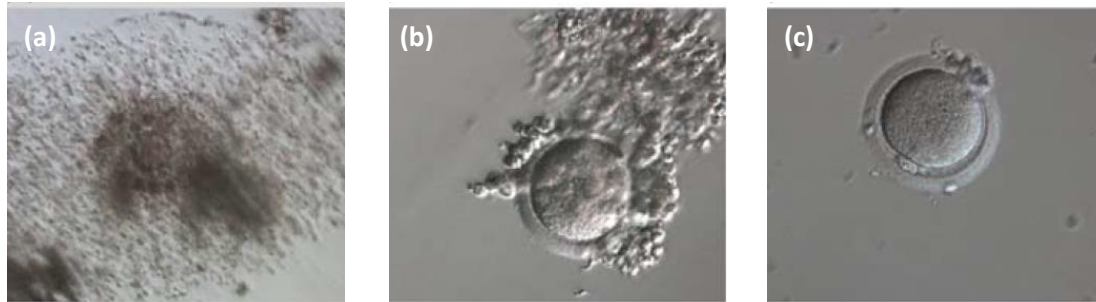
Para realização da ICSI, os ovócitos devem ser desnudados das suas camadas envolventes, para que seja possível avaliar previamente a sua maturidade e permitir a microinjeção através da oolema, sem obstrução por parte das células do *cumulus-coroa* (Neri *et al.*, 2012).

### 5.3.1. Desnudação de ovócitos

O processo de desnudação é realizado pelo método enzimático, seguida de desnudação mecânica (Figura 25). Para tal, os CCO são colocados em contacto com uma solução de enzima hialuronidase, pré-aquecida a 37°C, que será responsável por quebrar as ligações entre as células do *cumulus-coroa*, provocando a sua dispersão. Tanto a concentração da enzima, como a duração da exposição a esta deve ser limitada, pois pode resultar na ativação partenogenética dos oócitos (Vos e Steirteghem, 2005). Assim, após 10 a 15 segundos de atuação da enzima, os ovócitos são transferidos para meio tamponado, pré-aquecido a 37°C, para completar o processo de desnudação por ação mecânica. Assim, os ovócitos são pipetados sucessivamente até que todas as células sejam removidas. Durante todo o processamento dos ovócitos, estes são mantidos em ambiente estéril, em câmara de

fluxo laminar de grau 2, com superfície aquecida, de modo a minimizar as contaminações e variações de temperatura (Granot e Dekel, 2012).

Após desnudação, os ovócitos devem ser avaliados quanto à sua maturidade e qualidade, de modo a selecionar os ovócitos para inseminação (Secção 4.3.). Os ovócitos maduros, ou seja em MII, devem ser colocados em meio de cultura pré-equilibrado e incubados a 37°C, 6% de CO<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub>, até ao momento da microinjeção.



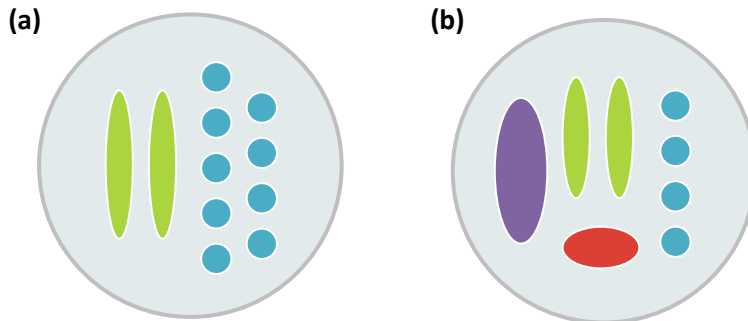
**Figura 25** | Imagens exemplificativas da sequência de desnudação de ovócitos por método enzimático e mecânico. (a) CCO antes do processo de desnudação, rodeado pelas células do *cumulus* (ampliação 100x); (b) CCO durante a incubação em solução enzimática de hialuronidase, evidenciando células da coroa radiata já dispersas (ampliação 200x); (c) Ovócito maduro (MII) após remoção de todas as células envolventes, com 1GP visível no EPV (ampliação 200x). (Adaptado de Rienzi *et al.*, 2012)

### 5.3.2. Protocolo de ICSI

Para realização da ICSI é necessário preparar uma placa de microinjeção, que deve conter gotas de meio tamponado, pré-aquecido a 37°C para colocar individualmente os ovócitos a microinjetar, e duas gotas alongadas de meio PVP, para colocar uma alíquota de espermatozoides. Estas são totalmente cobertas por uma camada de óleo de parafina, para prevenir variações bruscas de temperatura, aquando da ICSI (Figura 26a). Em casos graves de fator masculino, em que não se verifiquem espermatozoides móveis, quer a colheita seja realizada por ejaculação ou TESE, é necessário adaptar a placa de microinjeção e os espermatozoides devem ser submetidos a um teste de hipoosmolaridade de modo a confirmar a sua viabilidade, com base no pressuposto da integridade de membranas (Figura 26b).

Após pelo menos 20 minutos de incubação a 37°C, a placa de microinjeção deve ser carregada com os ovócitos MII nas respetivas gotas de meio tamponado e é colocada uma alíquota de suspensão espermática no topo de uma das gotas de meio PVP. O meio PVP é um meio que retarda a progressão dos espermatozoides. Deste modo, quando uma alíquota de suspensão espermática é colocada no topo de uma

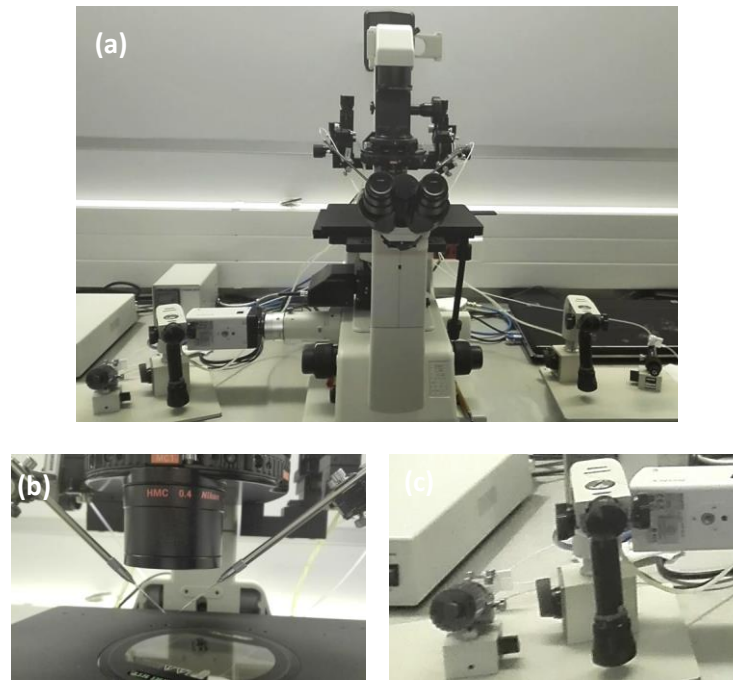
das gotas, os espermatozoides irão progredir lentamente, permitindo identificar os gâmetas móveis, facilitando igualmente a sua seleção e a aspiração.



**Figura 26** | Esquema de placas de microinjeção para casos normais (a) e de imobilidade (b). (a) Placa de microinjeção com duas gotas alongadas de PVP (verde) e gotas de meio tamponado (azul). (b) Placa de microinjeção com uma gota de espermatozoides imóveis ou polpa testicular recolhida por TESE (roxo), uma gota de meio hipotônico (vermelho), duas gotas alongadas de PVP (verde) e gotas de meio tamponado (azul).

A ICSI é realizada recorrendo a equipamento altamente especializado, incluindo um microscópio ótico invertido, com superfície aquecida e duas micropipetas de vidro, de sustentação e injeção, associadas aos respetivos micromanipuladores, cada um com um joystick hidráulico e um injetor, sobre uma plataforma anti-vibratória (Figura 27). O microscópio ótico deve conter uma ótica de contraste de face Hoffman, que permite uma melhor visualização do material biológico através de superfícies de plástico, tal com as placas de Petri normalmente utilizadas no processo de ICSI (Barnes, 2012; Elder e Dale, 2011). A ICSI é uma técnica altamente sensível, pelo que a utilização de micromanipuladores com sistema hidráulico permite a execução de movimentos suaves e precisos (Barnes, 2012).

A micropipeta de sustentação, ou *holding*, é utilizada para fixar o ovócito durante o processo de ICSI, enquanto a micropipeta de injeção, ou ICSI, é utilizada para aspirar e imobilizar os espermatozoides e penetrar nos ovócitos para depositar o respetivo gâmeto masculino (Barnes, 2012; Elder e Dale, 2011). As micropipetas de vidro são especialmente desenhadas para o processo de ICSI, pelo que apresentam, nas suas extremidades, um ângulo de 30°, de modo a ficarem paralelas ao fundo da placa de ICSI, facilitando a sua focagem (Barnes, 2012).



**Figura 27** | Equipamento especializado para técnicas de micromanipulação. (a) Microscópio ótico invertido, com superfície aquecida; (b) Pormenor de micropipetas de sustentação (esquerda) e injeção (direita) colocadas em posição para a realização de ICSI; Pormenor de micromanipulador, com um joystick hidráulico e injetor.

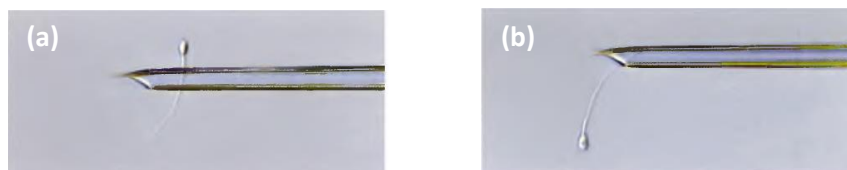
Todo o procedimento de ICSI deve ser realizado sob superfície aquecida a 37°C e com temperatura e qualidade do ar controlada, de modo a assegurar as melhores condições e evitar variações bruscas de temperatura, que se sabem afetar gravemente o fuso meiótico dos gâmetas femininos, prejudicando o potencial de divisão celular e, conseqüentemente, o desenvolvimento embrionário (Barnes, 2012; Elder, 2005).

#### 5.3.2.1. Seleção de espermatozoides

O primeiro passo da ICSI consiste na seleção dos espermatozoides de melhor qualidade para microinjeção e respetiva imobilização. Assim, os espermatozoides são avaliados ao microscópio ótico invertido quanto à sua motilidade e morfologia. Após seleção de um espermatozoide, este é aspirado com a micropipeta de injeção e transferido para a segunda gota de meio PVP. Nesta gota, o espermatozoide deve ser imobilizado através de pressão mecânica, de modo a permeabilizar a membrana espermática, permitindo a libertação de fatores citosólicos que contribuem para a ativação do ovócito e, conseqüentemente, melhores taxas de fertilização (Elder e Dale, 2011; Neri *et al.*, 2012).

Para tal, deve ser realizado um movimento rápido e firme com a micropipeta de injeção sob a cauda do espermatozoide, o mais próximo possível da cabeça, evitando, no entanto, atingir a peça intermédia e separar a cauda da restante estrutura (Figura 28a). Caso tal aconteça, os espermatozoides não devem ser utilizados, por risco de se encontrarem danificados e sem potencial de fertilização (Neri *et al.*, 2012).

Após seleção e imobilização do espermatozoide, este deve ser aspirado pela cauda com a micropipeta de injeção e transferido até à gota de meio tamponado, onde se encontra o ovócito a microinjetar (Figura 28b).



**Figura 28** | Processo de imobilização e aspiração de espermatozoides selecionados para microinjeção. (a) Imobilização de espermatozoide por movimento rápido e firme com a micropipeta de injeção sob a cauda; (b) Aspiração do espermatozoide pela cauda, para posterior microinjeção. (Adaptado de Veeck, 1999)

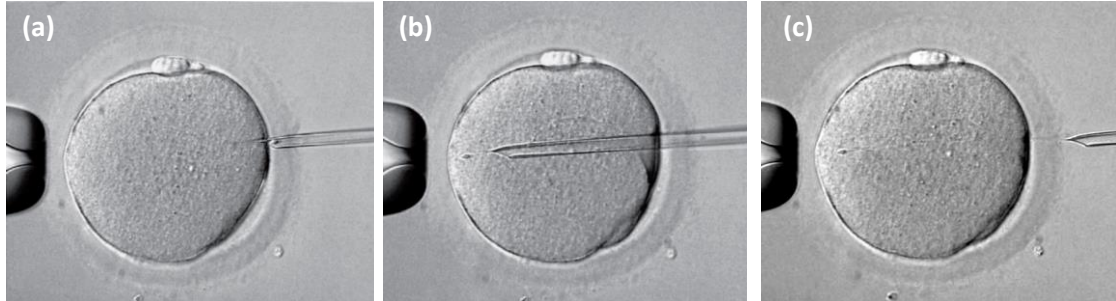
#### 5.3.2.2. Microinjeção de espermatozoide

A microinjeção de espermatozoide no ovócito é um passo extremamente complexo. Para que o procedimento seja efetuado corretamente, os planos de focagem são muito importantes, uma vez que estamos a lidar com estruturas tridimensionais, como os ovócitos que devem ser microinjetados no plano equatorial.

Inicialmente, o ovócito deve ser colocado com o GP numa posição de 90° relativamente às micropipetas e fixado, recorrendo-se para tal à micropipeta de sustentação. Esta deve ser devidamente focada em relação à membrana citoplasmática do ovócito, permitindo que este seja ligeiramente aspirado numa posição equatorial, fixando o ovócito sem alterar a sua orientação. A posição do GP é essencial para que a microinjeção seja realizada sem danificar o fuso meiótico (Elder e Dale, 2011).

Após fixação do ovócito, a micropipeta de injeção, contendo o espermatozoide na sua extremidade, deve ser devidamente focada e aproximada do ovócito (Figura 29a). O espermatozoide deve permanecer na extremidade da micropipeta, de modo a que durante a injeção seja expelido com o mínimo de volume de meio possível (Vos e Steirteghem, 2005). Com movimento suave, a micropipeta deve ser pressionada contra o ovócito e penetrar a ZP e a oolema. Já no interior do ovócito, deve avançar-se a pipeta até à extremidade oposta ao local de penetração. Posteriormente, aspira-se

parte do citoplasma ovocitário, um importante estímulo adicional na ativação ovocitária (Neri *et al.*, 2012), expelindo-o de seguida juntamente com o espermatozoide (Figura 29b). Por conseguinte, a micropipeta deve ser retirada lentamente e por fim o ovócito é libertado da pipeta de sustentação, terminando a microinjeção (Figura 29c).



**Figura 29** | Imagens exemplificativas do procedimento de microinjeção. (a) Aproximação da pipeta de injeção contendo na sua extremidade o espermatozoide; (b) Penetração da ZP e oolema com a micropipeta de injeção e deposição do espermatozoide no citoplasma ovocitário; (c) Remoção da micropipeta de injeção, permanecendo o espermatozoide bem evidenciado no interior do ovócito. (Adaptado de Neri *et al.*, 2012)

Após microinjeção de todos os ovócitos, estes são retirados da placa de ICSI e incubados a 37°C, 6% de CO<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub>, em meio de cultura de embriões pré-equilibrado. A fertilização deve ser avaliada 16 a 18 horas após microinjeção, pela presença de dois glóbulos polares e dois pronúcleos (ASiRM e ESIGoE, 2011), devendo os pré-zigotos ser novamente incubados a 37°C, 6% de CO<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub>, para desenvolvimento embrionário, até à data da transferência intrauterina.

Nos casos em que não se verifique fertilização após FIV, é possível realizar ICSI de recurso, de acordo com o mesmo procedimento, embora esta prática seja discutível, pois é necessário ter a certeza de que se trata de falha completa de fertilização (Elder e Dale, 2011).

Na maioria dos ciclos de ICSI, a ausência de fecundação é atribuída a uma falha na ativação ovocitária (Gianaroli *et al.*, 2012). Outros casos de falha de fertilização podem dever-se a morfologia ovocitária anormal, ovócitos frágeis facilmente danificados pelo processo de ICSI ou ainda baixa qualidade espermática. Nos casos de azoospermia, em que é necessário recorrer à microinjeção de células germinativas imaturas, por ausência de espermatozoides, são também recorrentes baixas taxas de fertilização (Elder e Dale, 2011).



## 6. Desenvolvimento Embrionário

### 6.1. Avaliação da fertilização

A fertilização é um dos passos mais determinantes do sucesso das técnicas de RHA. A sua avaliação deve ocorrer cerca de 16 a 18 horas após inseminação, de modo a que o processo de fertilização ocorra completamente (ASiRM e ESIGoE, 2011). Para isso, após a interação espermatozoide-ovócito, vários eventos ocorrem, desde a penetração do espermatozoide, fusão das membranas dos gâmetas, ativação do ovócito e formação dos pronúcleos (PN), com progressiva migração para a zona central do ovócito, formando-se o pré-zigoto (Papale *et al.*, 2012).

Um pré-zigoto ideal deve apresentar uma morfologia esférica, com citoplasma homogéneo, contendo dois pronúcleos (PN) centrais justapostos e dois glóbulos polares (GP) no espaço perivitelino (EPV) (Figura 30). Os PN devem ser de tamanho semelhante, com membranas distintas e apresentar corpos percursores de nucléolos (CPN), em número e tamanho equivalentes, idealmente alinhados equatorialmente na região de justaposição das membranas dos PN (ASiRM e ESIGoE, 2011).



**Figura 30** | Imagem exemplificativa de um pré-zigoto ideal, contendo dois GP no EPV e dois PN centrais com os respectivos CPN justapostos. (Adaptado de Elder e Dale, 2011)

A classificação dos PN, segundo o consenso de Istanbul, pode ser realizada em três categorias: simétricos, não simétricos e anormais, tendo em conta a morfologia dos PN e CPN (Tabela 5). Esta avaliação tem demonstrado um importante papel como prognóstico da competência embrionária (ASiRM e ESIGoE, 2011).

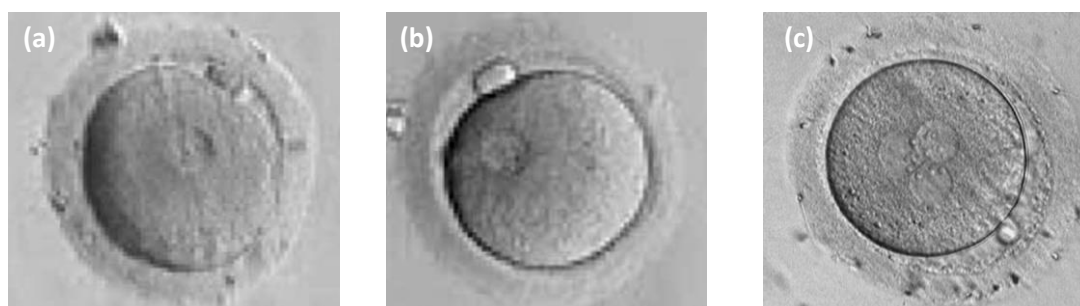
**Tabela 15** | Sistema de classificação dos pronúcleos (PN) de pré zigotos, consoante a sua organização espacial e o número e alinhamento de corpos percursores de nucléolos (CPN). (Adaptado de ASiRM e ESIGoE, 2011)

Classificação	Descrição
Simétrico	PN com igual número de CPN de tamanho semelhante, quer alinhados na justaposição dos PN, quer igualmente dispersos nos dois PN
Não simétrico	Qualquer outra organização, tanto dos PN como dos seus CPN, incluindo PN periféricos
Anormal	PN com apenas um CPN ou nenhum

Embora a presença de dois pronúcleos seja um indicativo do sucesso da inseminação ovocitária, a sua ausência não indica necessariamente uma falha na fertilização. Assim, podem verificar-se pré-zigotos contendo 2GP no EPV apresentando, no entanto, apenas 1PN (Figura 31a). Neste caso, o ovócito pode encontrar-se corretamente fertilizado, apresentando, contudo, uma assincronia na formação ou fusão dos seus PN (Elder e Dale, 2011; Papale *et al.*, 2012). Estes casos podem dever-se a alterações endócrinas ou morfológicas dos ovócitos ou ainda a espermatozoides de má qualidade (Elder e Dale, 2011). Os embriões resultantes podem apresentar um correto desenvolvimento, embora com uma maior incidência de aneuploidias comparativamente aos embriões derivados de ovócitos 2PN (Elder e Dale, 2011; Papale *et al.*, 2012).

