

Abordagem às técnicas de Procriação Medicamente Assistida e aos resultados clínicos/laboratoriais de sucessivas doações de ovócitos

Cíntia Daniela Pereira Ribeiro

Dissertação de Mestrado apresentada à

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto em

Biologia Celular e Molecular

2021

Abordagem às técnicas de Procriação Medicamente Assistida e aos resultados clínicos/laboratoriais de sucessivas doações de ovócitos

Cíntia Daniela Pereira Ribeiro

Mestrado de Biologia Celular e Molecular

Departamento de Biologia

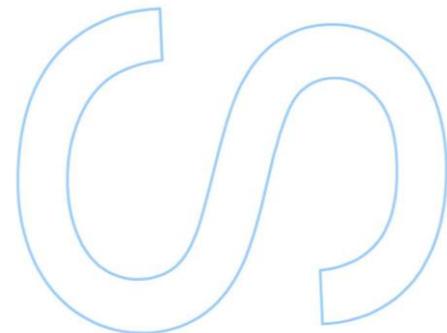
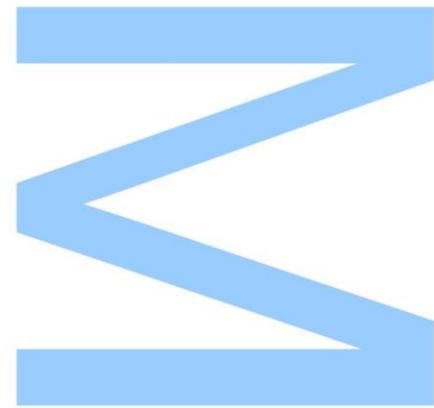
2021

Orientador

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

Supervisor Local

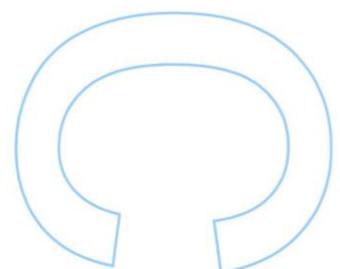
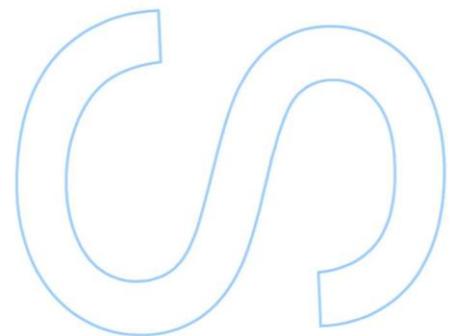
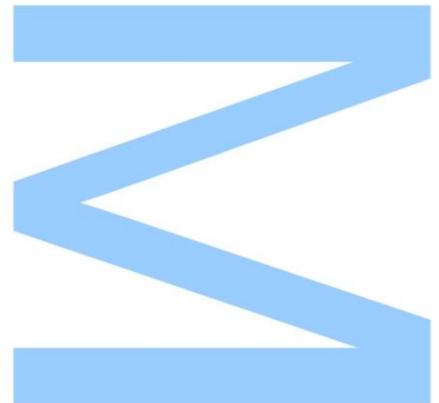
Alice Fernandes Pinto, Embriologista Sénior, Procriar - Centro de Obstetrícia e Medicina da Reprodução do Porto



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

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer à Dra. Alice, pela amizade e por todos os ensinamentos, toda a paciência, toda a paixão e dedicação que mostra pela área de PMA, que todos os dias me contagia mais um pouco. Um grande obrigada à Samyra pela sua boa disposição, pela sua ajuda e ensinamentos. Agradeço, também, à Dra. Joana Mesquita Guimarães por sempre me impulsionar a ser a melhor profissional, ao Dr. Vladimiro Silva, por estar sempre pronto a ajudar. A toda a equipa Procriar um grande obrigada, por desde o primeiro dia me integrarem como um elemento da equipa, por sempre me fazerem sentir bem, por me ajudarem em tudo o que precisava e por todos os ensinamentos e gargalhadas.

Um gigante obrigada aos meus pais, ao meu irmão e à Margarida por sempre me apoiarem e impulsionarem o meu sonho, por sempre ouvirem as novidades no final do dia, por ficarem felizes e orgulhosos pelas minhas conquistas.