Por outro lado, pré-zigotos 1PN podem também indicar uma ativação partenogénica do ovócito, indicando, neste caso, uma falha no processo de fertilização (Figura 31b). Estes pré-zigotos têm capacidade de clivagem, mas não apresentam um correto desenvolvimento embrionário. Nestes casos, é comum observar-se apenas 1GP no EPV e, dada a haploidia dos pré-zigotos, estes não devem ser transferidos (Papale *et al.*, 2012).

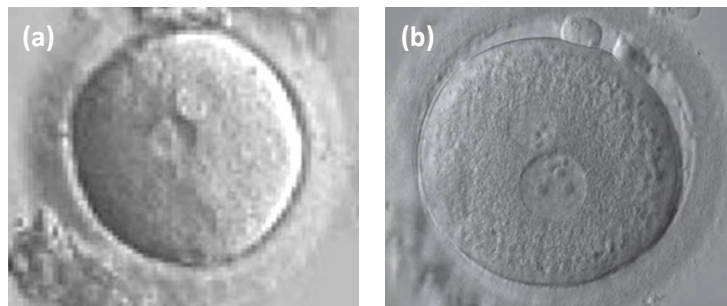
As falhas de fertilização podem, por outro lado, originar pré-zigotos com 3 ou mais PN (Figura 31c). Nos casos de ICSI, os zigotos triploides ocorrem devido à falha na extrusão do 2ºGP, observando-se pré-zigotos 3PN com 1GP. Já em FIV, pode também ocorrer a entrada de mais do que um espermatozoide no ooplasma, devido à incapacidade de bloqueio da polispermia por parte do ovócito. Nestas situações, é recorrente observar-se 2GP no EPV e, tal como numa fertilização normal, os zigotos têm capacidade de clivagem, salientando a importância da avaliação da fertilização num período de tempo específico (Papale *et al.*, 2012).



**Figura 31** | Imagens exemplificativas de pré-zigotos com fertilização anormal (Ampliação de 200x). (a) Pré-zigoto com 1 PN e 2GP no EPV. (b) Pré-zigoto com 1PN e apenas 1GP no EPV; (c) Pré-zigoto com 3PN e 1GP no EPV. (Adaptado de Papale *et al.*, 2012 (a e b) e Elder e Dale, 2011 (c))

### 6.1.1. Avaliação de pronúcleos

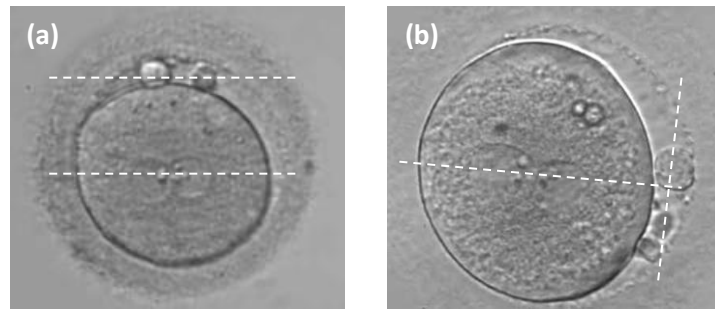
Em condições normais, os PN apresentam tamanho semelhante, embora o PN feminino possa ser ligeiramente menor (Papale *et al.*, 2012). A presença de PN com diâmetro muito inferior ao normal pode indicar um atraso no processo de fertilização, resultante de anomalias nos gâmetas ou imaturidade ovocitária (Figura 32a) (Papale *et al.*, 2012). Por outro lado, os PN podem apresentar tamanhos significativamente diferentes entre si ( $> 4\mu\text{m}$  de diferença), o que parece estar associado a anomalias cromossômicas e consequente baixo potencial de desenvolvimento embrionário (Figura 32b) (ASiRM e ESIGoE, 2011; Papale *et al.*, 2012).



**Figura 32** | Imagens exemplificativas de pré-zigotos com PN de tamanho anormal. (a) Pré-zigoto com PN menores do que o normal; (b) Pré-zigotos com um PN significativamente inferior ao outro de diâmetro normal. (Adaptado de Papale *et al.*, 2012 e Ebner, 2012, respetivamente)

O alinhamento dos PN relativamente aos GP é essencial para determinar o correto plano de clivagem e, conseqüentemente, o normal desenvolvimento embrionário (ASiRM e ESIGoE, 2011; Papale *et al.*, 2012). Assim, após a extrusão do 2ºGP, os microtúbulos, organizados pelos centríolos masculinos, promovem o alinhamento dos PN paralelamente ao plano dos GP (Figura 33a). Posteriormente, os PN sofrem novamente rotação, posicionando-se perpendicularmente ao plano dos GP (Figura 33b). Este alinhamento dos PN, que devem encontrar-se justapostos e numa posição central, vai permitir uma correta clivagem (Papale *et al.*, 2012).

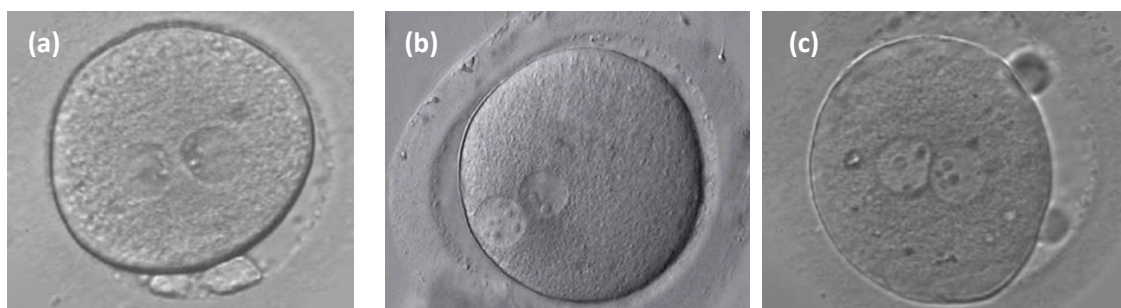
Como resultado dos movimentos e rotações dos PN, ocorre uma distribuição das mitocôndrias e alinhamento da cromatina, podendo levar à formação uma região periférica translúcida, designada por halo (Papale *et al.*, 2012).



**Figura 33** | Imagens exemplificativas do alinhamento dos PN relativamente ao plano dos GP. (a) Pré-zigoto com 2PN centrais e justapostos, paralelos ao plano dos GP; (b) Pré-zigoto com 2PN centrais e justapostos, perpendiculares ao plano dos GP. (Adaptado de Papale *et al.*, 2012)

Quando ocorrem falhas no posicionamento dos PN, nomeadamente, o posicionamento central e justapostos, estes podem apresentar-se separados (Figura 34a). Esta condição parece resultar num grave atraso ou mesmo paragem do desenvolvimento embrionário. Os PN podem também encontrar-se numa posição periférica, levando a que a clivagem ocorra segundo o eixo dos pronúcleos, resultando frequentemente em morfologia e clivagem anormal, assim como em paragem no desenvolvimento embrionário (Figura 34b) (Papale *et al.*, 2012).

Em condições normais, os GP apresenta-se próximos, pelo que, quando se verifica um grande afastamento destas estruturas, prevê-se um baixo potencial de desenvolvimento embrionário, com clivagem desigual ou fragmentação. Isto ocorre devido a uma incorreta orientação dos PN e conseqüente elevado grau de perturbação do citoplasma (Figura 34c).

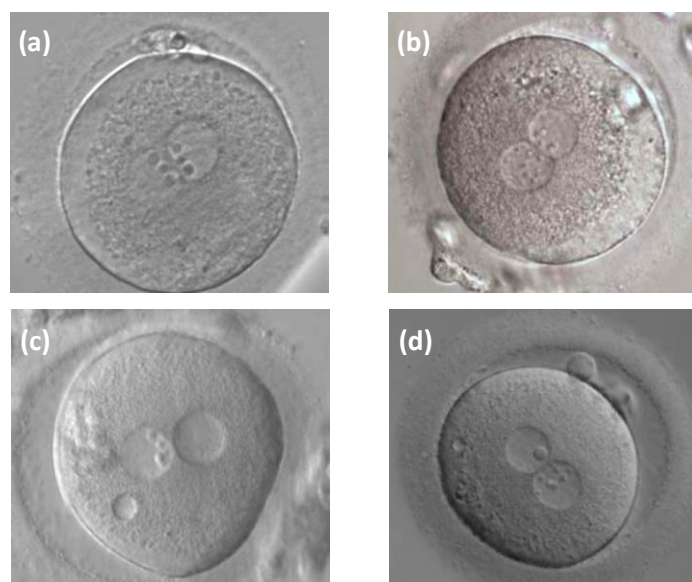


**Figura 34** | Imagens exemplificativas de anomalias no posicionamento dos PN e GP. (a) Pré-zigoto com 2PN centrais, mas não justapostos; (b) Pré-zigoto com 2PN justapostos e periféricos; (c) Pré-zigoto com 2PN centrais e justapostos e 2GP no EPV afastados entre si. (Adaptado de Papale *et al.*, 2012 (a e c) e Ebner, 2012 (b))

### 6.1.2. Avaliação dos corpos percursores de nucléolos

Durante a formação do PN, após fertilização do ovócito, os corpos percursores de nucléolos (CPN) começam a evidenciar-se e, à medida que a cromatina se distribui de forma polarizada, os CPN alinham-se. Ao longo do processo de divisão celular, os CPN variam em número, tamanho e distribuição espacial, acabando por se fundirem num único nucléolo, o qual é responsável pela síntese de pré-rRNA, essencial à tradução da informação genética embrionária (Papale *et al.*, 2012). Assim, qualquer assincronia nestes eventos pode comprometer o desenvolvimento embrionário.

Deste modo, é esperado um padrão de distribuição dos CPN variável ao longo do tempo, com tendência à diminuição do número e ao aumento do tamanho, sendo que, no entanto, este deve ser sempre semelhante entre os dois PN, quer se encontrem alinhados na região de justaposição ou dispersos de forma uniforme nos PN (Figura 35a). Qualquer outra organização dos CPN é considerada assimétrica, segundo a classificação do consenso de Istanbul (Figura 35b) (ASiRM e ESIGoE, 2011). CPN pequenos ou de diferente tamanho pode indicar defeitos funcionais do nucléolo com conseqüente transtorno da síntese de rRNA (Papale *et al.*, 2012). PN com CPN em diferente número estão associados a função cromossomal aberrante (Papale *et al.*, 2012). No caso de se verificar apenas um ou nenhum CPN, os PN são classificados como anormais, estando associados a anomalias epigenéticas e de desenvolvimento (Figura 35c e 35d) (ASiRM e ESIGoE, 2011; Papale *et al.*, 2012).



**Figura 35** | Imagens exemplificativas de pré-zigotos com diferente organização, número e tamanho de CPN. (a) Pré-zigoto com 2PN centrais e justapostos com igual número de CPN de grandes dimensões, alinhados na zona de justaposição dos PN. (b) Pré-zigoto com 2PN centrais e justapostos, com diferente número e organização dos CPN; (c) Pré-zigoto com 2PN centrais e justapostos, em que um dos PN não apresenta nenhum CPN; (d) Pré-zigoto com 2PN centrais e justapostos, em que um dos PN apresenta apenas um único CPN. (Adaptado de Papale *et al.*, 2012)

### 6.1.3. Avaliação citoplasmática

Embora seja esperado um citoplasma homogêneo nos pré-zigotos, a presença de determinadas anomalias citoplasmáticas, tais como a presença de corpos refrateis e de um halo citoplasmático, não apresentam evidências suficientes que suportem um prognóstico negativo (Figura 36a e 36c) (Papale *et al.*, 2012).

Por outro lado, anomalias mais severas podem afetar o correto desenvolvimento embrionário e, portanto, devem ser avaliadas. A presença de agregados de organelos pode indicar aneuploidia, sendo um indicador de baixo potencial de implantação e gravidez, embora a qualidade embrionária não seja afetada (Figura 36b) (Papale *et al.*, 2012). A presença de vacúolos de grandes dimensões (> 24µm diâmetro) pode interferir com os planos de clivagem, afetando o desenvolvimento embrionário (Figura 36c). A anomalia citoplasmática mais severa refere-se à presença de agregados de RE, sendo que, nestes casos, os embriões resultantes não devem ser transferidos (ASiRM e ESIGoE, 2011).



**Figura 36** | Imagens exemplificativas de pré-zigotos com anomalias citoplasmáticas. (a) Pré-zigoto com 2PN centrais e justapostos, em que se pode observar um halo citoplasmático; (b) Pré-zigoto com 2PN periféricos com uma severa agregação de organelos; (c) Pré-zigoto com 2PN centrais e justapostos, evidenciando dois grandes vacúolos e corpos refrateis. (Adaptado de Papale *et al.*, 2012)

## 6.2. Cultura embrionária

Após avaliação da fertilização, os pré-zigotos são colocados em meio de cultura coberto por óleo de parafina, e incubados a 37°C, 6% de CO<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub>, para desenvolvimento embrionário, até à data da transferência intrauterina. Estas condições têm como objetivo a manutenção dos parâmetros de temperatura, pH e osmolaridade estáveis, evitando a exposição dos embriões a ambiente desfavorável (Elder, 2005).

A cultura de embriões deve ser mantida até ao dia da transferência, que se pode realizar no segundo ou terceiro dia de desenvolvimento embrionário, idealmente com embriões de 4 ou 8 células, respetivamente, ou ser estendida até à fase de blastocisto, no quinto ou sexto dia (Gardner e Lane, 2012). Caso a cultura dos embriões seja prolongada para além do dia 3, as necessidades nutricionais dos embriões alteram-se, como resultado da ativação do genoma embrionário (Prados *et al.*, 2012). Deste modo, foi necessário o desenvolvimento de meios de cultura adequados ao completo desenvolvimento de embriões até à fase de blastocisto, existindo, atualmente, dois sistemas de cultura embrionários disponíveis – a cultura sequencial e a monocultura (Hardarson *et al.*, 2012).

O sistema sequencial consiste na cultura dos embriões em dois meios distintos, consoante a fase de desenvolvimento, o que pretende mimetizar o ambiente do trato reprodutor feminino, em que o embrião é exposto a um gradiente de nutrientes à medida que é transportado das trompas para o útero (Gardner e Lane, 2012). Este tipo de cultura sequencial implica a transferência dos embriões ao 3º dia para uma nova placa de 4 poços, contendo 0,5mL de meio de cultura apropriado, coberto por óleo de parafina. Os embriões serão novamente incubados a 37°C, 6% de CO<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub> até à transferência ao 5º ou 6º dia.

Com os progressos no estudo da cultura embrionária, tem vindo a ser demonstrado que os meios de cultura contínua, ou monocultura, podem também constituir uma alternativa válida e segura para o desenvolvimento embrionário. A monocultura baseia-se no princípio de que o embrião irá usufruir dos nutrientes de que necessita ao longo do seu desenvolvimento (Gardner e Lane, 2012). Nestes casos, os embriões irão manter-se no mesmo meio de cultura, desde o momento da avaliação da fertilização até ao dia da transferência, reduzindo a manipulação embrionária (Gardner e Lane, 2012).

### 6.2.1. Sistema de Time-lapse

Ao longo dos últimos anos, várias têm sido as tecnologias desenvolvidas e aperfeiçoadas no sentido de melhorar o sucesso das técnicas de RHA e assim ajudar grupos de pacientes específicos, que de outra forma não seriam capazes de realizar o seu sonho de ter um filho. Neste sentido, uma nova tecnologia tornou-se disponível para monitorização de embriões em ambiente clínico, de tal forma que a seleção de embriões para transferência seja o mais correta e objetiva possível.

A tecnologia de Time-lapse consiste na captação de imagens em intervalos de tempo regulares, do desenvolvimento dos embriões em cultura, sem que para tal seja necessário retirá-los das condições ótimas de incubação (Kovacs, 2014). Esta tecnologia tem sido largamente explorada no sentido de melhorar a eficiência de seleção embrionária, uma vez que permite recolher uma grande quantidade de imagens do padrão de clivagem e alterações morfológicas muito mais representativas quando comparado com o sistema de avaliação clássica (Conaghan *et al.*, 2013; Kirkegaard *et al.*, 2015).

Nos últimos 5 anos, vários modelos de seleção embrionária têm sido desenvolvidos com base em observações de imagens de time-lapse, propondo um conjunto de variáveis morfocinéticas de classificação embrionária (Basile *et al.*, 2014; Campbell *et al.*, 2013; Conaghan *et al.*, 2013; Cruz *et al.*, 2012; Meseguer *et al.*, 2011; Rubio *et al.*, 2012; Wong *et al.*, 2010).

Desta forma, os sistemas de Time-lapse permitem acompanhar de uma forma contínua e segura a dinâmica de desenvolvimento embrionário e assim selecionar objetivamente para transferência os embriões com um potencial de implantação superior (Kovacs, 2014). Esta tecnologia veio, assim, revolucionar a transferência de embriões, permitindo a seleção e transferência de um menor número de embriões em cada caso, até idealmente apenas um embrião, e deste modo diminuir o risco de gravidez múltipla (Kirkegaard *et al.*, 2012; Kovacs, 2014).

Um dos primeiros estudos utilizando a tecnologia de Time-lapse, para análise de dinâmica de embriões, registou a primeira observação da extrusão do glóbulo polar e formação de pronúcleos (Payne *et al.*, 1997). Desde então, várias foram as descobertas no campo da embriologia, incluindo a demonstração de reabsorção de fragmentos celulares em blastómeros de embriões em fase de clivagem (Hardarson *et al.*, 2002; Lemmen *et al.*, 2008), a determinação dos ciclos de colapso-expansão de blastocistos (Mio e Maeda, 2008; Niimura, 2003; Payne *et al.*, 2007) e a ocorrência de



clivagem reversa, ou seja a fusão de blastómeros de embriões em fase de clivagem (Hickman *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014; Montag *et al.*, 2014). Mais importante ainda, vários estudos retrospectivos têm sido desenvolvidos no sentido de estabelecer marcadores cinéticos e morfológicos preditivos da capacidade de desenvolvimento embrionário, aneuploidias, potencial de implantação e taxas de gravidez. Entre eles, é possível destacar o tempo desde a fecundação até ao desaparecimento dos PN e até à primeira clivagem; a duração da primeira citocinese; a sincronia no aparecimento dos núcleos após a 1ª clivagem; o período de tempo entre a 1ª e 2ª mitose; a sincronia da 2ª e 3ª mitose e o período de tempo até atingir a fase de 5 células (Chen *et al.*, 2013; Wong *et al.*, 2013).

Tem também sido demonstrado, que, inerentemente às vantagens da tecnologia de time-lapse, a cultura e seleção de embriões nestes sistemas de monitorização parecem melhorar as taxas de gravidez e implantação e reduzir a ocorrência de aborto espontâneo precoce (Meseguer *et al.*, 2012; Rubio *et al.*, 2014).

Atualmente, vários sistemas de Time-lapse encontram-se disponíveis comercialmente para uso clínico, incluindo as duas tecnologias mundialmente mais utilizadas, o sistema PrimoVision (Vitrolife, Suécia)<sup>1</sup> e o EmbryoScope (Vitrolife, Suécia)<sup>2</sup> e, mais recentemente disponibilizado, o sistema EscoMiri (Esco, Dinamarca)<sup>3</sup>, que se baseiam numa tecnologia de campo claro, enquanto o sistema Eeva (*Early Embryonic Viability Assessment*; Auxogyn, Estados unidos da América)<sup>4</sup> utiliza tecnologia de campo escuro. Todos os sistemas, embora variem nas suas características técnicas individuais (Tabela 6), incorporam um microscópio invertido digital que capta imagens dos embriões em intervalos que podem variar entre os 2 a 20 minutos, dependendo não só do tipo de sistema, mas da quantidade de embriões em cultura e do número de planos focais que se pretende observar (Campbell e Fishel, 2015; Kovacs, 2014). As imagens são posteriormente processadas e armazenadas, através dos *software* disponibilizados em cada sistema, permitindo a composição de um pequeno vídeo que possibilita a análise retrospectiva detalhada dos eventos ocorridos ao longo do desenvolvimento embrionário. Em particular, o sistema Eeva apresenta um *software* de avaliação automático dos parâmetros de qualidade embrionária, indicando qual o embrião com maior potencial de desenvolvimento, tendo em conta a cinética de clivagem até ao 3º dia (Kovacs, 2014). Contudo, a utilização de um algoritmo computadorizado poderá implicar uma classificação embrionária incorreta, baseada em falsas deteções ou eventos perdidos (Wong *et al.*, 2013).

Muito recentemente, foi disponibilizada uma nova tecnologia de time-lapse, o sistema Geri (Genea Biomedx, Austrália)<sup>5</sup> que consiste numa incubadora independente, com sistema de time-lapse integrado, à semelhança do sistema EmbryoScope e EscoMiri. Esta parece ter a vantagem de, à semelhança do sistema EscoMiri, apresentar seis câmaras totalmente individualizadas, cada uma com uma câmara própria, permitindo assim a efetiva manutenção dos embriões de cada caso clínico em condições ótimas, desde o momento da fertilização até ao momento da transferência. Portanto, qualquer perturbação, tais como oscilações de temperatura aquando da abertura de uma das câmaras, não terá qualquer impacto sobre o restante sistema<sup>3 e 5</sup>.

**Tabela 16** | Comparação de parâmetros técnicos de sistemas de Time-lapse atualmente disponíveis. (Adaptado de Campbell e Fishel, 2015 e Kovacs, 2014)

	EmbryoScope	PrimoVision	Eeva	EscoMiri
<b>Tipo de sistema</b>	Incubadora com sistema de time-lapse integrado	Microscópio inserido em incubadoras convencionais	Microscópio inserido em incubadoras convencionais	Incubadora com sistema de time-lapse integrado
<b>Nº máximo de embriões por placa</b>	12	12	9 ou 16	14
<b>Tipo de cultura</b>	Cultura individual	Cultura em grupo	Cultura em grupo	Cultura individual
<b>Nº total de embriões por sistema</b>	72	48	54 ou 96	84
<b>Número máximo de planos focais</b>	9	1	11	Ilimitado
<b>Frequência de captação de imagem</b>	A partir de 10 minutos (2 minutos com apenas um plano focal)	A partir de 5 minutos	5 minutos	5 minutos
<b>Iluminação</b>	Campo claro (LED vermelho de baixa intensidade)	Campo claro (LED verde de alta intensidade)	Campo escuro	Campo claro (LED vermelho de baixa intensidade)

<sup>1</sup> <http://www.vitrolife.com/en/Products/Primo-Vision-Time-Lapse-System/>, acedido a 06-08-2016

<sup>2</sup> <http://www.vitrolife.com/en/Products/EmbryoScope-Time-Lapse-System/>, acedido a 06-08-2016

<sup>3</sup> <http://medical.escoglobal.com/product/time-lapse-embryo-incubator/1/en/>, acedido a 06-08-2016

<sup>4</sup> <https://www.eevatest.com/>, acedido a 06-08-2016

<sup>5</sup> <http://www.geneabiomedx.com/Geri>, acedido a 06-08-2016

### 6.3. Avaliação da qualidade embrionária

A avaliação da qualidade embrionária é essencial para uma correta seleção de embriões para transferência intrauterina e consequente para o sucesso das técnicas de RHA. Neste sentido, foi desenvolvido um sistema de classificação de embriões, que pretende uniformizar os tempos de observação após inseminação, tendo em conta a taxa de desenvolvimento embrionário e as características morfológicas associadas a cada fase de desenvolvimento (Tabela 7) (ASiRM e ESIGoE, 2011).

Após a avaliação de fertilização, os embriões podem ser novamente avaliados no dia 1 para analisar um possível estado de singamia ou clivagem precoce. Assim,  $23 \pm 1$  horas após inseminação é esperado que cerca de 50% dos zigotos tenham já fundidos os seus PN, ou seja, tenha ocorrido singamia (ASiRM e ESIGoE, 2011). A clivagem precoce, ou seja, a ocorrência da primeira divisão mitótica antes das  $26 \pm 1$  horas após ICSI ou  $28 \pm 1$  horas após FIV, pode indicar uma boa qualidade embrionária, capacidade de desenvolvimento até à fase de blastocisto e elevadas taxas de gravidez (Prados *et al.*, 2012).

**Tabela 17** | Tempos de observação de pré-zigotos e embriões em cultura e respetiva fase de desenvolvimento esperada. (Adaptado de ASiRM e ESIGoE, 2011)

Tipo de Observação	Horas após inseminação	Fase de desenvolvimento esperada
Fertilização	$17 \pm 1$	Pronúcleos
Singamia	$23 \pm 1$	50% em singamia (20% com 2 células)
Clivagem precoce	$26 \pm 1$ (ICSI)	2 células
	$28 \pm 1$ (FIV)	
Embrião Dia 2	$44 \pm 1$	4 células
Embrião Dia 3	$68 \pm 1$	8 células
Embrião Dia 4	$92 \pm 2$	Mórula
Embrião Dia 5	$116 \pm 2$	Blastocisto

### 6.3.1. Avaliação de embriões em fase de clivagem (Dia 2 e 3)

Para avaliar a qualidade embrionária de embriões em fase de clivagem, os embriões em cultura devem ser observados 43 a 45 horas após a inseminação (Dia 2) e 67 a 69 horas após a inseminação (Dia 3), tendo por base a avaliação do número e simetria de blastómeros, grau de fragmentação e presença de multinucleação (Tabela 8).

Assim, um embrião ideal de segundo dia deve conter 4 blastómeros de igual tamanho, mononucleados, num rearranjo tridimensional tetraédrico e com fragmentação inferior a 10%. Um embrião ideal de dia 3 deve conter 8 blastómeros mononucleados de igual tamanho e apresentar fragmentação inferior a 10% (ASiRM e ESIGoE, 2011).

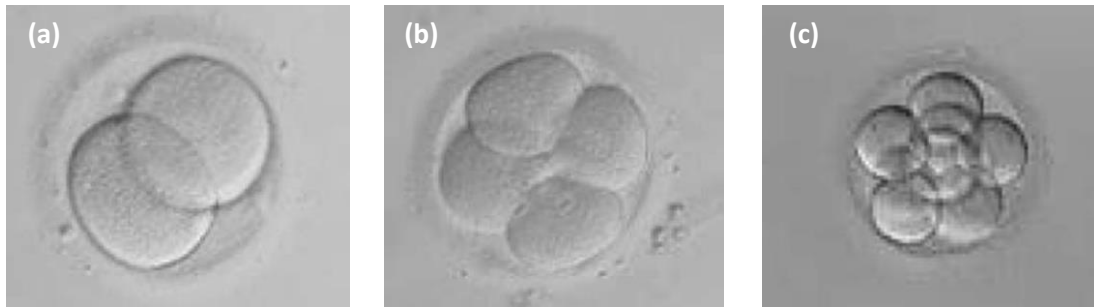
**Tabela 18** | Sistema de classificação de embriões em fase de clivagem (Dias 2 e 3), consoante o grau de fragmentação, o tamanho e simetria dos blastómeros e a nucleação. (Adaptado de ASiRM e ESIGoE, 2011)

Grau	Classificação	Descrição
1	<b>Bom</b>	Fragmentação leve (< 10%) Tamanho de blastómeros adequado Ausência de multinucleação
2	<b>Razoável</b>	Fragmentação moderada (10 a 25%) Maioria dos blastómeros com tamanho adequado Ausência de multinucleação
3	<b>Mau</b>	Fragmentação severa (> 25%) Tamanho de blastómeros não adequado Evidência de multinucleação

#### 6.3.1.1. Número de blastómeros

O estado de desenvolvimento do embrião, definido pelo número de blastómeros que este apresenta, é um fator preditivo essencial da capacidade de implantação e gravidez. Assim, um embrião de boa qualidade deve apresentar duas células no dia 1 (clivagem precoce), 4 células no dia 2 e 8 células no dia 3 (Figura 37). Alterações a este padrão, ou seja, embriões com taxas de clivagem mais ou menos

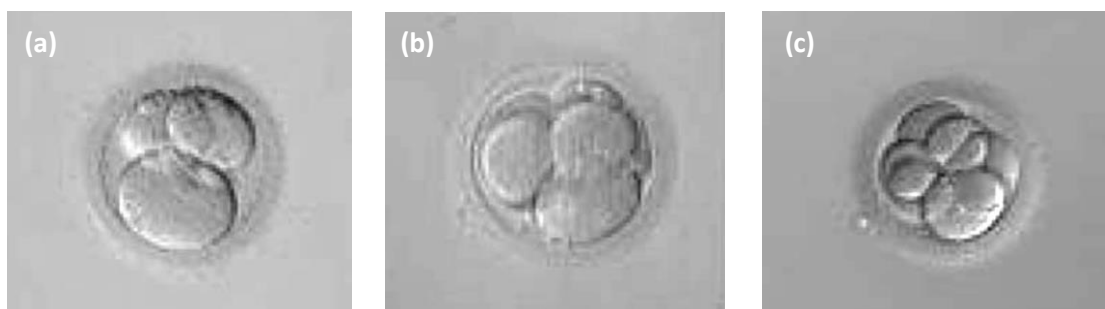
rápidas apresentam menor potencial de sucesso de implantação e gravidez, como resultado de maior incidência de anomalias cromossômicas (ASiRM e ESIGoE, 2011).



**Figura 37** | Imagens exemplificativas de embriões com número de células específico de cada fase de desenvolvimento. (a) Embrião de 2 células de igual tamanho, sem fragmentação; (b) Embrião de 4 células de igual tamanho, sem fragmentação (Dia 2); (c) Embrião de 8 células de igual tamanho, sem fragmentação (Dia 3). (Adaptado de Prados *et al.*, 2012)

#### 6.3.1.2. Tamanho e simetria de blastómeros

O tamanho relativo dos blastómeros depende tanto da fase de clivagem, como da regularidade de cada divisão celular (Prados *et al.*, 2012). Assim, é esperado que em cada fase do desenvolvimento de embriões em fase de clivagem os blastómeros tenham todos tamanho semelhante entre si, quer tenham 2, 4 ou 8 células, sendo o seu tamanho progressivamente reduzido (ASiRM e ESIGoE, 2011; Prados *et al.*, 2012). Por outro lado, embriões com qualquer outro número de células deverão apresentar blastómeros de diferente tamanho, visto haver uma assincronia na divisão de um ou mais blastómeros (Figura 38) (Prados *et al.*, 2012).



**Figura 38** | Imagens exemplificativas de embriões em fase de clivagem com blastómeros de diferentes tamanhos, embora específicos da fase de desenvolvimento. (a) Embrião de 3 células, com duas células de menor tamanho e uma maior; (b) Embrião de 5 células, com duas células de menor tamanho e três maiores; (c) Embrião de 6 células, com quatro células de menor tamanho e duas maiores. (Adaptado de Prados *et al.*, 2012)

### 6.3.1.3. Fragmentação

A fragmentação é considerada um parâmetro essencial da avaliação do desenvolvimento embrionário, uma vez que embriões com fragmentação elevada e persistente são provavelmente menos viáveis (Prados *et al.*, 2012). A fragmentação é definida pela presença de estruturas citoplasmáticas extracelulares rodeadas por membrana, que se originam aquando da divisão dos blastómeros (ASiRM e ESIGoE, 2011; Prados *et al.*, 2012). Dada a natureza dos fragmentos, a sua distinção de pequenos blastómeros é difícil, pelo que foi estabelecido que deve ser considerado um fragmento quando apresentar um diâmetro inferior a 45 $\mu$ m ou 40 $\mu$ m, para embriões de segundo ou terceiro dia, respetivamente (ASiRM e ESIGoE, 2011).

O grau de fragmentação de um embrião refere-se à percentagem que esta ocupa relativamente ao volume citoplasmático total, e pode ser definido como leve, quando a fragmentação é inferior a 10%; moderado, para valores entre 10 a 25% e severo para fragmentação superior a 25% do volume total (Figura 39) (ASiRM e ESIGoE, 2011). Embriões com elevado grau de fragmentação apresentam um baixo potencial de implantação e, conseqüentemente, menores taxas de gravidez (Prados *et al.*, 2012).

Dado tratar-se de um fenómeno dinâmico, a localização dos fragmentos não é um fator preditivo da qualidade embrionária, sendo que estes podem mover-se ao longo do embrião e até mesmo serem reabsorvidos (ASiRM e ESIGoE, 2011).



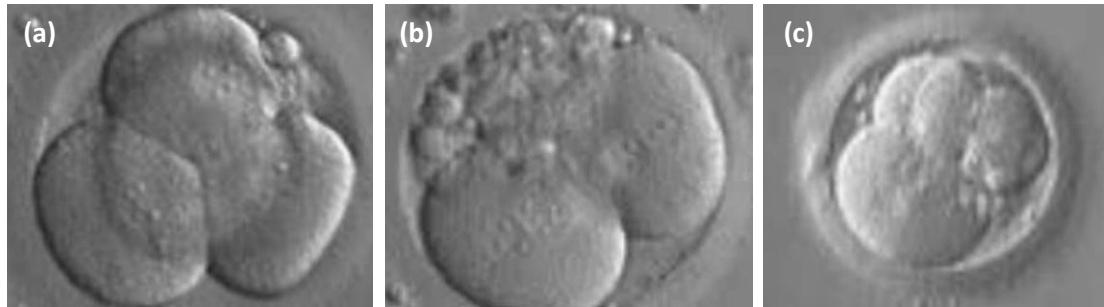
**Figura 39** | Imagens exemplificativas de embriões em fase de clivagem com diferentes graus de fragmentação. (a) Embrião de 4 células de igual tamanho com fragmentação < 10%; (b) Embrião de 4 células de igual tamanho, com fragmentação de 10-20%; (c) Embrião de 3 células de diferente tamanho, com > 25% de fragmentação. (Adaptado de Prados *et al.*, 2012)

### 6.3.1.4. Multinucleação

A multinucleação é definida pela presença de mais do que um núcleo em pelo menos um dos blastómeros do embrião (Figura 40) (Prados *et al.*, 2012). Este tipo de alterações pode ser avaliado em embriões em qualquer fase de clivagem, embora no

dia 3 a sua observação seja dificultada devido ao reduzido tamanho das células, que se encontram também em maior número (ASiRM e ESIGoE, 2011).

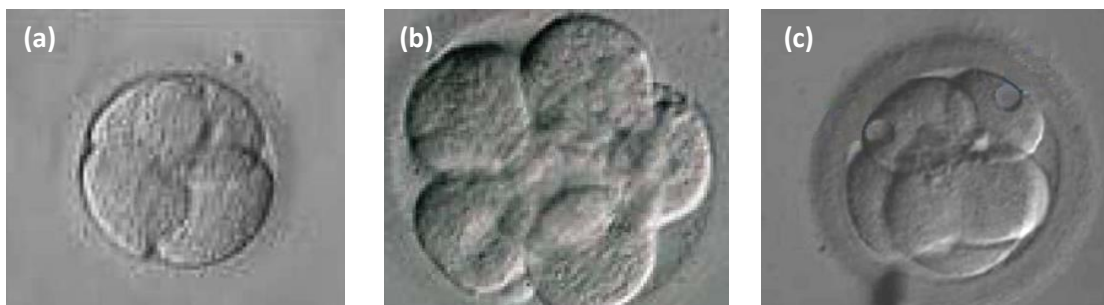
A presença de multinucleação está associada a uma diminuição do potencial de implantação, assim como um aumento do nível de anomalias cromossômicas e, conseqüentemente, um risco aumentado de aborto espontâneo (ASiRM e ESIGoE, 2011; Prados *et al.*, 2012). Esta anomalia é mais frequente em blastómeros de embriões com clivagem desigual (Figura 40c) (ASiRM e ESIGoE, 2011).



**Figura 40** | Imagens exemplificativas de embriões em fase de clivagem com ou sem multinucleação. (a) Embrião de 4 células de igual tamanho, evidenciando cada uma delas um único núcleo; (b) Embrião de 2 células de igual tamanho, ambas binucleadas; (c) Embrião de 4 células de diferente tamanho, com um dos blastómeros binucleado. (Adaptado de Prados *et al.*, 2012)

#### 6.3.1.5. Anomalias Citoplasmáticas

O citoplasma de um embrião em fase de clivagem deve apresentar uma aparência clara e homogênea, ou ligeiramente granular. Embora não seja totalmente claro o seu valor preditivo para a qualidade embrionária e potencial de implantação várias são as anomalias citoplasmáticas que se podem observar, tais como granulosidade aumentada, citoplasma rendilhado e a presença de vacúolos (Figura 41), (Prados *et al.*, 2012).



**Figura 41** | Imagens exemplificativas de embriões em fase de clivagem com anomalias citoplasmáticas. (a) Embrião de 4 células com zonas de granulosidade; (b) Embrião de 8 células de igual tamanho com citoplasma rendilhado; (c) Embrião de 5 células de diferente tamanho, com dois pequenos vacúolos nos dois blastómeros de menor tamanho. (Adaptado de Prados *et al.*, 2012)

### 6.3.2. Avaliação de embriões em fase de mórula (Dia 4)

A partir da fase embrionária de 8 células, as adesões célula-célula começam a propagar, levando ao início da compactação. Este processo transforma o embrião numa massa de células com contornos indistinguíveis, a mórula. É nesta fase que ocorre a ativação do genoma embrionário, sendo, portanto, a compactação um bom indicador da capacidade de desenvolvimento do embrião (Prados *et al.*, 2012).

Uma mórula de boa qualidade deve ser composta por cerca de 16 a 32 blastómeros, os quais devem estar todos incluídos no processo de compactação (Figura 42) (ASiRM e ESIGoE, 2011). Embriões que apresentem células ou fragmentos excluídos da compactação parecem apresentar uma menor probabilidade de implantação e são, então, considerados embriões de menor qualidade (Tabela 9) (Prados *et al.*, 2012).