Ao meu namorado por sempre me apoiar, ajudar em todos os momentos.

A todos os meus amigos, que entre conversas de preocupação até às conversas para descompressão me ajudaram a ter a motivação necessária para a conclusão desta etapa.

Agradeço, também, à Dra. Joana Vieira pela preciosa ajuda na estatística deste trabalho, e pela sua simpatia, disponibilidade e rápida ajuda.

A todas as pessoas que de alguma forma fizeram parte deste meu percurso académico, o meu muito obrigada.

Resumo

A concretização de uma gravidez implica o sucesso de uma série de eventos complexos, não só do aparelho reprodutor feminino, como também, do masculino. Qualquer desvio a esta rede de eventos, pode conduzir a um estado de infertilidade. Se após 12 meses de relações sexuais regulares e desprotegidas o casal não alcançar uma gravidez, um quadro de infertilidade é considerado. Todavia, com o aparecimento dos tratamentos e técnicas de PMA (Procriação Medicamente Assistida) muitas causas de infertilidade podem ser diagnosticadas e tratadas, e o sonho da parentalidade concretizado. Os tratamentos permitem a união facilitada dos gâmetas num processo iniciado com protocolos de estimulação ovocitária, processamento espermático, de técnicas de inseminação intrauterina, ou técnicas de fertilização *in vitro* e injeção intracitoplasmática de espermatozoide, culminado na inseminação propriamente dita ou na transferência embrionária. O aparecimento da biópsia embrionária e consequente análise genética, permitiu a identificação de embriões portadores de anomalias genéticas ou cromossómicas e a seleção de embriões geneticamente normais ou com grupo HLA compatível para a transferência embrionária. Técnicas cirúrgicas de recolha espermática permitiram que, homens azoospérmicos ou oligoastenoteratozoospérmicos pudessem ser pais. As tecnologias de PMA permitiram também, que mulheres sem parceiro sexual, ou casais de mulheres vissem o seu projeto de maternidade concretizado. Para além disso, com o avanço da ciência, a criopreservação de gâmetas femininos e masculinos e até mesmo de embriões tornou-se possível e segura, permitindo não só a preservação da fertilidade, criopreservação de embriões supranumerários, como também, a criação de bancos de dadores de gâmetas. Cada vez mais, é notório um aumento do número de beneficiários a recorrerem a um banco de gâmetas, pela incapacidade de produção ou má qualidade dos gâmetas próprios. Relativamente, aos gâmetas femininos, a mesma dadora pode realizar vários ciclos de doação. Consequentemente, torna-se importante perceber o impacto que, ciclos subsequentes de doação têm nos parâmetros clínicos e laboratoriais. O estudo permitiu concluir que ao longo de 3 ciclos de doação houve o aumento da dose de gonadotrofinas, com consequente aumento no número de ovócitos recuperados sem comprometer a qualidade dos gâmetas, nem o estado de saúde geral da dadora.

Palavras-Chave: Procriação Medicamente Assistida; Inseminação Intrauterina; Fertilização *in vitro*; Injeção intracitoplasmática; Transferência embrionária; Criopreservação; Sucessivos ciclos de doação.

Abstract

The achievement of a pregnancy implies the success of a sequence of complex events, not only in the female reproductive system, but also in the male reproductive system. Any deviation from these events can lead to an infertility condition. If, after 12 months of regular and unprotected sexual intercourse, the couple does not achieve a pregnancy, an infertility condition is recognized. However, with the advent of Assisted Reproductive Technology (ART) treatments and techniques, many causes of infertility can be diagnosed and treated, and the dream of parenthood fulfilled. The treatments allow the facilitated union of gametes in a process that comprises the oocyte stimulation protocols, sperm processing, intrauterine insemination techniques, or in vitro fertilization techniques and intracytoplasmic sperm injection, culminating with an insemination or embryo transfer. The advent of embryo biopsy and consequent genetic analysis allowed the identification of embryos carrying genetic or chromosomal abnormalities and the selection of embryos that were genetically normal or HLA group compatible for embryo transfer. Surgical techniques of sperm collection allowed men, with azoospermia or oligoasthenoteratozoospermia, to become fathers. ART technologies have also allowed single women, or couples of women, to embrace a maternity project. Furthermore, with the advance of science, the cryopreservation of female and male gametes, and even embryos, has become feasible and safe, allowing not only fertility preservation, but also cryopreservation of supernumerary embryos, and the creation of gamete donor banks. There is a notorious increase in the number of beneficiaries resorting to gamete banks due to the inability to produce or poor quality of their own gametes. Regarding female gametes, the same donor may carry out several donation cycles. Consequently, it is important to understand the impact that successive donation cycles, from the same donor, have on the clinical and laboratory parameters. This study allowed the conclusion that, throughout three donation cycles, there was an increase in the gonadotropin dose administered, with a consequent raise in the number of oocytes recovered, without compromising the quality of the gametes, nor the general state of the donor health.

Keywords: Medically Assisted Procreation; In vitro fertilization; Intracytoplasmic injection; Embryo transfer; Cryopreservation; Embryo biopsy; Oocyte donation; Repeated donation cycles.

Índice

Agradecimentos.....	V
Resumo	VII
Abstract	VIII
Lista de Figuras	XII
Lista de tabelas.....	XVI
Lista de abreviaturas.....	XIX
1. Aspetos Básicos da Biologia da Reprodução.....	1
1.1 Aparelho Reprodutor Feminino.....	1
1.1.1 Anatomia e Fisiologia do Sistema Reprodutor Feminino.....	1
1.1.2 Oogénese e desenvolvimento folicular	3
1.1.3 Controlo hormonal	5
1.1.3.1 Ciclo ovário.....	6
1.1.3.2 Ciclo uterino ou menstrual	8
1.2 Aparelho Reprodutor Masculino.....	10
1.2.1 Anatomia e Fisiologia do Sistema Reprodutor Masculino	10
1.2.2 Controlo hormonal	13
1.2.3 Espermatogénese	15
1.3 A fecundação e o desenvolvimento embrionário.....	18
1.3.1 Percurso dos espermatozoides	18
1.3.2 Capacitação espermática	19
1.3.3 Fecundação.....	19
1.3.4 Desenvolvimento embrionário	21
2. A Infertilidade e o seu Diagnóstico.....	24
2.1 A Infertilidade.....	24
2.2 Diagnóstico da Infertilidade.....	25
2.2.1 Avaliação do Fator Feminino	26
2.2.2 Avaliação do Fator Masculino.....	27
2.3 Causas de infertilidade	28
2.3.1 Fatores não-patológicos	28
2.3.2 Fatores patológicos	29
2.3.2.1 Fatores Femininos.....	29
2.3.2.2 Fatores Masculinos	32
2.3.3 Estilos de Vida como Fator de Infertilidade.....	35
2.3.4 Infertilidade idiopática	37
3. Laboratório de Andrologia.....	39
3.1 Métodos de recolha da amostra seminal	39

3.2	O Espermograma	41
3.2.1	Análise macroscópica.....	42
3.2.1.1	Liquefação.....	42
3.2.1.2	Aparência visual	43
3.2.1.3	Volume	43
3.2.1.4	Viscosidade	44
3.2.1.5	pH.....	44
3.2.2	Análise microscópica.....	44
3.2.2.1	Agregação e Aglutinação.....	44
3.2.2.2	Concentração	45
3.2.2.3	Motilidade	45
3.2.2.4	Vitalidade.....	46
3.2.2.5	Morfologia.....	47
3.2.2.6	Presença de células redondas.....	49
3.3	Processamento da amostra seminal para uso em técnicas de PMA.....	51
3.3.1	Processamento de amostras seminais via ejaculado.....	51
3.3.1.1	Procedimento da técnica de <i>swim-up</i>	52
3.3.1.2	Procedimento da técnica de gradientes de densidade descontínuos	53
4.	Casos clínicos e indicação para técnicas de PMA	54
4.1	Tratamentos de 1ª linha.....	54
4.1.1	Caso clínico 1 – Inseminação Intrauterina	54
4.1.1.2	Procedimento da Inseminação Intrauterina.....	56
4.2	Tratamentos de 2ª linha.....	57
4.2.1	Protocolos de hiperestimulação controlada dos ovários	57
4.2.2	Punção folicular	59
4.2.3	Caso clínico 2 – Fertilização <i>In Vitro</i>	60
4.2.3.1	Enquadramento teórico	60
4.2.3.2	Procedimento da realização de uma FIV	61
4.2.4	Caso 3 (A) – Injeção intracitoplasmática de espermatozoide.....	62
4.2.4.1	Enquadramento teórico	63
4.2.4.2	Desnudação ovocitária	64
4.2.4.3	Avaliação da maturação ovocitária	64
4.2.4.4	Avaliação da morfologia ovocitária	65
4.2.4.4.1	Alterações Morfológicas Intracitoplasmáticas	66
4.2.4.4.2	Alterações Morfológicas Extracitoplasmáticas.....	68
4.2.4.5	Procedimento técnico da ICSI	69
4.2.4.6	Avaliação do desenvolvimento embrionário.....	71