**Tabela 19** | Sistema de classificação de embriões em fase de mórula (Dia 4), consoante o grau de compactação e ciclo de clivagem. (Adaptado de ASiRM e ESIGoE, 2011)

Grau	Classificação	Descrição
1	<b>Bom</b>	4º ciclo de clivagem Compactação incluindo todo o volume do embrião
2	<b>Razoável</b>	4º ciclo de clivagem Compactação incluindo a maioria do volume do embrião
3	<b>Mau</b>	Compactação desproporcional incluído menos de 50% do volume do embrião, com 2 ou 3 blastómeros isolados



**Figura 42** | Imagens exemplificativas de mórulas com diferentes qualidades. (a) Mórula de boa qualidade, evidenciando todas as células incluídas no processo de compactação; (b) Mórula de qualidade razoável, com alguns limites celulares ainda visíveis e algumas células pequenas ou fragmentos que não são completamente incorporados no processo de compactação; (c) Mórula de má qualidade, com várias células e fragmentos excluídos da massa principal de células compactadas. (Adaptado de Prados *et al.*, 2012)



### 6.3.3. Avaliação de embriões em fase de blastocisto (Dia 5)

Após completa compactação do embrião, este deve começar a acumular fluido, que ao aumentar progressivamente de volume irá provocar a aparição de uma cavidade, formando o blastocélio. Assim, por volta do 5º dia após inseminação, o embrião atinge a fase de blastocisto. À medida que o volume do blastocélio aumenta, acompanhado da propagação do número de células, o blastocisto expande, tornando-se a zona pelúcida mais fina. Este processo irá culminar na rutura da ZP e na eclosão do embrião (Hardarson *et al.*, 2012).

A avaliação da qualidade do embrião em fase de blastocisto deve ser realizada 116 ± 2 horas após inseminação e ter em conta o grau de expansão e a morfologia da massa celular interna (MCI) e da trofoectoderme (TF) (Tabela 10). Um blastocisto ideal deve apresentar-se totalmente expandido, com uma MCI proeminente, facilmente distinguível, com muitas células bem compactadas, e uma TF com bastantes células, formando um epitélio coeso. Segundo o sistema de classificação de Istanbul, um embrião com estas características é classificado como 3:1:1 (ASiRM e ESIGoE, 2011).

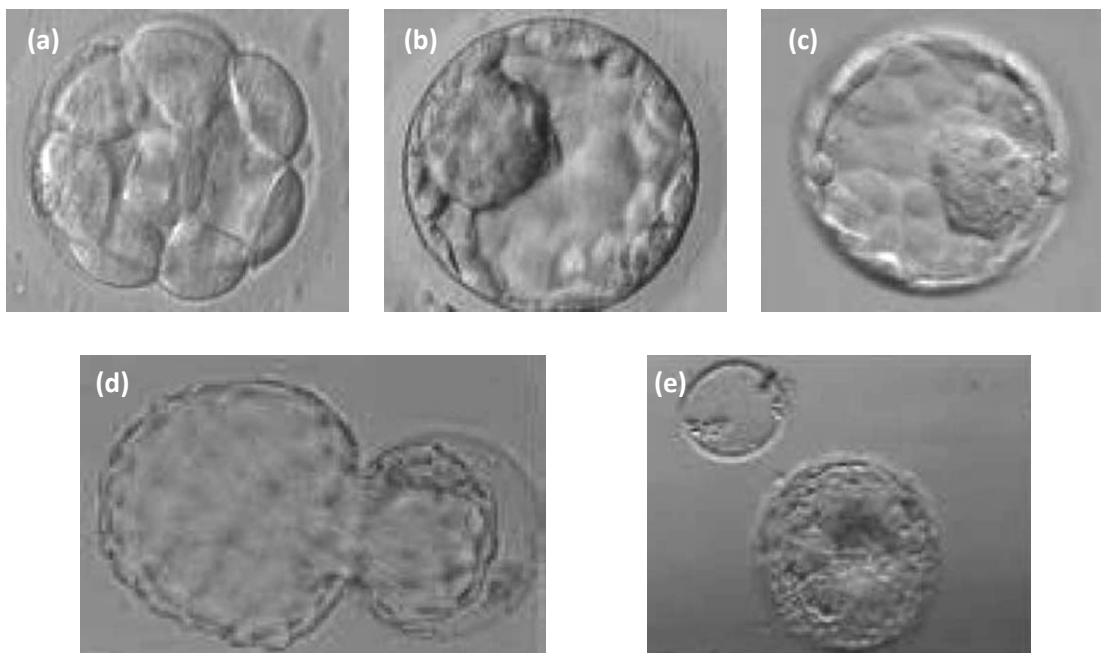
Os ciclos de colapso e de reexpansão de blastocistos são comuns, pelo que se um blastocisto se encontrar colapsado no momento da observação, este deve ser avaliado apenas 1 a 2 horas mais tarde (ASiRM e ESIGoE, 2011).

**Tabela 20** | Sistema de classificação de embriões em fase de Blastocisto (Dia 5), tendo em conta a fase de desenvolvimento e a morfologia da MCI e da TF. (Adaptado de ASiRM e ESIGoE, 2011)

	Grau	Classificação	Descrição
Fase de desenvolvimento	1		Inicial
	2		Blastocisto
	3		Expandido
	4		Em eclosão ou Eclodido
MCI	1	<b>Bom</b>	Proeminente e facilmente distinguível Com muitas células compactadas e aderentes
	2	<b>Razoável</b>	Facilmente distinguível Com várias células mas pouco compactadas
	3	<b>Mau</b>	Difícil de distinguir Com poucas células
TF	1	<b>Bom</b>	Várias células formam um epitélio coeso
	2	<b>Razoável</b>	Poucas células formam um epitélio pouco coeso
	3	<b>Mau</b>	Muito poucas células

### 6.3.3.1. Fase de desenvolvimento

Consoante o grau de expansão do blastocisto, este pode encontrar-se em diferentes fases - inicial (Grau 1), blastocisto (Grau 2), expandido (Grau 3) ou em eclosão/eclodido (Grau 4) (ASiRM e ESIGoE, 2011). Um blastocisto de grau 1 apresenta o blastocélio ainda pouco desenvolvido; num blastocisto de grau 2 o blastocélio preenche completamente o embrião; num blastocisto de grau 3 o blastocélio é maior do que o volume inicial do embrião e tem uma ZP muito fina e por último, um blastocisto de grau 4 encontra-se em eclosão através da ZP ou completamente eclodido (Figura 43). Quanto maior o grau de expansão do blastocisto maior será o potencial de implantação (Hardarson *et al.*, 2012).

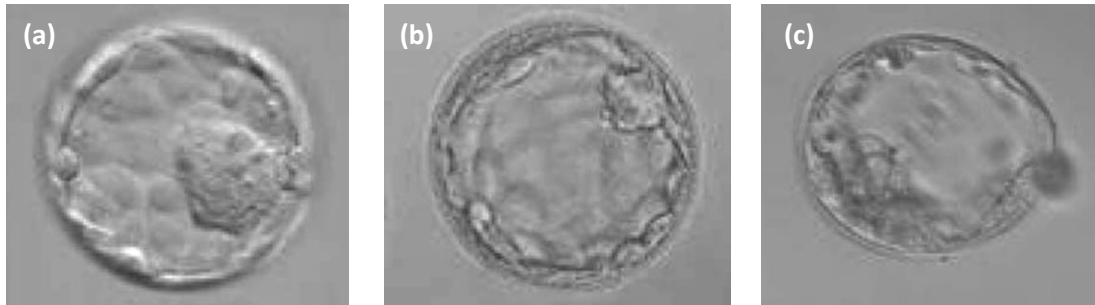


**Figura 43** | Imagens exemplificativas de blastocistos em diferentes fases de desenvolvimento. (a) Blastocisto inicial com uma cavidade que ocupa cerca de 50% do volume do embrião; (b) Blastocisto (Grau 2: 1: 1), evidenciando uma boa MCI e TF; (c) Blastocisto expandido (Grau 3: 1: 1), evidenciando uma boa MCI e TF; (d) Blastocisto em eclosão (Grau 4: 1: 1), evidenciando uma boa MCI e TF, com cerca de 75% do volume do embrião já no exterior da ZP. (e) Blastocisto eclodido (Grau 4: 1: 1), completamente livre da ZP, a qual também pode ser observada na imagem. Nesta caso é possível ver claramente o aumento de tamanho do embrião relativamente ao seu tamanho inicial, que é definido pelo diâmetro da ZP. (Adaptado de Hardarson *et al.*, 2012).

### 6.3.3.2. Massa celular interna

Durante o desenvolvimento do blastocisto, as suas células constituintes distribuem-se diferencialmente, formando duas populações distintas - a massa celular interna (MCI) e a trofoectoderme (TF). A MCI é o conjunto de células que se localiza no interior do blastocélio, devendo apresentar-se como uma massa coesa (Hardarson *et al.*, 2012).

Dado que esta estrutura irá dar origem ao embrião, a avaliação da sua morfologia é extremamente importante, sendo de elevado valor preditivo do potencial de implantação e desenvolvimento fetal (ASiRM e ESIGoE, 2011). Assim, a MCI pode ser classificada como boa, razoável ou má (Figura 44), consoante o número de células que a constituem e o grau de coesão (ASiRM e ESIGoE, 2011).



**Figura 44** | Imagens exemplificativas de blastocistos com MCI diferente grau. (a) Blastocisto expandido (Grau3:1:1), evidenciando uma MCI proeminente, constituída por muitas células coesas. (b) Blastocisto expandido (Grau 3:2:1) evidenciando uma MCI distinta, constituída por menos células do que o ideal. (c) Blastocisto expandido (Grau 3:3:3) com MCI difícil de distinguir e com poucas células. (Adaptado de Hardarson *et al.*, 2012).

#### 6.3.3.3. Trofoectoderme

A trofoectoderme é a camada exterior de células, que deve formar um epitélio coeso em torno do embrião, dando origem posteriormente à placenta. A TF desempenha um importante papel no processo de implantação do embrião na cavidade uterina, estando conseqüentemente a sua morfologia associada ao potencial de implantação e gravidez (Hardarson *et al.*, 2012). A classificação da TF pode ser atribuída como boa, razoável ou má (Figura 45), consoante o número de células que a constituem e o grau de coesão (ASiRM e ESIGoE, 2011).



**Figura 45** | Imagens exemplificativas de blastocistos com TF de diferente grau. (a) Blastocisto em eclosão (Grau4:1:1) com TF constituída por muitas células que formam um epitélio coeso; (b) Blastocisto expandido (Grau 3:1:2), com TF constituída por células de diferente tamanho, pouco coesas. (c) Blastocisto em eclosão (Grau 4:1:3) com TF com muito poucas células não coesas. (Adaptado de Hardarson *et al.*, 2012).

## 7. Transferência de Embriões

A transferência de embriões é a etapa final e mais importante dos procedimentos de RHA, estando o seu sucesso depende de diversos fatores, tais como a qualidade e a fase de desenvolvimento embrionário, o estado fisiológico da paciente e o método de transferência (Bungum e Bungum, 2009).

A transferência dos embriões pode ser realizada ao 2<sup>o</sup>/3<sup>o</sup> dia de cultura, com embriões em fase de clivagem, ou estender-se até ao 5<sup>o</sup>/6<sup>o</sup> dia de cultura, para transferência de embriões em fase de blastocisto. A transferência de embriões em fase de blastocisto tem a vantagem de se poder distinguir os embriões com capacidade de diferenciação e desenvolvimento, após a ativação do genoma embrionário, que ocorre a partir do terceiro dia. Para além disso, permite evitar a seleção de embriões com aneuploidias e possibilita a sincronização com o desenvolvimento endometrial, para um ambiente intrauterino favorável à implantação do embrião a transferir (Gardner e Lane, 2012; Gianaroli *et al.*, 2012; Hardarson *et al.*, 2012). A possibilidade de uma melhor avaliação da qualidade dos embriões permitiu também evoluir no sentido da transferência de menor número de embriões, evitando assim o risco associado de gravidez múltipla (Elder e Dale, 2011).

Um dos principais benefícios da cultura prolongada aplica-se a casos em que é necessário realizar DGPI, uma vez que, após a biópsia, os embriões podem continuar em cultura até obtenção do resultado das análises genéticas, ou a biópsia pode até mesmo ser realizada nas células da trofoectoderme dos blastocistos (Gianaroli *et al.*, 2012).

Todavia, alguns aspetos negativos têm sido associados à cultura prolongada de embriões, nomeadamente, o risco aumentado de cancelamento da transferência, por inexistência de embriões com capacidade de desenvolvimento até à fase de blastocisto, menor número de embriões disponíveis para criopreservação e risco aumentado de desenvolvimento de anomalias epigenéticas (Gianaroli *et al.*, 2012).

A seleção de embriões para transferência, assim como o próprio dia de transferência, vão depender da avaliação da qualidade embrionária, do número total de embriões em desenvolvimento e da resposta da paciente. A legislação portuguesa, embora não imponha um número limite de embriões a transferir, aconselha a transferência de apenas 1 ou 2 embriões, e em casos excecionais, 3 embriões.

A preparação da paciente para a transferência deve ser iniciada na noite após punção folicular, pela administração de progesterona, que irá ser responsável por induzir a proliferação do endométrio e suas secreções, tal como acontece no ciclo natural, em que esta hormona é responsável por iniciar a fase secretora do ciclo uterino (Alper, 2012; Toner, 2009). No dia da transferência, os embriões selecionados devem ser colocados em meio de transferência pré-equilibrado, o qual funciona como meio de adesão, que irá facilitar o processo de implantação (Bontekoe *et al.*, 2010). Após pelo menos 15 minutos de incubação a 37°C, 6% de CO<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub>, os embriões são aspirados com auxílio de um cateter de transferência, acoplado a uma seringa, previamente lavado com meio de cultura. O cateter de transferência é constituído por uma parte externa, mais rígida, o que facilita a penetração via vaginal, e uma parte interna maleável, que transporta os embriões. A parte interna do cateter é maleável para uma transferência suave, prevenindo assim a lesão do endométrio e a consequente indução de contrações intrauterinas, desfavoráveis ao processo de implantação (Bungum e Bungum, 2009). Para o carregamento do cateter interno, inicialmente, é aspirado um pequeno volume de meio de transferência, intercalado com uma coluna de ar, seguida de um pequeno volume de meio de transferência, contendo os embriões a transferir, terminado novamente com uma coluna de ar, seguida de meio de transferência (Figura 46).



**Figura 46|** Esquema de carregamento de cateter de transferência. Colunas de meio de transferência (cinzento) intercalado por colunas de ar (branco), evidenciando ao centro a coluna de meio contendo os embriões a transferir (azul).

Imediatamente após carregamento do cateter de transferência, é realizada a transferência dos embriões, ecoguiada com sonda abdominal. O cateter externo é inserindo, via vaginal, através do orifício cervical, e, posteriormente, o cateter interno irá penetrar até ao centro da cavidade uterina, onde os embriões são depositados. Após a transferência, deve ser confirmada a ausência de embriões retidos no cateter, realizando para tal uma nova lavagem com meio de cultura. O sucesso da implantação é confirmado 15 dias após a transferência, através da análise dos níveis de hCG.

Se existirem embriões excedentários de boa qualidade, estes devem ser criopreservados. No caso de embriões excedentários em fase de clivagem, estes podem também ser deixados em cultura prolongada e caso se desenvolvam em bons blastocistos devem igualmente ser criopreservados (Elder e Dale, 2011).

## 7.1. Eclosão assistida

A eclosão é um processo natural do desenvolvimento dos embriões, que ocorre após a formação e completa expansão do blastocisto, de modo a facilitar a sua implantação no endométrio. Este processo consiste na saída do embrião do interior da zona pelúcida que o envolve e protege, desde a fase de ovócito, sendo para tal necessária a ocorrência de uma pequena abertura nesta camada (Veiga e Belil, 2012). Com o avançar da idade, assim como após a fertilização dos ovócitos ou a criopreservação embrionária, a zona pelúcida tende a tornar-se mais espessa e inflexível, dificultando o processo de eclosão (Elder e Dale, 2011; Veiga e Belil, 2012). A incapacidade do embrião eclodir naturalmente parece ser uma das razões que leva à falha de implantação após técnicas de RHA, pelo que a indução da eclosão artificialmente poderá constituir uma importante opção (Alper, 2012).

A eclosão assistida é o procedimento pelo qual a zona pelúcida de embriões em cultura é fragilizada, antes da transferência para a cavidade uterina, utilizando para tal métodos mecânicos, químicos ou laser. O primeiro relato da utilização de eclosão assistida em embriões humanos foi publicado por Cohen *et al.* em 1990 e a partir desse momento vários métodos têm sido desenvolvidos e melhorados (Veiga e Belil, 2012).

Atualmente, encontram-se disponíveis diversos métodos de eclosão assistida, incluindo a dissecação parcial da zona pelúcida (PZD), a perfuração da zona pelúcida (ZD) com solução ácida de Tyrode ou a eclosão assistida por laser. O método de laser é considerado o método mais simples, seguro e eficaz, através do qual é possível criar uma pequena abertura na zona pelúcida, irradiando-a com um laser de diâmetro pré-definido (Hammadeh *et al.*, 2011).

A eclosão assistida não deve ser aplicada como um procedimento padrão (ASRM e SART, 2014), sendo, todavia, particularmente aconselhada em casos de idade avançada da paciente e historial de falhas de implantação, embriões com zona pelúcida visivelmente espessada e em ciclos de transferência de embriões criopreservados (Elder e Dale, 2011; Hammadeh *et al.*, 2011; Veiga e Belil, 2012).

## 8. Diagnóstico Genético Pré-implantação

A crescente preocupação com a saúde do bebê, a par dos progressos científicos no campo da citogenética, tem levado ao aperfeiçoamento das técnicas de diagnóstico pré-natal, com vista a evitar a transmissão de doenças ou anomalias genéticas à descendência. Com o desenvolvimento das técnicas de DGPI este tornou-se uma interessante alternativa aos testes de diagnóstico pré-natal, tal como a amniocentese, visto que permitem a transferência apenas de embriões selecionados, não afetados, e, assim, evitam que o casal tenha de optar pela interrupção terapêutica da gravidez, caso o resultado dos métodos de diagnóstico convencionais indiquem que o feto está afetado (Dahdouh *et al.*, 2015; Yaron *et al.*, 2012).

O diagnóstico genético pré-implantação (DGPI) é classificado pelo conselho nacional de procriação medicamente assistida (CNPMA) como o conjunto de técnicas usadas, no contexto da procriação medicamente assistida para a deteção de uma alteração genética específica num embrião, antes da sua transferência para o útero. Segundo a legislação portuguesa, casais cujo pelo menos um dos parceiros seja proveniente de família portadora de uma anomalia genética que causa morte precoce ou doença grave e com elevado risco de transmissão à descendência (Artigo 29º, Lei nº32/2006), têm indicação para a realização de DGPI e, portanto, acesso às técnicas de RHA, mesmo que não apresentem historial de infertilidade. O DGPI pode também ser útil em casos de idade materna avançada, falhas no sucesso das técnicas de RHA e aborto espontâneo recorrentes (Nguyen *et al.*, 2012).

Embora seja bastante controverso, o DGPI pode também ser utilizado para a seleção de sexo do embrião, identificação do grupo de HLA compatível para efeitos de tratamento de doença grave ("irmão salvador"), assim como identificar carcinomas hereditários, tais como a presença de BRCA 1 e 2, e doenças genéticas de início tardio, como a doença de Huntington (Dahdouh *et al.*, 2015). As duas primeiras situações estão já previstas na lei portuguesa, contudo a seleção de sexo só pode ser aplicada em casos de risco elevado de doença genética associada ao sexo (Artigo 7º, nº3, Lei nº32/2006).