4.2.4.6.1	Avaliação da fecundação.....	72
4.2.4.6.2	Avaliação do embrião em estado de clivagem.....	73
4.2.4.6.3	Avaliação do embrião em estado de mórula	77
4.2.4.6.4	Avaliação do embrião em estado de blastocisto	78
4.2.5	Caso 3 (B) – Transferência embrionária a fresco.....	81
4.2.5.1	Enquadramento teórico	81
4.2.5.2	Procedimento da transferência embrionária a fresco	84
4.2.6	Caso 3 (C) – Criopreservação de embriões e sua transferência.....	85
4.2.6.1	Enquadramento teórico	85
4.2.6.2	Procedimento da vitrificação embrionária	87
4.2.6.3	Procedimento de desvitrificação e transferência embrionária	88
4.2.7	Caso 4 – Vitrificação e desvitrificação de ovócitos.....	89
4.2.7.1	Enquadramento teórico	89
4.2.7.2	Procedimento da técnica de vitrificação ovocitária.....	90
4.2.7.3	Procedimento para desvitrificação de ovócitos	91
4.2.8	Caso 5 – Criopreservação espermática	91
4.2.8.1	Enquadramento teórico	92
4.2.8.2	Procedimento de criopreservação de esperma.....	93
4.2.9	Caso 6 – Biopsia Embrionária	95
4.2.9.1	Enquadramento teórico	95
4.2.9.2	Procedimento de biópsia embrionária em fase de blastocisto.....	98
4.2.10	Caso 7 – Biópsia Testicular	100
4.2.10.1	Enquadramento teórico	100
4.2.10.2	Procedimento da biópsia testicular	101
5.	Impacto de sucessivos ciclos de doação de ovócitos em parâmetros clínicos e laboratoriais	104
5.1	Introdução	104
5.1.1	A utilização de gâmetas femininos doados	104
5.1.2	Doação de gâmetas em Portugal.....	105
5.1.3	Processo de seleção e avaliação das candidatas a dadoras	106
5.1.4	Processo de doação de gâmetas femininos	108
5.1.5	Limitações da doação de gâmetas femininos	108
5.2	Material e Métodos	110
5.2.1	Avaliação das dadoras	110
5.2.2	Hiperestimulação controlada dos ovários	110
5.2.3	Punção folicular e procedimento laboratorial	111
5.2.4	Análise de dados e análise estatística	111
5.3	Resultados e discussão	111