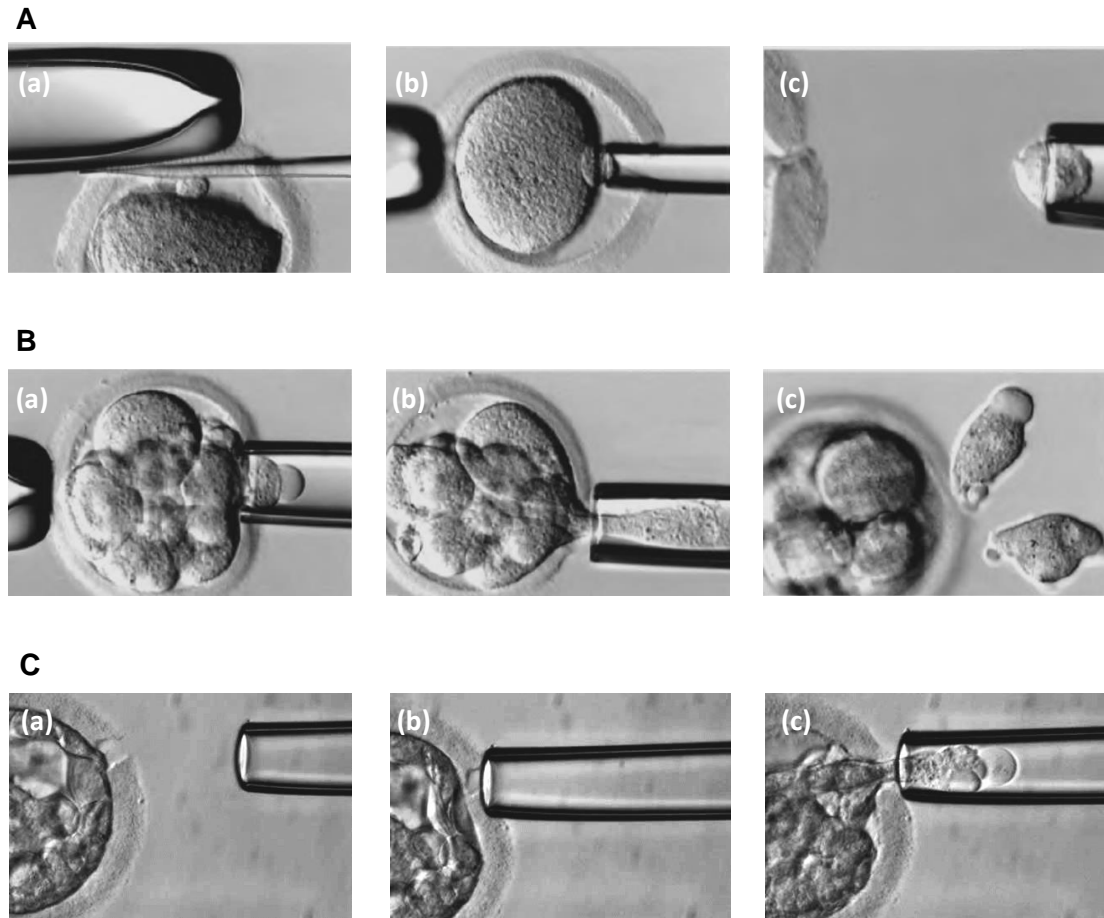
O DGPI pressupõe a biópsia de embriões em cultura resultantes de ciclos de RHA, seguida de análise genética das células biopsiadas, sendo recomendados os ciclos de ICSI, de forma a reduzir a possibilidade de contaminação de DNA pela presença de células do *cumulus* ou de espermatozoides ligado à zona pelúcida (Thornhill *et al.*, 2012). A biópsia pode ser realizada em três fases distintas do desenvolvimento embrionário - glóbulos polares de ovócitos ou zigotos, blastómeros de embriões em fase de clivagem e células da trofoectoderme de embriões em fase de blastocisto (Elder e Dale, 2011) (Figura 47).

A biópsia de glóbulos polares foi inicialmente desenvolvida para ultrapassar as barreiras éticas associadas à manipulação embrionária (Elder e Dale, 2011). Como a presença dos GP não é essencial para o sucesso da fertilização ou para o desenvolvimento embrionário normal, a remoção de apenas um ou ambos os GP para efeitos de diagnóstico genético não deve constituir nenhum efeito prejudicial por si só. (Thornhill *et al.*, 2012). No entanto, esta técnica permite avaliar apenas a contribuição genética materna, não sendo possível a seleção em casos de anomalias associadas ao genoma paterno (Collins, 2013).

A biópsia de embriões em fase de blastocistos consiste na remoção de células da trofoectoderme, sem que para tal seja afetada a massa celular interna, a partir da qual o feto se desenvolve (Elder e Dale, 2011). Este procedimento permite a remoção de um maior número de células, relativamente a outros métodos de biópsia, resultando, num maior rendimento de DNA e conseqüentemente melhores taxas de diagnóstico (Collins, 2013; Thornhill *et al.*, 2012). Como este tipo de biópsia é realizada numa fase avançada do desenvolvimento embrionário, esta é frequentemente combinada com a vitrificação dos embriões, de modo a que se aguarde pelos resultados do diagnóstico genético (Collins, 2013).

A abordagem mais comum é a biópsia de embriões em clivagem de fase, em que são removidos um ou dois blastómeros, preferencialmente de embriões no terceiro dia de desenvolvimento, antes do início do processo de compactação (Collins, 2013). Dado que, um embrião pode apresentar mosaicismo cromossómico, ou seja, conter simultaneamente blastómeros euploides e aneuploides, é aconselhado, quando possível, a remoção de dois blastómeros, de modo a evitar falsos positivos/negativos (Thornhill *et al.*, 2012).





**Figura 47** | Imagens exemplificativas de procedimentos de biopsias de glóbulo polar (A), embrião em fase de clivagem (B) e embrião em fase de blastocisto (C). **A** - Abertura da zona pelúcida por método mecânico (a), penetração da pipeta de biópsia (a) e aspiração do 1ºGP (c); **B** - Penetração da pipeta de biópsia na abertura da ZP (a), aspiração dos blastómeros (b) e sua deposição no meio (c); **C** - Abertura da zona pelúcida por laser (a), penetração da pipeta de biópsia (b) e aspiração de várias células da trofoectoderme (c). (Adaptado de Veeck, 1999 (A e B) e Thornhill *et al.*, 2012 (C))

Para realização da biópsia embrionária, é necessário proceder a uma pequena abertura da zona pelúcida por método mecânico, químico ou laser, tal como descrito para o procedimento de eclosão assistida (Secção 7.1.) (Harton *et al.*, 2011). Para tal, os embriões são lavados com meio de biópsia previamente equilibrado a 37°C, 6% de CO<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub> e transferidos para a placa de biópsia, que deve conter gotas de meio de biópsia cobertas com óleo de parafina. Posteriormente, os embriões são posicionados e fixados recorrendo a uma pequena aspiração com o auxílio da pipeta de sustentação, e procede-se à abertura da zona pelúcida. De seguida, a pipeta de biópsia é aproximada da abertura e a célula é aspirada lentamente, de modo a que o procedimento seja o mais suave possível e sem perturbação do embrião. As células biopsiadas são transferidas para meio de cultura para posterior análise genética e os embriões são colocados em meio de cultura e incubados a 37°C, 6% de CO<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub>, para continuação da cultura embrionária.

O material genético é, então, testado quanto a mutações, quer de um único gene, usando técnicas de biologia molecular, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR), quer para a translocação cromossómica e aneuploidias *de novo*, utilizando técnicas citogenéticas, tais como a hibridização *in situ* de sondas fluorescentes (FISH) (Dahdouh *et al.*, 2015). No caso da análise por PCR, por se tratar de uma técnica muito sensível, é necessário tomar especial cuidado com possíveis contaminações e com o fenómeno de *allele dropout*, ou seja a amplificação preferencial de um alelo em detrimento do outro (Elder e Dale, 2011).

Após resultado do DGPI, os embriões que não apresentem anomalias genéticas identificadas devem ser transferidos ou criopreservados, caso se verifiquem embriões excedentários.

## 9. Criopreservação

A criopreservação consiste na preservação e armazenamento de células e tecidos a temperaturas negativas por períodos de tempo prolongados. O principal desafio deste procedimento é manter a capacidade funcional dos organelos intracelulares e, em simultâneo, evitar as duas principais causas de morte celular associadas, isto é, a formação de cristais de gelo e as concentrações letais de solutos intracelulares, que se verificam após desidratação, induzida durante o processo de criopreservação (Edgar e Gook, 2012).

Para tal, várias estratégias têm sido desenvolvidas, entre elas a utilização de agentes crioprotetores (CPA). Os CPA são moléculas essenciais para a proteção das células durante o processo de criopreservação, promovendo a estabilização de proteínas intracelulares, evitando a formação de gelo e controlando os efeitos da concentração de eletrólitos intracelulares e extracelulares (Elder e Dale, 2011). Estes podem ser classificados em CPA permeáveis, quando são suficientemente pequenos para atravessar a membrana citoplasmática (tais como o dimetilsulfóxido (DMSO), propanediol (PrOH) e etilenoglicol (EG)), ou CPA não-permeáveis (tais como a sacarose, glicose, frutose e trealose), quando são incapazes de atravessar a membrana devido às suas dimensões, sendo que mantêm de igual forma um gradiente de concentração membranar (Edgar e Gook, 2012). A utilização de CPA permeáveis e não-permeáveis cria, assim, um gradiente osmótico através das membranas celulares que irá promover a saída de água intracelular e, conseqüentemente, prevenir a formação de cristais de gelo, sendo que podem ser utilizados numa diversidade de combinações (Edgar e Gook, 2012).

## 9.1. Criopreservação de embriões

Como resultado dos inúmeros avanços no campo da RHA, incluindo melhorias nos protocolos de estimulação hormonal e de cultura embrionária, tornou-se recorrente a obtenção de um grande número de embriões de boa qualidade disponíveis para transferência. Assim, surgiu a necessidade de um programa de congelação de embriões adequada às exigências, que permite o armazenamento de embriões excedentários (Gosden *et al.*, 2009). Para além disso, o estado fisiológico da paciente pode obrigar também à criopreservação de todos os embriões e deste modo, adiar a sua transferência. Portanto, a criopreservação pode constituir uma importante opção em casos de desenvolvimento inadequado do endométrio, assincronia do ciclo da dadora de ovócitos relativamente à recetora e ainda em casos de síndrome de hiperestimulação (Gosden *et al.*, 2009).

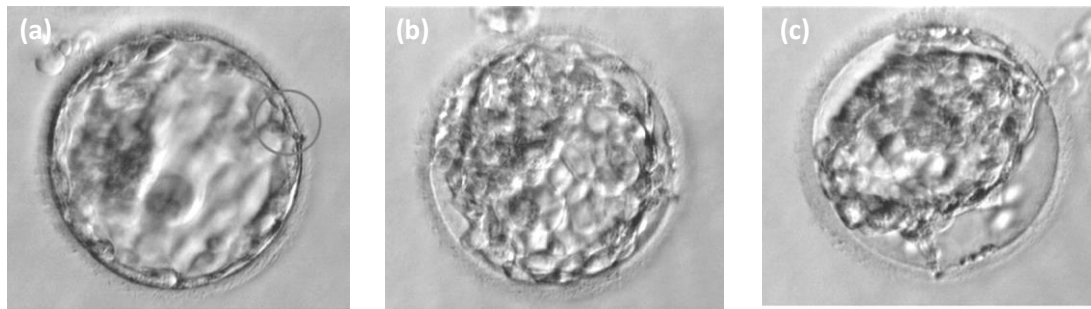
A criopreservação de embriões tem como principal vantagem evitar nova estimulação hormonal num ciclo posterior, caso o ciclo anterior falhe ou seja cancelado. Nestes casos, é necessário proceder apenas à transferência dos embriões criopreservados (TEC) num novo ciclo menstrual.

No âmbito da reprodução humana assistida, existem dois métodos distintos de criopreservação – a congelação lenta e a vitrificação. A congelação lenta é a abordagem mais tradicional, que envolve uma diminuição gradual e programada da temperatura, utilizando baixa concentração de crioprotetores. No entanto, este é um método bastante demorado e necessita de equipamento dispendioso (Mukaida e Oka, 2016).

Atualmente, a vitrificação é a técnica mais utilizada no contexto da procriação medicamente assistida, dado apresentar melhores taxas de sobrevivência e implantação dos embriões após criopreservação (Edgar e Gook, 2012). Este método consiste na solidificação das células até a um estado vítreo, evitando assim a formação de cristais de gelo intra- e extracelular, que se sabe afetar gravemente a sobrevivência dos embriões (Mukaida e Oka, 2016). Para tal, a vitrificação baseia-se na utilização de meios com concentrações elevadas de crioprotetores, que irão permitir a completa desidratação celular, e taxas de arrefecimento extremamente rápidas (Wong *et al.*, 2014).

A vitrificação apresenta diferentes protocolos, podendo ser realizada em sistema aberto ou sistema fechado. O sistema aberto pressupõe o contacto direto das células com o azoto líquido, permitindo assim atingir taxas de arrefecimento elevadas (Larman e Vanderzwalmen, 2016). No entanto, este sistema apresenta um risco de contaminação cruzada entre as amostras biológicas e o azoto líquido. Atualmente, existem várias opções para minimizar as contaminações cruzadas, nomeadamente, a esterilização do azoto líquido por radiação ultravioleta (Parmegiani *et al.*, 2010) ou o armazenamento em fase de vapor de azoto líquido, designado por sistema seco (Cobo *et al.*, 2010; Rienzi *et al.*, 2010). Por outro lado, os sistemas fechados implicam a utilização de palhetas de vitrificação que são previamente seladas, impedindo o contacto direto do material biológico com o azoto líquido (Larman e Vanderzwalmen, 2016). Todavia, há quem defenda que este sistema não apresenta taxas de sucesso tão favoráveis como as que se verificam nos sistemas fechados, devido a uma taxa de arrefecimento mais baixa, embora isto seja controverso (Argyle *et al.*, 2016). De qualquer forma, qualquer que seja o protocolo de vitrificação utilizado, é importante ter em conta as taxas de aquecimento associadas, uma vez que estas têm sido apontadas como de maior importância para a sobrevivência celular (Seki e Mazur, 2009). Isto pode dever-se ao facto de que, embora a formação de cristais de gelo ocorra principalmente durante o período de arrefecimento, durante o aquecimento pode ocorrer recristalização. Assim, a taxa de aquecimento deve ser suficientemente rápida para impedir a agregação e formação cristais de gelo de maiores dimensões (Larman e Vanderzwalmen, 2016; Seki e Mazur, 2008).

A vitrificação de embriões pode ser realizada em duas fases distintas do desenvolvimento, em embriões em fase de clivagem ou de blastocisto. Em ambos os casos o processo de vitrificação é semelhante, diferenciando-se apenas no facto de ser aconselhado o colapso artificial no caso dos blastocistos expandidos. Para tal, antes da vitrificação, os embriões devem ser submetidos a um disparo de laser, na região da zona pelúcida do lado oposto à massa celular, de modo a evitar que esta seja danificada (Figura 48a) (Mukaida e Oka, 2016). Após abertura da ZP, os blastocistos tendem a colapsar rapidamente (Figura 48b e 48c), devendo ser incubados a 37°C, 6% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> até ao momento da criopreservação.



**Figura 48** | Colapso artificial de um blastocisto expandido previamente à criopreservação. (a) Blastocisto totalmente expandido, submetido a um disparo de laser, no ponto de junção celular das células trofoectoderme, do lado oposto à MCI (círculo); (b) Início do colapso do embrião 10 segundos após disparo de laser; (c) Embrião quase totalmente colapsado 30 segundos após o disparo de laser. (Adaptado de Mukaida e Oka, 2016)

Para o processo de vitrificação, os embriões excedentários e de boa qualidade são selecionados, devendo ser transferidos ao longo de meios de criopreservação consecutivos, pré aquecidos a 37°C, com crescente concentração de crioprotetores, os quais irão substituir as moléculas de água constituintes do embrião (Edashige e Kasai, 2016). Os tempos de incubação em cada meio vão sendo também progressivamente menores, de modo a evitar o efeito tóxico das elevadas concentrações de crioprotetores (Edashige e Kasai, 2016). Após a incubação no último meio de criopreservação, os embriões são imediatamente carregados na palheta de criopreservação, no mínimo de meio possível. Após carregamento da palheta, esta é imediatamente submersa em azoto líquido e armazenada a -196°C, em contentores de azoto líquido, na localização previamente determinada e registada.

No dia da transferência de embriões criopreservados (TEC), os embriões são desvitrificados, num processo baseado nos pressupostos inversos aos da vitrificação. Assim, as palhetas de criopreservação são retiradas dos contentores de armazenamento e imediatamente mergulhadas no meio de desvitrificação para libertação dos embriões. Estes são transferidos ao longo de soluções com concentração decrescente de crioprotetores, e com tempos de incubação progressivamente crescentes. Desta forma os embriões vão reidratando e adquirindo as suas capacidades funcionais. Por fim, os embriões desvitrificados são lavados e incubados em meio de cultura pré-equilibrado a 37°C, 6% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> até ao momento da transferência. A TEC deve ser realizada de acordo com o mesmo procedimento da transferência de embriões a fresco (Secção 7.), devendo ser avaliada a sua qualidade previamente.

## 9.2. Criopreservação de gâmetas masculinos

A criopreservação de gâmetas masculinos é essencial para uma ótima gestão clínica da infertilidade masculina no contexto de programas de reprodução assistida, bem como para a preservação da fertilidade (Wyns *et al.*, 2016). Deste modo, esta técnica é utilizada em casos de pacientes submetidos a tratamentos médicos ou cirúrgicos passíveis de induzir a esterilidade, tais como a pacientes com neoplasias submetidos a tratamentos gonadotóxicos, como a quimioterapia ou radioterapia (Katz *et al.*, 2013; Nangia *et al.*, 2013). A criopreservação de espermatozoides é também particularmente útil na manutenção de bancos de doadores de gâmetas, para armazenamento de amostras, em casos de ausência do parceiro masculino no dia da punção folicular e ainda em casos de pacientes com disfunções ejaculatórias (Carrell e Aston, 2013; Di-Santo *et al.*, 2012). Esta técnica permite também o armazenamento de várias amostras de gâmetas masculinos recolhidas por técnicas cirúrgicas, evitando a repetição das mesmas (Di-Santo *et al.*, 2012).

Desde a primeira gravidez resultante de espermatozoides após criopreservação em 1953 (Bunge e Sherman, 1953), as técnicas de criopreservação de gâmetas masculinos têm vindo a evoluir (Carrell e Aston, 2013). No entanto, sabe-se que, em todo o caso, a criopreservação pode resultar numa diminuição da motilidade e capacidade de fertilização, assim como afetar a integridade do DNA, embora este efeito possa variar drasticamente, dependendo da qualidade inicial da amostra de esperma (Di-Santo *et al.*, 2012; Kopeika *et al.*, 2015; Paoli *et al.*, 2014).

Para a criopreservação de gâmetas masculinos, a amostra seminal deve ser recolhida preferencialmente por masturbação e, após liquefação, preparada de acordo com o método de gradientes de densidade e *swim-up* (Secção 3.3.). O volume de meio de cultura adicionado no final da preparação espermática deve ter em conta a qualidade da amostra, nomeadamente, os parâmetros de concentração e motilidade, de tal forma que permita o carregamento do número de palhetas pretendidas. Após o período de incubação de *swim-up*, é adicionada uma solução de crioprotetor à suspensão espermática, num volume correspondente a 1/3 do volume de meio de cultura previamente adicionado. De modo a evitar o choque osmótico, esta solução deve ser adicionada gota a gota, agitando entre cada adição.

Posteriormente, as palhetas de criopreservação de espermatozoides, previamente identificadas, são carregadas com a suspensão espermática devidamente homogeneizada, e seladas por calor. Após carregamento das palhetas, estas são colocadas a 5°C durante cerca de 30 minutos, seguido de um período de 30 minutos em vapor de azoto (a temperatura aproximada de -80°C), sendo por fim, mergulhadas em azoto líquido (a temperatura aproximada de -196°C). As palhetas de criopreservação de espermatozoides são armazenadas em contentor de azoto líquido, na localização previamente determinada e registada. Nos casos de amostras recolhidas por TESE, estas devem ser processadas de acordo com o protocolo adequado (Secção 3.3.1.) e posteriormente, seguir o mesmo processo de criopreservação com a adição de crioprotetor, seguido de arrefecimento até ao armazenamento em contentor de azoto líquido.

Para a descongelação de gâmetas masculinos, as palhetas de criopreservação são retiradas do contentor de armazenamento em azoto líquido e deixadas a descongelar à temperatura ambiente. Após completa descongelação, a amostra seminal é transferida para um tubo de fundo cónico, à qual são adicionados, cuidadosamente e com agitação, 2 mL de meio de cultura tamponado, pré-aquecido a 37°C, para lavagem da amostra. Esta é centrifugada a 1000 rpm, durante cerca de 15 minutos, a 37°C, sendo posteriormente removido todo o sobrenadante resultante e adicionados cerca de 0,5 mL de meio cultura tamponado, pré-aquecido a 37°C, sem perturbação do pellet de espermatozoides. A amostra final é incubada a 37°C, 6% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub>, durante pelo menos 30 minutos, para *swim-up*, após o qual se encontra disponível para utilização em técnicas de RHA.

### 9.3. Criopreservação de gâmetas femininos

A criopreservação de ovócitos tem vindo a evoluir nos últimos anos no sentido de responder às exigências da medicina reprodutiva. Neste sentido, o desenvolvimento das técnicas de criopreservação de ovócitos tiveram como principal objetivo ultrapassar problemas éticos, legais e religiosos associados à criopreservação de embriões (Argyle *et al.*, 2016).

Para além disso, a criopreservação de ovócitos torna-se particularmente útil para a preservação da fertilidade feminina, quer por razões médicas, quando jovens mulheres são sujeitas a tratamentos gonadotóxicos (Edgar e Gook, 2012), quer por razões



sociais, em casos de adiamento da maternidade (Gianaroli *et al.*, 2012). Esta técnica veio também facilitar o processo de doação de ovócitos, não sendo necessária a sincronização do ciclo da dadora e da respetiva recetora, assim como permitir a manutenção de bancos de dadoras de ovócitos criopreservados (Argyle *et al.*, 2016; Gianaroli *et al.*, 2012; Nagy *et al.*, 2016). O armazenamento de ovócitos em casos de poliovulação exacerbada passa também a ser possível, evitando o desenvolvimento de embriões excedentários (Gianaroli *et al.*, 2012).

Todavia, a criopreservação de gâmetas femininos enfrenta vários desafios, uma vez que os ovócitos, para além de serem células de grandes dimensões com alto conteúdo em água, são também extremamente sensíveis, devido à presença do fuso meiótico, às alterações químicas e físicas que a criopreservação implica, nomeadamente, à formação de gelo intracelular (Kuwayama, 2016). Assim, estas células podem facilmente perder viabilidade e o seu potencial biológico, sendo incapazes de reiniciar o processo de meiose após criopreservação (Herrero *et al.*, 2011). Desta forma, tornou-se imprescindível otimizar os protocolos de criopreservação de modo a evitar a formação de cristais de gelo intracelulares e consequentemente os danos celulares.

Vários são os fatores que influenciam a eficácia clínica da criopreservação de ovócitos incluindo a idade feminina, a qualidade dos ovócitos e, acima de tudo, a técnica utilizada (Gianaroli *et al.*, 2012). Tal como acontece para os embriões, os ovócitos podem ser criopreservados pelo método de congelação lenta ou vitrificação. No entanto, está comprovado que as baixas taxas de arrefecimento da congelação lenta, quando comparada com a vitrificação, tornam esta técnica menos eficaz e segura, estando associada a menores taxas de sobrevivência e pobre desenvolvimento embrionário (Edgar e Gook, 2012; Seki, 2016). Assim, a baixa eficácia inicialmente associada a estas técnicas tornou essencial o aperfeiçoamento dos protocolos de criopreservação. Com o desenvolvimento das técnicas de vitrificação, a criopreservação de ovócitos passou a ser uma realidade, sendo que, atualmente, é apontado como o método de eleição (Argyle *et al.*, 2016). A vitrificação oferece um método simples, rápido e barato, que implica a utilização de elevadas concentrações de crioprotetores, associada a elevadas taxas de arrefecimento, prevenindo a formação de cristais de gelo e consequentemente o risco de lesões celulares, resultando em melhores taxas de sobrevivência, fertilização e gravidez (Argyle *et al.*, 2016; Glujovsky *et al.*, 2014; Rienzi *et al.*, 2012b).

Para a vitrificação de ovócitos, estes são obtidos por punção folicular, após estimulação ovárica adequada e desnudados por método enzimático e mecânico. Após desnudação, os ovócitos são avaliados quanto à sua qualidade e maturidade nuclear, sendo que os ovócitos maduros (MII) e de boa qualidade são selecionados para criopreservação. À semelhança dos protocolos de vitrificação de embriões, para a vitrificação dos ovócitos, estes devem ser transferidos ao longo de meios de criopreservação consecutivos, pré aquecidos a 37°C, com crescente concentração de crioprotetores e tempos decrescentes de incubação em cada meio (Edashige e Kasai, 2016). Por fim, os ovócitos são carregados na palheta de criopreservação, no mínimo de meio possível, a qual é imediatamente submersa em azoto líquido e armazenada a -196°C, em contentores apropriados.

O protocolo de desvitrificação de ovócitos segue também os mesmos princípios da desvitrificação de embriões, sendo que, após a submersão das palhetas de criopreservação no meio de desvitrificação, os ovócitos são transferidos ao longo de soluções com concentração decrescente de crioprotetores e com tempos de incubação progressivamente crescentes. Isto irá permitir a reidratação dos ovócitos e a aquisição da sua competência biológica. Por fim, os ovócitos desvitrificados são lavados e incubados em meio de cultura pré-equilibrado a 37°C, 6% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> até ao momento da inseminação.

## 10. Doação

Os programas de doação de gâmetas e embriões, no âmbito da procriação medicamente assistida, são a única opção para muitos casais, impedidos de recorrer a tratamentos com os seus próprios gâmetas, por inexistência, má qualidade ou por risco de transmissão de doença genética, que assim são impossibilitados de concretizar naturalmente o seu desejo de ter filhos. Estes dependem do altruísmo dos dadores que se prontificam a doar os seus gâmetas ou embriões através de um processo de doação anónimo e totalmente confidencial, regido por um conjunto de procedimentos e normas restritas que promovem a qualidade e segurança de todo o tratamento.

Segundo o artigo 10º da Lei nº 32/2006, em Portugal “pode recorrer-se à dádiva de ovócitos, espermatozoides ou 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 lei portuguesa estabelece também que “os dadores não podem ser havidos como progenitores da criança que vai nascer”, pertencendo esse direito aos recetores dos respetivos gâmetas ou embriões doados (artigo 10º da Lei nº 32/2006).

### 10.1. Doação de gâmetas

A doação de gâmetas é considerada “voluntária, altruísta e solidária, não podendo haver, em circunstância alguma, lugar a qualquer compensação económica ou remuneração, quer para o dador quer para qualquer indivíduo ou entidade”, pelo que a venda de gâmetas é totalmente proibida. Contudo, estão previstas na lei compensações monetárias aos dadores de gâmetas, que visam o reembolso das despesas efetuadas ou dos prejuízos inerentes ao procedimento da dádiva (Artigo 22º da Lei nº 12/2009).

### 10.1.1. Doação de gâmetas masculinos

Os candidatos a dadores de espermatozoides devem ter entre 18 a 40 anos e preencher os requisitos de qualidade seminal adequados, historial médico e psíquico normal, sem história pessoal ou familiar de doenças de transmissão genética e com avaliação negativa de doenças sexualmente transmissíveis.

Para tal, os possíveis dadores devem inicialmente efetuar uma colheita de amostra espermática, com o intuito de realizar um espermograma. Tendo este um resultado favorável no que respeita à qualidade dos parâmetros espermáticos de motilidade, concentração e morfologia, o candidato será sujeito a uma entrevista, avaliação psicológica e consulta médica para recolha de informações relativamente ao historial clínico pessoal e familiar, história reprodutiva e sexual, hábitos de vida e registo das características fenotípicas e demográficas. Posteriormente, é realizada uma análise sanguínea para avaliação do cariótipo e de marcadores víricos, e caso todos os resultados se apresentem normais, o dador é aceite no programa de doação.

O programa de doação de gâmetas masculinos envolve a colheita de cinco a seis amostras seminais, por masturbação, com períodos de abstinência de três a quatro dias. Aquando da primeira amostra, deve realizar-se a avaliação completa dos parâmetros espermáticos de motilidade, concentração e morfologia, que deve ser repetida 24 horas após a criopreservação e descongelação da mesma, de forma a avaliar a extensão de possíveis prejuízos provocados por este processo. Após colheita de cada amostra, estas devem ser processadas segundo o método de gradientes de densidade e *swim-up* (Secção 3.3.) e posteriormente criopreservadas (Secção 9.2.), procedendo-se em cada colheita à avaliação e registo dos parâmetros de concentração e motilidade. As palhetas de criopreservação devem ser armazenadas em contentor de azoto líquido e mantidas em quarentena, durante um período de 180 dias, ao fim do qual é realizada nova análise sanguínea para despistagem de doenças víricas. Revelando-se os resultados negativos para todos os marcadores víricos, o dador é considerado efetivo e as suas amostras passam a estar disponíveis para utilização em técnicas de RHA.

Existem várias indicações para usufruir da doação de espermatozoides, nomeadamente, pacientes azoospérmicos ou com fator grave de infertilidade, portadores de doenças genéticas graves (Berger, 2012), ou ainda mais recentemente aprovado na lei portuguesa, para mulheres sem parceiro masculino (Lei n.º 17/2016).

### 10.1.2. Doação de gâmetas femininos

As dadoras de gâmetas femininos devem ter entre 18 a 35 anos, uma idade mais limitada do que aquela que se verifica para os dadores masculinos, devido ao conhecido declínio de fertilidade feminina a partir dos 35 anos. Estas são inicialmente sujeitas a uma entrevista, avaliação psicológica e consulta médica com exame ginecológico completo para recolher todas as informações necessárias, assim como acontece com os dadores masculinos. As candidatas devem também realizar uma análise sanguínea para estudo genético, hormonal e de marcadores víricos. Se todos os resultados se apresentem normais, a dadora é aceite no programa de doação e aguarda até que seja encontrada uma recetora compatível, tendo em conta o grupo sanguíneo e o fenótipo da dadora.

O programa de doação de gâmetas femininos consiste na realização de um máximo de 3 dádivas por dadora, com um intervalo mínimo de seis meses entre cada uma. Antes do início de cada ciclo, devem ser repetidas as análises sanguíneas e marcadores víricos, para confirmação dos valores normais. A recetora deve assim iniciar a estimulação ovárica controlada, que deve ser sincronizada com a preparação do endométrio da recetora quando a doação de ovócitos é realizada a fresco. Após indução da ovulação, é realizada a punção folicular e os ovócitos recolhidos são utilizados para tratamentos de RHA do casal recetor.

As pacientes que podem beneficiar da doação de ovócitos incluem mulheres com falência ovárica prematura, insuficiência ovárica, disgenesia gonadal, ou ainda mulheres com idade avançada ou doenças genéticas graves (Berger, 2012).

## 10.2. Doação de embriões

A doação de embriões pode ser uma realidade em casos em que casais sujeitos a tratamentos de infertilidade possuem embriões excedentários criopreservados, dos quais não pretendem usufruir, e que simultaneamente prestam o consentimento informado para doação dos seus embriões.

Assim, decorrido o prazo máximo de três anos de armazenamento dos embriões criopreservados, ou por vontade expressa do casal, estes podem ser doados aos beneficiários, cuja indicação médica de infertilidade o aconselhe (Artigo 10º da Lei nº 32/2006). Nestes casos, não há atribuição de qualquer compensação, dado não se verificarem quaisquer despesas adicionais inerentes à doação (Artigo 22.º da Lei n.º 12/2009)



## Conclusão

O desejo de ter um filho constitui para muitos casais um dos principais objetivos de vida e realização pessoal. No entanto, vários são os que enfrentam dificuldades em conceber um filho naturalmente, tendo, portanto, de recorrer a tratamentos especializados de infertilidade. A reprodução humana assistida é, assim, uma área científica em constante evolução na busca de proporcionar as melhores condições e as mais vastas opções de tratamento aos casais que possam de alguma forma ser afetados por fatores de infertilidade.

Neste sentido, várias têm sido as tecnologias desenvolvidas e aperfeiçoadas que têm não só facilitado o trabalho dos laboratórios de PMA, conduzindo a melhores taxas de sucessos, como também têm permitido o acesso de determinados grupos específicos de pacientes às técnicas de RHA, como é o exemplo de pacientes com fatores de infertilidade grave que vieram beneficiar largamente do desenvolvimento da técnica de ICSI.

As técnicas de IIU, FIV e ICSI estão atualmente bem estabelecidas, oferecendo assim as alternativas adequadas a cada caso específico, tendo em conta o contexto de infertilidade ou outro fator que determine a indicação para tratamentos de RHA, como é o caso de pacientes portadores de VIH ou de anomalia genética grave com elevado risco de transmissão à descendência.

Para a melhoria da qualidade do serviço disponível no âmbito da RHA, têm contribuído diversas tecnologias. Os sistemas de Time-lapse permitem atualmente o acompanhamento da cultura embrionária de uma forma mais completa e segura, facilitando a correta seleção de embriões. Também as técnicas de eclosão assistida têm evoluído no sentido de melhorar as taxas de implantação dos embriões resultantes de técnicas de FIV ou ICSI. As técnicas de DGPI têm cada vez mais constituído uma alternativa segura aos testes de diagnóstico pré-natal, evitando deste modo a transferência de embriões com anomalias genéticas graves de transmissão parental. O aperfeiçoamento dos protocolos de criopreservação vieram, de igual forma auxiliar os centros de PMA, permitindo não só a criopreservação de embriões excedentários, como a preservação da fertilidade masculina ou feminina, em casos de risco de desenvolvimento de infertilidade, assim como a manutenção de bancos de dadores de gâmetas.



Recentemente, foi aprovado em parlamento o acesso a técnicas de RHA de mulheres sem parceiro masculino, independentemente do diagnóstico de infertilidade (Artigo 4º da Lei nº 32/2006). Assim, segundo o Artigo 6º da Lei nº17/2016, “podem recorrer às técnicas de PMA os casais de sexo diferente ou os casais de mulheres, respetivamente casados ou casadas ou que vivam em condições análogas às dos cônjuges, bem como todas as mulheres independentemente do estado civil e da respetiva orientação sexual”. Esta lei vem, deste modo, permitir que não só mulheres solteiras, como homossexuais tenham a possibilidade de conceber um filho biológico e assim, em iguais direitos, realizar o seu desejo de constituir família.

Atualmente, encontra-se também em discussão e possível aprovação em parlamento, a legalização da maternidade de substituição. Esta consiste nos casos em que uma mulher se disponha a suportar uma gravidez por conta de outrem e a entregar a criança após o parto, renunciando aos poderes e deveres próprios da maternidade aos respetivos beneficiários. Propõe-se que a maternidade de substituição só seja aplicável a casos excecionais, em que a beneficiária não consiga conceber uma gravidez, quer por ausência de útero, quer por lesão ou doença. Para além disso, caso a lei seja alargada a todos os casais beneficiários, esta poderá também ser uma importante alteração para casais homossexuais masculinos que pretendam ter um filho biológico, podendo ser esta a sua única opção.

## Considerações Finais

No âmbito deste estágio curricular para a conclusão do ciclo de estudos do Mestrado em Biologia Celular e Molecular, que decorreu nas instalações do Centro de Estudos de Infertilidade e Esterilidade, ao longo do presente ano letivo, tive a oportunidade de compreender a rotina diária de um laboratório especializado em procriação medicamente assistida (PMA) e contactar com diversas experiências enriquecedoras.

Desta forma, tive a possibilidade de realizar de forma autónoma diversos espermogramas e o processamento de amostras seminais para posterior utilização em técnicas de IIU, FIV e ICSI.

Foi-me também possível auxiliar em punções foliculares, na pesquisa e desnudação de ovócitos e respetiva avaliação da maturidade nuclear para utilização em contexto de ICSI. Realizei inseminações de ovócitos em contexto de FIV e com a utilização de material biológico excedentário foi-me concedida a oportunidade de experienciar, por diversas vezes, a microinjeção intracitoplasmática (ICSI). Realizei a desnudação de ovócitos após FIV e a respetiva avaliação da fertilização. Acompanhei a cultura dos embriões e a sua classificação diária, até ao momento da seleção de embriões para transferência intrauterina, a qual tive também a possibilidade de treinar, por diversas vezes, com material excedentário, no que diz respeito ao carregamento do cateter.

De igual forma, realizei também criopreservações de gâmetas masculinos para tratamentos de RHA, de embriões excedentários e de gâmetas femininos excedentários, uma técnica que está atualmente em expansão nos laboratórios de PMA.

Pude também acompanhar o processo de avaliação e seleção de dadores masculinos, e em seguimento realizar o processamento e criopreservação das amostras seminais e a organização do banco de dadores de gâmetas masculinos, procedendo também à sua descongelação para utilização em ciclos de RHA.

Tive também a hipótese de assistir a técnicas menos recorrentes como é o caso da biópsia de embriões em fase de clivagem para DGPI e da TESE, tendo oportunidade de participar no processo de pesquisa de espermatozoides na polpa testicular e seu posterior processamento e criopreservação.

Para além da experiência técnica específica na área da RHA, este estágio permitiu-me igualmente adquirir competências de gestão do stock de material e meios, organização e planeamento de trabalho e elaboração de registos, assim como o contacto com os pacientes, as suas angústias e receios, mas principalmente a imensa esperança que sempre mantêm e que é para mim absolutamente inspirador.

Acima de tudo, este estágio permitiu-me a consolidação e perceção de que esta é uma área de extrema responsabilidade e rigor, com a consciência de que agimos para criar vida, crianças muito desejadas pelos seus futuros pais e que no fundo o destino e, esperamos nós, a felicidade de muitas famílias se encontra nas nossas mãos. Desde os casos mais simples aos mais complexos e sensíveis com que nos deparamos, todos necessitam e merecem o nosso maior empenho, cuidado e atenção a cada passo, porque assim o devemos aos futuros pais.

O acompanhar de todo o processo, desde o processamento das amostras seminais, passando pela punção folicular, a pesquisa e avaliação dos ovócitos, a sua inseminação, o acompanhamento da cultura embrionária, a seleção dos embriões, até ao momento tão esperado da transferência, recebendo no fim a melhor notícia possível, de que estes implantaram e irão conduzir a uma gravidez, foi para mim um privilégio que espero continuar a ter ao longo da minha vida.

De uma forma geral, este estágio contribuiu para consolidar o meu desejo de me tornar uma embriologista dedicada e apaixonada pelo meu trabalho, de aperfeiçoar as técnicas que este ano aprendi, porque sei que só com muito esforço e empenho se adquire a experiência necessária que esta área assim exige.

## Referências bibliográficas

- Abrao, M.S., Muzii, L., e Marana, R. (2013). Anatomical causes of female infertility and their management. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 123.
- Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., e Chyatte, M.R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 13, 1–37.
- Ahmad, A., Ahmed, A., e Patrizio, P. (2013). Cystic fibrosis and fertility. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 25, 167–172.
- Al-Inany, H.G., Youssef, M.A., Aboulghar, M., Broekmans, F., Sterrenburg, M., Smit, J., e Abou-Setta, A.M. (2011). Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology. *Cochrane database Syst. Rev.*
- Alper, M.M. (2012). Treatment options III: In vitro fertilization. In *The Boston IVF Handbook of infertility*, S.R. Bayer, M.M. Alper, e A.S. Penzias, eds. (Informa Healthcare), pp. 69–82.
- Alvarez, S. (2015). Do some addictions interfere with fertility? *Fertil. Steril.* 103, 22–26.
- Argyle, C.E., Harper, J.C., e Davies, M.C. (2016). Oocyte cryopreservation: where are we now? *Hum. Reprod. Update* 22, 440–449.
- ASiRM, e ESIGoE (2011). Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. Istanbul consensus workshop on embryo assessment: Proceedings of an expert meeting. *Hum. Reprod.* 26, 1270–1283.
- ASRM, e SART (2014). Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine and Society for Assisted Reproductive Technology. Role of assisted hatching in in vitro fertilization: A guideline. *Fertil. Steril.* 102, 348–351.
- Balaban, B., Sakkas, D., e Gardner, D.K. (2014). Laboratory Procedures for Human In Vitro Fertilization. *Semin. Reprod. Med.* 32, 272–282.
- Balash, J. (2010). Ageing and infertility: an overview. *Gynecol. Endocrinol.* 26, 855–860.
- Barnes, F.L. (2012). Micromanipulation. In *Textbook of Assisted Reproductive Technologies*, D.K. Gardner, A. Weissman, C.M. Howles, e Z. Shoham, eds. (Informa Healthcare), pp. 163–171.

- Basile, N., Nogales, M. del C., Bronet, F., Florensa, M., Riqueiros, M., Rodrigo, L., García-Velasco, J., e Meseguer, M. (2014). Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis. *Fertil. Steril.* *101*, 699–704.
- Bayer, S.R. (2012a). Factors affecting fertility. In *The Boston IVF Handbook of infertility*, S.R. Bayer, M.M. Alper, e A.S. Penzias, eds. (Informa Healthcare), pp. 11–18.
- Bayer, S.R. (2012b). Treatment options II: Intrauterine inseminations. In *The Boston IVF Handbook of infertility*, S.R. Bayer, M.M. Alper, e A.S. Penzias, eds. (Informa Healthcare), pp. 65–68.
- Bayer, S.R., e Alper, M.M. (2012). The infertility workup. In *The Boston IVF Handbook of infertility*, S.R. Bayer, M.M. Alper, e A.S. Penzias, eds. (Informa Healthcare), pp. 19–34.
- Beall, S.A., e Decherney, A. (2012). History and challenges surrounding ovarian stimulation in the treatment of infertility. *Fertil. Steril.* *97*, 795–801.
- Belloc, S., Hazout, A., Zini, A., Merviel, P., Cabry, R., Chahine, H., Copin, H., e Benkhalifa, M. (2014). How to overcome male infertility after 40: Influence of paternal age on fertility. *Maturitas* *78*, 22–29.
- Berger, B.M. (2012). Treatment options IV: Third party reproduction. In *The Boston IVF Handbook of infertility*, S.R. Bayer, M.M. Alper, e A.S. Penzias, eds. (Informa Healthcare), pp. 83–92.
- Bernard, V., Donadille, B., Zenaty, D., Courtilot, C., Salenave, S., Brac De La Perrière, A., Albarel, F., Fèvre, A., Kerlan, V., Brue, T., *et al.* (2016). Spontaneous fertility and pregnancy outcomes amongst 480 women with Turner syndrome. *Hum. Reprod.* *34*, 782–788.
- Bernie, A.M., Mata, D.A., Ramasamy, R., e Schlegel, P.N. (2015). Comparison of microdissection testicular sperm extraction , conventional testicular sperm extraction , and testicular sperm aspiration for nonobstructive azoospermia : a systematic review and meta-analysis. *Fertil. Steril.* *104*, 1099–1103.
- Blumer, C.G., Restelli, A.E., Giudice, P.T. Del, Soler, T.B., Fraietta, R., Nichi, M., Bertolla, R.P., e Cedenho, A.P. (2012). Effect of varicocele on sperm function and semen oxidative stress. *BJU Int.* *109*, 259–265.

- Blundell, R. (2007). Causes of Infertility. *Int. J. Mol. Med. Adv. Sci.* 3, 63–65.
- Bontekoe, S., Blake, D., Heineman, M.J., Williams, E.C., e Johnson, N. (2010). Adherence compounds in embryo transfer media for assisted reproductive technologies. *Cochrane database Syst. Rev.* 1–114.
- Bulletti, C., Coccia, M.E., Bttistoni, S., e Borini, A. (2010). Endometriosis and infertility. *J. Assist. Reprod. Genet.* 27, 441–447.
- Bunge, R.G., e Sherman, J.K. (1953). Fertilizing Capacity of Frozen Human Spermatozoa. *Nature* 172, 767–768.
- Bungum, L., e Bungum, M. (2009). Embryo transfer. In *Textbook of Assisted Reproductive Technologies*, D.K. Gardner, A. Weissman, C.M. Howles, e Z. Shoham, eds. (Informa Healthcare), pp. 693–699.
- Busacca, M., Riparini, J., Somigliana, E., Oggioni, G., Izzo, S., Vignali, M., e Candiani, M. (2006). Postsurgical ovarian failure after laparoscopic excision of bilateral endometriomas. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 195, 421–425.
- Campbell, A., e Fishel, S. (2015). *Atlas of Time Lapse Embryology* (CRC Press).
- Campbell, A., Fishel, S., Bowman, N., Duffy, S., Sedler, M., e Hickman, C.F.L. (2013). Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reprod. Biomed. Online* 26, 477–485.
- Capozzi, A., Scambia, G., Pontecorvi, A., e Lello, S. (2015). Hyperprolactinemia: pathophysiology and therapeutic approach. *Gynecol. Endocrinol.* 31, 506–510.
- Carrell, D.T., e Aston, K.I. (2013). *Spermatogenesis: Methods and Protocols* (Humana Press).
- Chen, A.A., Tan, L., Suraj, V., Pera, R.R., e Shen, S. (2013). Biomarkers identified with time-lapse imaging: Discovery, validation, and practical application. *Fertil. Steril.* 99, 1035–1043.
- Cobo, A., Romero, J.L., Pérez, S., de los Santos, M.J., Meseguer, M., e Remohí, J. (2010). Storage of human oocytes in the vapor phase of nitrogen. *Fertil. Steril.* 94, 1903–1907.
- Cohen, M.R. (1962). Intrauterine insemination. *Int. J. Fertil.* 7, 235–240.

- Cohen, J., Elsner, C., Kort, H., Malter, H., Massey, J., Mayer, M.P., e Wiemer, K. (1990). Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation. *Hum. Reprod.* 5, 7–13.
- Collins, S.C. (2013). Preimplantation genetic diagnosis: technical advances and expanding applications. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 25, 201–206.
- Conaghan, J., Chen, A.A., Willman, S.P., Ivani, K., Chenette, P.E., Boostanfar, R., Baker, V.L., Adamson, G.D., Abusief, M.E., Gvakharia, M., *et al.* (2013). Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial. *Fertil. Steril.* 100, 412–419.
- Corbett, S., Shmorgun, D., Claman, P., Healey, S., Gysler, M., e Reproductive Endocrinology Infertility Committee (2014). The Prevention of Ovarian Hyperstimulation Syndrome. *J. Obstet. Gynaecol. Canada* 36, 1024–1033.
- Cruz, M., Garrido, N., Herrero, J., Pérez-Cano, I., Muñoz, M., e Meseguer, M. (2012). Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reprod. Biomed. Online* 25, 371–381.
- Dahdouh, E.M., Balayla, J., Audibert, F., Wilson, R.D., Brock, J.-A., Campagnolo, C., Carroll, J., Chong, K., Gagnon, A., Johnson, J.-A., *et al.* (2015). Technical Update: Preimplantation Genetic Diagnosis and Screening. *J. Obstet. Gynaecol. Canada* 37, 451–463.
- Damario, M.A. (2014). General aspects of fertility and infertility. *Methods Mol. Biol.* 1154, 3–23.
- Das, M., Al-Hathal, N., San-Gabriel, M., Phillips, S., Kadoch, I.-J., Bissonnette, F., Holzer, H., e Zini, A. (2013). High prevalence of isolated sperm DNA damage in infertile men with advanced paternal age. *J. Assist. Reprod. Genet.* 30, 843–848.
- Dechanet, C., Anahory, T., Mathieu Daude, J.C., Quantin, X., Reyftmann, L., Hamamah, S., Hedon, B., e Dechaud, H. (2011). Effects of cigarette smoking on reproduction. *Hum. Reprod. Update* 17, 76–95.
- 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. *Adv. Urol.* 1–12.

- Dunselman, G.A.J., Vermeulen, N., Becker, C., Calhaz-Jorge, C., D'Hooghe, T., De Bie, B., Heikinheimo, O., Horne, A.W., Kiesel, L., Nap, A., *et al.* (2014). ESHRE guideline: Management of women with endometriosis. *Hum. Reprod.* 29, 400–412.
- Edashige, K., e Kasai, M. (2016). The movement of water and cryoprotectants in mammalian oocytes and embryos: Membrane permeability and aquaporins. In *Vitrification in Assisted Reproduction*, M.J. Tucker, e J. Liebermann, eds. (CCR Press), pp. 47–54.
- Edgar, D.H., e Gook, D.A. (2012). A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. *Hum. Reprod. Update* 18, 536–554.
- Elder, K. (2005). Routine gamete handling: oocyte collection and embryo culture. In *Textbook of In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction*, P.R. Brinsden, ed. (Informa Healthcare), pp. 287–307.
- Elder, K., e Dale, B. (2011). *In-vitro fertilization* (Cambridge University Press).
- ESHRE Capri Workshop Group (2009). Intrauterine insemination. *Hum. Reprod. Update* 15, 265–277.
- Fatemi, H.M., Blockeel, C., e Devroey, P. (2012). Ovarian Stimulation: Today and Tomorrow. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13, 392–397.
- Fechner, A., Fong, S., e McGovern, P. (2008). A review of Kallmann syndrome: genetics, pathophysiology, and clinical management. *Obstet. Gynecol. Surv.* 63, 189–194.
- Fourman, L.T., e Fazeli, P.K. (2015). Neuroendocrine causes of amenorrhea--an update. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100, 812–824.
- Fox, S.I. (2011). Reproduction. In *Human Physiology*, (McGraw-Hill), pp. 694–749.
- Freour, T., Masson, D., Mirallie, S., Jean, M., Bach, K., Dejoie, T., e Barriere, P. (2008). Active smoking compromises IVF outcome and affects ovarian reserve. *Reprod. Biomed. Online* 16, 96–102.
- Fritz, M.A., e Speroff, L. (2010). *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility* (Lippincott Williams & Wilkins).



- Fronczak, C.M., Kim, E.D., e Barqawi, A.B. (2012). The insults of illicit drug use on male fertility. *J. Androl.* 33, 515–528.
- Gardner, D.K., e Lane, M. (2012). Culture systems for the human embryo. In *Textbook of Assisted Reproductive Technologies*, D.K. Gardner, A. Weissman, C.M. Howles, e Z. Shoham, eds. (Informa Healthcare), pp. 218–239.
- Gaur, D.S., Talekar, M.S., e Pathak, V.P. (2010). Alcohol intake and cigarette smoking: impact of two major lifestyle factors on male fertility. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 53, 35–40.
- Gianaroli, L., Racowsky, C., Geraedts, J., Cedars, M., Makrigiannakis, A., e Lobo, R.A. (2012). Best practices of ASRM and ESHRE: A journey through reproductive medicine. *Fertil. Steril.* 98, 1380–1394.
- Glezer, A., e Bronstein, M.D. (2015). Prolactinomas. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 44, 71–78.
- Glujovsky, D., Riestra, B., Sueldo, C., Fisz bajn, G., Repping, S., Nodar, F., Papier, S., e Ciapponi, A. (2014). Vitrification versus slow freezing for women undergoing oocyte cryopreservation. *Cochrane database Syst. Rev.* 5, 1–27.
- Gosden, L.L.V., Berrios, R., Bodine, R., Clarke, R.N., e Zaninovic, N. (2009). The human embryo: slow freezing. In *Textbook of Assisted Reproductive Technologies*, D.K. Gardner, A. Weissman, C.M. Howles, e Z. Shoham, eds. (Informa Healthcare), pp. 275–287.
- Gradison, M. (2012). Pelvic inflammatory disease. *Am. Fam. Physician* 85, 791–796.
- Granot, I., e Dekel, N. (2012). Preparation and evaluation of oocytes for ICSI. In *Textbook of Assisted Reproductive Technologies*, D.K. Gardner, A. Weissman, C.M. Howles, e Z. Shoham, eds. (Informa Healthcare), pp. 114–121.
- Greenhall, E., e Vessey, M. (1990). The prevalence of subfertility: a review of the current confusion and a report of two new studies. *Fertil. Steril.* 54, 978–983.
- Grynberg, M., Bidet, M., Benard, J., Poulain, M., Sonigo, C., Cédric-Durnerin, I., e Polak, M. (2016). Fertility preservation in Turner syndrome. *Fertil. Steril.* 105, 13–19.

- Guyton, A.C., e Hall, J.E. (2016a). Reproductive and Hormonal Functions of the Male (and Function of the Pineal Gland). In *Textbook Of Medical Physiology*, (Elsevier), pp. 1021–1036.
- Guyton, A.C., e Hall, J.E. (2016b). Female Physiology Before Pregnancy and Female Hormones. In *Textbook Of Medical Physiology*, (Elsevier), pp. 1037–1054.
- Guyton, A.C., e Hall, J.E. (2016c). Pregnancy and Lactation. In *Textbook Of Medical Physiology*, (Elsevier), pp. 1055–1081.
- Hackshaw, A., Rodeck, C., e Boniface, S. (2011). Maternal smoking in pregnancy and birth defects: a systematic review based on 173 687 malformed cases and 11.7 million controls. *Hum. Reprod. Update* 17, 589–604.
- Haggerty, C.L., Gottlieb, S.L., Taylor, B.D., Low, N., Xu, F., e Ness, R.B. (2010). Risk of sequelae after Chlamydia trachomatis genital infection in women. *J. Infect. Dis.* 201 Suppl , S134–S155.
- Haller-Kikkatalo, K., Uibo, R., Kurg, A., e Salumets, A. (2015). The prevalence and phenotypic characteristics of spontaneous premature ovarian failure: A general population registry-based study. *Hum. Reprod.* 30, 1229–1238.
- Hammadeh, M.E., Fischer-Hammadeh, C., e Ali, K.R. (2011). Assisted hatching in assisted reproduction: A state of the art. *J. Assist. Reprod. Genet.* 28, 119–128.
- Hammoud, A.O., Wilde, N., Gibson, M., Parks, A., Carrell, D.T., e Meikle, A.W. (2008). Male obesity and alteration in sperm parameters. *Fertil. Steril.* 90, 2222–2225.
- Hammoud, A.O., Meikle, A.W., Reis, L.O., Gibson, M., Peterson, C.M., e Carrell, D.T. (2012). Obesity and male infertility: a practical approach. *Semin. Reprod. Med.* 30, 486–495.
- Hardarson, T., Löfman, C., Coull, G., Sjögren, A., Hamberger, L., e Edwards, R. (2002). Internalization of cellular fragments in a human embryo: time-lapse recordings. *Reprod. Biomed. Online* 5, 36–38.
- Hardarson, Th., Van Landuyt, L., e Jones, G. (2012). The blastocyst. *Hum. Reprod.* 27, 72–91.
- Harlev, A., Agarwal, A., Gunes, S.O., Shetty, A., e du Plessis, S.S. (2015). Smoking and Male Infertility: An Evidence-Based Review. *World J. Mens. Health* 33, 143–160.

- Harton, G.L., Magli, M.C., Lundin, K., Montag, M., Lemmen, J., e Harper, J.C. (2011). ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group: best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS) diagnosis/screening (PGD/PGS). *Hum. Reprod.* 26, 41–46.
- Hassan, M.-A.M., Lavery, S. a, e Trew, G.H. (2010). Congenital uterine anomalies and their impact on fertility. *Women's Heal.* 6, 443–461.
- Hayashi, T., Miyata, A., e Yamada, T. (2008). The impact of commonly prescribed drugs on male fertility. *Hum. Fertil.* 11, 191–196.
- Herrero, L., Martínez, M., e Garcia-Velasco, J.A. (2011). Current status of human oocyte and embryo cryopreservation. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 23, 245–250.
- Hickman, C., Campbell, A., Duffy, S., e Fishel, S. (2012). Reverse cleavage: its significance with regards to human embryo morhpokinetics, ploidy and stimulation protocol. *Hum. Reprod.* 27, 103–105.
- Homan, G.F., Davies, M., e Norman, R. (2007). The impact of lifestyle factors on reproductive performance in the general population and those undergoing infertility treatment: A review. *Hum. Reprod. Update* 13, 209–223.
- Huirne, J.A., e Schats, R. (2009). The use of GnRH agonists. In *Textbook of Assisted Reproductive Technologies*, D.K. Gardner, A. Weissman, C.M. Howles, e Z. Shoham, eds. (Informa Healthcare), pp. 529–538.
- Ibrahim, E., Lynne, C.M., e Brackett, N.L. (2016). Male fertility following spinal cord injury : an update. *Andrology* 4, 13–26.
- Jeyendran, R.S. (2003). *Protocols for semen analysis in clinical diagnosis* (Parthenon Publishing).
- Jones, R.E., e Lopez, K.H. (2014). - *Human Reproductive Biology* (Elsevier Inc.).
- Jungheim, E.S., Travieso, J.L., Carson, K.R., e Moley, K.H. (2012). Obesity and reproductive function. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* 39, 479–493.
- Kamel, R.M. (2010). Management of the infertile couple : an evidence- based protocol. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 8, 21–28.

- Karavolos, S., Stewart, J., Evbuomwan, I., McEleny, K., e Aird, I. (2013). Assessment of the infertile male. *Obstet. Gynaecol.* 15, 1–9.
- Karnis, M.F. (2012). Fertility, pregnancy, and medical management of Turner syndrome in the reproductive years. *Fertil. Steril.* 98, 787–791.
- Kasper, D.L., Hauser, S.L., Jameson, J.L., Fauci, A.S., Longo, D.L., e Loscalzo, J. (2015). Reproductive Endocrinology. In *Harrison's Principles of Internal Medicine*, (McGraw-Hill), pp. 2349–2391.
- Katz, D.J., Kolon, T.F., Feldman, D.R., e Mulhall, J.P. (2013). Fertility preservation strategies for male patients with cancer. *Nat. Rev. Urol.* 10, 463–472.
- Kidd, S.A., Eskenazi, B., e Wyrobek, A.J. (2001). Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertil. Steril.* 75, 237–248.
- Kirkegaard, K., Agerholm, I.E., e Ingerslev, H.J. (2012). Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. *Hum. Reprod.* 27, 1277–1285.
- Kirkegaard, K., Ahlstrom, A., Ingerslev, H.J., e Hardarson, T. (2015). Choosing the best embryo by time lapse versus standard morphology. *Fertil. Steril.* 103, 323–332.
- Klenov, V.E., e Jungheim, E.S. (2014). Obesity and reproductive function: a review of the evidence. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 26, 445–460.
- Kopeika, J., Thornhill, A., e Khalaf, Y. (2015). The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Hum. Reprod. Update* 21, 209–227.
- Kovac, J.R., Khanna, A., e Lipshultz, L.I. (2015). The Effects of Cigarette Smoking on Male Fertility Jason. *Postgrad. Med. J.* 127, 338–341.
- Kovacs, P. (2014). Embryo selection: the role of time-lapse monitoring. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 12, 124–135.
- Kühnert, B., e Nieschlag, E. (2004). Reproductive functions of the ageing male. *Hum. Reprod. Update* 10, 327–339.
- Kupis, L., Dobronski, P.A., e Radziszewski, P. (2015). Varicocele as a source of male infertility - Current treatment techniques. *Cent. Eur. J. Urol.* 68, 365–370.

- Kuwayama, M. (2016). Vitrification of oocytes: General considerations and the use of the Cryotec method. In *Vitrification in Assisted Reproduction*, M.J. Tucker, e J. Liebermann, eds. (CCR Press), pp. 77–86.
- Lanzendorf, S.E., Maloney, M.K., Veeck, L.L., Slusser, J., Hodgen, G.D., e Rosenwaks, Z. (1988). A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. *Fertil. Steril.* 49, 835–842.
- Larman, M.G., e Vanderzwalmen, P. (2016). Open versus closed systems. In *Vitrification in Assisted Reproduction*, M.J. Tucker, e J. Liebermann, eds. (CCR Press), pp. 55–59.
- Lemmen, J.G., Agerholm, I., e Ziebe, S. (2008). Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod. Biomed. Online* 17, 385–391.
- Leung, A., Mira, J., e Hsiao, W. (2014). Updates on sperm retrieval techniques. *Transl. Androl. Urol.* 3, 94–101.
- Liu, Y., Chapple, V., Roberts, P., e Matson, P. (2014). Prevalence, consequence, and significance of reverse cleavage by human embryos viewed with the use of the Embryoscope time-lapse video system. *Fertil. Steril.* 102, 1295–1300.
- Ludwig, M. (2009). GnRH antagonists. In *Textbook of Assisted Reproductive Technologies*, D.K. Gardner, A. Weissman, C.M. Howles, e Z. Shoham, eds. (Informa Healthcare), pp. 539–552.
- Lynch, C.D., Sundaram, R., Maisog, J.M., Sweeney, A.M., e Buck Louis, G.M. (2014). Preconception stress increases the risk of infertility: Results from a couple-based prospective cohort study-the LIFE study. *Hum. Reprod.* 29, 1067–1075.
- Macer, M.L., e Taylor, H.S. (2012). Endometriosis and Infertility: A Review of the Pathogenesis and Treatment of Endometriosis-associated Infertility. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* 39, 535–549.
- Maiburg, M., Repping, S., e Giltay, J. (2012). The genetic origin of Klinefelter syndrome and its effect on spermatogenesis. *Fertil. Steril.* 98, 253–260.
- Marcus, S.F. (2005). Intrauterine insemination. In *Textbook of In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction*, P.R. Brinsden, ed. (Informa Healthcare), pp. 259–269.

- Martini, F.H., e Bartholomew, E.F. (2011). *Essentials of Anatomy and Physiology* (Pearson Education, Limited).
- Mascarenhas, M.N., Flaxman, S.R., Boerma, T., Vanderpoel, S., e Stevens, G.A. (2012). National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLoS Med.* 9, 1–12.
- Meczekalski, B., Katulski, K., Czyzyk, A., Podfigurna-Stopa, A., e Maciejewska-Jeske, M. (2014). Functional hypothalamic amenorrhea and its influence on women's health. *J. Endocrinol. Invest.* 37, 1049–1056.
- Meseguer, M., Herrero, J., Tejera, A., Hilligsøe, K.M., Ramsing, N.B., e Remohí, J. (2011). The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum. Reprod.* 26, 2658–2671.
- Meseguer, M., Rubio, I., Cruz, M., Basile, N., Marcos, J., e Requena, A. (2012). Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: A retrospective cohort study. *Fertil. Steril.* 98, 1481–1489.
- Mio, Y., e Maeda, K. (2008). Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 199, 1–5.
- Monnier-Barbarino, P., Forges, T., Faure, G.C., e Béné, M.C. (2005). Gonadal antibodies interfering with female reproduction. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 19, 135–148.
- Montag, M.H.M., Pedersen, K.S., e Ramsing, N.B. (2014). Time-lapse imaging of embryo development: using morphokinetic analysis to select viable embryos. In *Culture Media, Solutions, and Systems in Human ART*, P. Quinn, ed. pp. 211–234.
- Mukaida, T., e Oka, C. (2016). Vitrification of cleavage-stage embryos and blastocysts and their neonatal outcomes. In *Vitrification in Assisted Reproduction*, M.J. Tucker, e J. Liebermann, eds. (CCR Press), pp. 151–161.
- Murphy, M.P., Holmgren, A., Larsson, N.-G., Halliwell, B., Chang, C.J., Kalyanaraman, B., Rhee, S.G., Thornalley, P.J., Partridge, L., Gems, D., *et al.* (2011). Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metab.* 13, 361–366.
- NAFA, e ESHRE-SIGA (2002). *Manual on Basic Semen Analysis*.

- Nagy, Z.P., Cobo, A., e Chang, C.-C. (2016). Oocyte vitrification: Donor «egg banking». In *Vitrification in Assisted Reproduction*, M.J. Tucker, e J. Liebermann, eds. (CCR Press), pp. 129–136.
- Nangia, A.K., Krieg, S.A., e Kim, S.S. (2013). Clinical guidelines for sperm cryopreservation in cancer patients. *Fertil. Steril.* 100, 1203–1209.
- Nargund, V.H. (2015). Effects of psychological stress on male fertility. *Nat. Rev. Urol.* 12, 373–382.
- Neri, Q. V., Monahan, D., Rosenwaks, Z., e Palermo, G.D. (2012). Intracytoplasmic sperm injection: Technical aspects. In *Textbook of Assisted Reproductive Techniques*, D.K. Gardner, A. Weissman, C.M. Howles, e Z. Shoham, eds. (Informa Healthcare), pp. 172–185.
- Ng, E.H.Y., e Ho, P.C. (2007). Ageing and ART: a waste of time and money? *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 21, 5–20.
- Nguyen, K.-H.D., Zimon, A.E., e Thornton, K.L. (2012). Preimplantation genetic screening and diagnosis. In *The Boston IVF Handbook of infertility*, S.R. Bayer, M.M. Alper, e A.S. Penzias, eds. (Informa Healthcare), pp. 107–116.
- Niimura, S. (2003). Time-lapse videomicrographic analyses of contractions in mouse blastocysts. *J. Reprod. Dev.* 49, 413–423.
- Orvieto, R., e Patrizio, P. (2013). GnRH agonist versus GnRH antagonist in ovarian stimulation: An ongoing debate. *Reprod. Biomed. Online* 26, 4–8.
- Oskowitz, S.P. (2012). Treatment options I: Ovulation induction. In *The Boston IVF Handbook of infertility*, S.R. Bayer, M.M. Alper, e A.S. Penzias, eds. (Informa Healthcare), pp. 57–64.
- Otsuki, J., Nagai, Y., e Chiba, K. (2007). Lipofuscin bodies in human oocytes as an indicator of oocyte quality. *J. Assist. Reprod. Genet.* 24, 263–270.
- Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., e Van Steirteghem, A.C. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet (London, England)* 340, 17–18.
- Palermo, G.D., Neri, Q. V., Monahan, D., Kocent, J., e Rosenwaks, Z. (2012). Development and current applications of assisted fertilization. *Fertil. Steril.* 97, 248–259.

- Palermo, G.D., Neri, Q. V., e Rosenwaks, Z. (2015). To ICSI or not to ICSI. *Semin. Reprod. Med.* 33, 92–102.
- Paoli, D., Lombardo, F., Lenzi, A., e Gandini, L. (2014). Sperm cryopreservation: effects on chromatin structure. *Adv. Exp. Med. Biol.* 791, 137–150.
- Papale, L., Fiorentino, A., Montag, M., e Tomasi, G. (2012). The zygote. *Hum. Reprod.* 27, 22–49.
- Parmegiani, L., Accorsi, A., Cognigni, G.E., Bernardi, S., Troilo, E., e Filicori, M. (2010). Sterilization of liquid nitrogen with ultraviolet irradiation for safe vitrification of human oocytes or embryos. *Fertil. Steril.* 94, 1525–1528.
- Payne, D., Flaherty, S.P., Barry, M.F., e Matthews, C.D. (1997). Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum. Reprod.* 12, 532–541.
- Payne, D., Okuda, A., Wakatsuki, Y., Takeshita, C., Iwata, K., Shimura, T., Yumoto, K., Ueno, Y., Flaherty, S., e Mio, Y. (2007). Time-lapse recording identifies human blastocysts at risk of producing monzygotic twins. *Hum. Reprod.* 2, 9–10.
- Plotton, I., Brosse, A., Cuzin, B., e Lejeune, H. (2014). Klinefelter syndrome and TESE-ICSI. *Ann. Endocrinol. (Paris)*. 75, 118–125.
- Pouresmaeili, F., e Fazeli, Z. (2014). Premature ovarian failure: a critical condition in the reproductive potential with various genetic causes. *Int. J. Fertil. Steril.* 8, 1–12.
- Prados, F.J., Debrock, S., Lemmen, J.G., e Agerholm, I. (2012). The cleavage stage embryo. *Hum. Reprod.* 27, 50–71.
- Rachoń, D., e Teede, H. (2010). Ovarian function and obesity--interrelationship, impact on women's reproductive lifespan and treatment options. *Mol. Cell. Endocrinol.* 316, 172–179.
- Ray, A., Shah, A., Gudi, A., e Homburg, R. (2012). Unexplained infertility: An update and review of practice. *Reprod. Biomed. Online* 24, 591–602.
- Reindollar, R.H. (2011). Turner syndrome: contemporary thoughts and reproductive issues. *Semin. Reprod. Med.* 29, 342–352.



- Rienzi, L.F., e Ubaldi, F.M. (2012). Oocyte retrieval and selection. In *Textbook of Assisted Reproductive Technologies*, D.K. Gardner, A. Weissman, C.M. Howles, e Z. Shoham, eds. (Informa Healthcare), pp. 96–113.
- Rienzi, L., Romano, S., Albricci, L., Maggiulli, R., Capalbo, A., Baroni, E., Colamaria, S., Sapienza, F., e Ubaldi, F. (2010). Embryo development of fresh «versus» vitrified metaphase II oocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Hum. Reprod.* 25, 66–73.
- Rienzi, L., Balaban, B., Ebner, T., e Mandelbaum, J. (2012a). The oocyte. *Hum. Reprod.* 27, 2–21.
- Rienzi, L., Cobo, A., Paffoni, A., Scarduelli, C., Capalbo, A., Vajta, G., Remohí, J., Ragni, G., e Ubaldi, F.M. (2012b). Consistent and predictable delivery rates after oocyte vitrification: an observational longitudinal cohort multicentric study. *Hum. Reprod.* 27, 1606–1612.
- Rizk, B., Garcia-Velasco, J., Sallam, H., e Makrigiannakis, A. (2008). *Infertility and assisted reproduction* (Cambridge University Press).
- Robertshaw, I., Khoury, J., Abdallah, M.E., Warikoo, P., e Hofmann, G.E. (2014). The effect of paternal age on outcome in assisted reproductive technology using the ovum donation model. *Reprod. Sci.* 21, 590–593.
- Robker, R.L., Akison, L.K., Bennett, B.D., Thrupp, P.N., Chura, L.R., Russell, D.L., Lane, M., e Norman, R.J. (2009). Obese women exhibit differences in ovarian metabolites, hormones, and gene expression compared with moderate-weight women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 1533–1540.
- Rooney, K.L., e Domar, A.D. (2014). The impact of lifestyle behaviors on infertility treatment outcome. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 26, 181–185.
- Rubio, I., Kuhlmann, R., Agerholm, I., Kirk, J., Herrero, J., Escribá, M.-J., Bellver, J., e Meseguer, M. (2012). Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study. *Fertil. Steril.* 98, 1458–1463.
- Rubio, I., Galán, A., Larreategui, Z., Ayerdi, F., Bellver, J., Herrero, J., e Meseguer, M. (2014). Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope. *Fertil. Steril.* 102, 1287–1294.

- Sauer, M. V. (2015). Reproduction at an advanced maternal age and maternal health. *Fertil. Steril.* *103*, 1136–1143.
- Seki, S. (2016). Importance of cooling versus warming rates in vitrification techniques. In *Vitrification in Assisted Reproduction*, M.J. Tucker, e J. Liebermann, eds. (CCR Press), pp. 43–45.
- Seki, S., e Mazur, P. (2008). Effect of warming rate on the survival of vitrified mouse oocytes and on the recrystallization of intracellular ice. *Biol. Reprod.* *79*, 727–737.
- Seki, S., e Mazur, P. (2009). The Dominance of Warming Rate Over Cooling Rate in the Survival of Mouse Oocytes Subjected to a Vitrification Procedure. *Cryobiology* *59*, 75–82.
- Sharma, R., Biedenharn, K.R., Fedor, J.M., e Agarwal, A. (2013). Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. *Reprod. Biol. Endocrinol.* *11*, 66–81.
- Sherwood, L. (2016). The Reproductive System. In *Human Physiology - From Cells to Systems*, (Cengage Learning), pp. 715–770.
- Shier, D., Butler, J., e Lewis, R. (2012a). Reproductive Systems. In *Hole's essentials of Human Anatomy Physiology*, (McGraw-Hill), pp. 505–535.
- Shier, D., Butler, J., e Lewis, R. (2012b). Pregnancy, Growth, Development, and Genetics. In *Hole's essentials of Human Anatomy Physiology*, (McGraw-Hill), pp. 536–563.
- Shin, D.H., e Turek, P.J. (2013). Sperm retrieval techniques. *Nat. Rev. Urol.* *10*, 723–730.
- Shoham, Z., e Howles, C.M. (2009). Drugs used for ovarian stimulation. In *Textbook of Assisted Reproductive Technologies*, D.K. Gardner, A. Weissman, C.M. Howles, e Z. Shoham, eds. (Informa Healthcare), pp. 469–488.
- Shukla, K.K., Chambial, S., Dwivedi, S., Misra, S., e Sharma, P. (2014). Recent scenario of obesity and male fertility. *Andrology* *2*, 809–818.
- Silva-Carvalho, J.L., e Santos, A. (2009). Estudo Afrodite - Caracterização da infertilidade em Portugal. 1–75.

- Silverberg, K.M., e Turner, T. (2012). Evaluation of sperm. In *Textbook of Assisted Reproductive Techniques*, D.K. Gardner, A. Weissman, C.M. Howles, e Z. Shoham, eds. (Informa Healthcare), pp. 48–60.
- Sobinoff, A.P., Sutherland, J.M., Beckett, E.L., Stanger, S.J., Johnson, R., Jarnicki, A.G., McCluskey, A., St John, J.C., Hansbro, P.M., e McLaughlin, E.A. (2014). Damaging legacy: maternal cigarette smoking has long-term consequences for male offspring fertility. *Hum. Reprod.* 29, 2719–2735.
- Somigliana, E., Paffoni, A., Busnelli, A., Filippi, F., Pagliardini, L., Vigano, P., e Vercellini, P. (2016). Age-related infertility and unexplained infertility: an intricate clinical dilemma. *Hum. Reprod.* 31, 1–7.
- Tate, P. (2012a). Reproductive System. In *Seeley's Principles of Anatomy & Physiology*, (McGraw-Hill), pp. 769–807.
- Tate, P. (2012b). Development and Genetics. In *Seeley's Principles of Anatomy & Physiology*, (McGraw-Hill), pp. 808–845.
- Thornhill, A.R., Ottolini, C., e Handyside, A.H. (2012). Human embryo biopsy procedures. In *Textbook of Assisted Reproductive Technologies*, D.K. Gardner, A. Weissman, C.M. Howles, e Z. Shoham, eds. (Informa Healthcare), pp. 197–211.
- Toner, J.P. (2009). The luteal phase: luteal support protocols. In *Textbook of Assisted Reproductive Technologies*, D.K. Gardner, A. Weissman, C.M. Howles, e Z. Shoham, eds. (Informa Healthcare), pp. 565–575.
- Unuane, D., Tournaye, H., Velkeniers, B., e Poppe, K. (2011). Endocrine disorders & female infertility. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 25, 861–873.
- Valckx, S.D.M., Arias-Alvarez, M., De Pauw, I., Fievez, V., Vlaeminck, B., Fransen, E., Bols, P.E.J., e Leroy, J.L.M.R. (2014). Fatty acid composition of the follicular fluid of normal weight, overweight and obese women undergoing assisted reproductive treatment: a descriptive cross-sectional study. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 12, 13.
- Veeck, L.L. (1999). *An Atlas of Human Gametes and Conceptuses* (Parthenon Publishing).
- Veiga, A., e Belil, I. (2012). Assisted hatching. In *Textbook of Assisted Reproductive Technologies*, D.K. Gardner, A. Weissman, C.M. Howles, e Z. Shoham, eds. (Informa Healthcare), pp. 186–196.

- La Vignera, S., Condorelli, R.A., Balercia, G., Vicari, E., e Calogero, A.E. (2013). Does alcohol have any effect on male reproductive function? A review of literature. *Asian J. Androl.* 15, 221–225.
- Vos, A. De, e Steirteghem, A. Van (2005). Assisted reproduction techniques for male-factor infertility: current status of intracytoplasmic sperm injection. In *Textbook of In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction*, P.R. Brinsden, ed. (Informa Healthcare), pp. 337–357.
- Walczak, R.J., Wolski, J.K., e Slowikowska-Hilczer, J. (2013). The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Cent. Eur. J. Urol.* 66, 60–67.
- Wdowiak, A., Sulima, M., Sadowska, M., Grzegorz, B., e Bojar, I. (2014). Alcohol consumption and quality of embryos obtained in programmes of in vitro fertilization. *Ann. Agric. Environ. Med.* 21, 450–453.
- Webber, L., Davies, M., Anderson, R., Bartlett, J., Braat, D., Cartwright, B., Cifkova, R., de Muinck Keizer-Schrama, S., Hogervorst, E., Janse, F., *et al.* (2016). ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency. *Hum. Reprod.* 31, 926–937.
- Widmaier, E.P., Raff, H., e Strang, K.T. (2014). Reproduction. In *Vander's Human Physiology*, (McGraw-Hill), pp. 602–651.
- Wong, C., Chen, A.A., Behr, B., e Shen, S. (2013). Time-lapse microscopy and image analysis in basic and clinical embryo development research. *Reprod. Biomed. Online* 26, 120–129.
- Wong, C.C., Loewke, K.E., Bossert, N.L., Behr, B., De Jonge, C.J., Baer, T.M., e Pera, R.A.R. (2010). Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat. Biotechnol.* 28, 1115–1121.
- Wong, K.M., Mastenbroek, S., e Repping, S. (2014). Cryopreservation of human embryos and its contribution to in vitro fertilization success rates. *Fertil. Steril.* 102, 19–26.
- World Health Organization (2010). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen.

- Wyns, C., Abou-Ghannam, G., e Poels, J. (2016). Vitrification of human testicular tissue, spermatogonia, and spermatozoa. In *Vitrification in Assisted Reproduction*, M.J. Tucker, e J. Liebermann, eds. (CCR Press), pp. 197–202.
- Yaron, Y., Gold, V., Peleg-Schalka, S., e Malcov, M. (2012). Genetic analysis of the embryo. In *Textbook of Assisted Reproductive Technologies*, D.K. Gardner, A. Weissman, C.M. Howles, e Z. Shoham, eds. (Informa Healthcare), pp. 354–365.
- Young, B., O'Dowd, G., e Woodford, P. (2014a). Male reproductive system. In *Wheater's Functional Histology - A Text and Colour Atlas*, (Churchill Livingstone), pp. 337–350.
- Young, B., O'Dowd, G., e Woodford, P. (2014b). Female reproductive system. In *Wheater's Functional Histology - A Text and Colour Atlas*, (Churchill Livingstone), pp. 351–383.
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G.D., 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. *Fertil. Steril.* 92, 1520–1524.