5.4	Conclusão	115
6.	Considerações finais	117
7.	Referências Bibliográficas	119

Lista de Figuras

Figura 1. Constituição anatómica do aparelho reprodutor feminino em vista posterior. Os órgãos constituintes do sistema reprodutor feminino são a vagina, o útero, dividido em fundo, corpo e cérvix, as trompas de Falópio, constituídas pelo infundíbulo, ampola e istmo e 2 ovários. São também representados cortes transversais destes órgãos para demonstração da anatomia interna. Adaptado de Fox (2011).....	2
Figura 2. Representação de um corte longitudinal do ovário e representação do desenvolvimento folicular. O desenvolvimento folicular é iniciado com um <i>coorte</i> de folículos primordiais, que se desenvolvem em folículo primário, que por sua vez se desenvolvem em folículo secundário. Nestas fases o ovócito encontra-se em prófase I (ovócito primário). Depois da formação de um folículo dominante – folículo de <i>Graaf</i> , ocorre a ovulação de um ovócito secundário, rodeado pela zona pelúcida, e pelas células da <i>corona radiata</i> . Após ovulação, ocorre a luteinização, com a formação do corpo lúteo, mas que rapidamente se degenera, formando o corpo <i>albicans</i> . As setas indicam a sequência temporal de acontecimentos. Adaptado de Fox (2011).....	5
Figura 3. Representação do ciclo ovárico e uterino. Estão representadas as alterações nas secreções das gonadotrofinas (FSH e LH) e hormonas ováricas (estrogénios e progesterona), assim como, o desenvolvimento folicular e formação do corpo amarelo e alterações no endométrio. Adaptado de Fox (2011).	10
Figura 4. Constituição anatómica do aparelho reprodutor masculino em corte sagital. Os órgãos sexuais masculinos incluem um par de testículos com o epidídimo acoplado, envolvidos pela bolsa escrotal, um par de ductos deferentes que convergem no ducto ejaculatório, a uretra (órgão misto), um par de vesículas seminais, a próstata e as glândulas bulbouretrais e o órgão copulador, o pénis. Adaptado de Fox (2011).	11
Figura 5. Representação esquemática de um corte longitudinal do testículo, (A), onde é possível observar com maior pormenor o interior dos túbulos seminíferos (B e C). Na Secção B, está representado um corte transversal de um túbulo seminífero, onde se observa as células da linhagem germinativa e formação dos espermatozoides e nos espaços intersticiais as células de <i>Leyding</i> . Na Secção C, observa-se com maior pormenor uma secção do túbulo seminífero, com o desenvolvimento de uma espermatogónia até ao estado de espermatozoide (espermatogénese). Imagem (A)	

adaptada de Sherwood (2016). Imagem B e C adaptadas de Guyton and Hall (2011c).
 12

Figura 6. Esquema representativo do controlo hormonal da função testicular através do eixo hipotálamo-hipófise. O hipotálamo segrega GnRH, que estimula a produção de FSH e LH pela hipófise anterior. A FSH atua nas células de *Sertoli* que estimula a espermatogénese e a LH atua nas células de *Leyding* que produzem testosterona que exercerá vários efeitos androgénicos. A testosterona e a presença da Inibina produzida pelas células de *Sertoli*, provocam, por *feedback* negativo, a inibição da hipófise anterior. O sinal (+) é indicativo de ação estimulante, enquanto o sinal (-) é indicativo de ação inibitória. SNC - Sistema Nervoso Central; GnRH - Hormona Libertadora de Gonadotrofinas; FSH - Hormona Folículo-Estimulante; LH - Hormona Lúteo-Estimulante. Adaptado de Guyton and Hall (2011c). 15

Figura 7. Esquema representativa das partes constituintes de um espermatozoide humano. O espermatozoide é formado pela cabeça, composta pelo núcleo e acrossoma, pela peça intermédia, que contém as mitocôndrias e por fim, a cauda que possui na sua constituição uma série de microtúbulo. Adaptado de Sherwood (2016). 17

Figura 8. Representação esquemática do processo de interação do espermatozoide com o ovócito que culmina na sua fecundação. Adaptado de Taylor *et al.* (2019). 20

Figura 9. Desenvolvimento embrionário ao longo do sistema reprodutor feminino. No ovário é possível observar o desenvolvimento folicular e o momento da ovulação, onde o ovócito é expulso para as trompas de Falópio, local onde ocorre o encontro do ovócito com os espermatozoides, e onde ocorre a fecundação. Adaptado de Fox (2011). 22

Figura 10. Representação das alterações observáveis nos espermatozoides quando são incubados numa solução hipoosmótica. Legenda: a – nenhuma alteração/morto, b-g – Vários tipos de alterações observáveis na cauda dos espermatozoides. A região com coloração cinzenta é indicativa de inchaço. Adaptado de World Health Organization (2010). 47

Figura 11. Espermatozoide com uma morfologia considerada normal. Aptado de (World Health Organization, 2010) 49

Figura 12. Imagens representativas das anomalias espermáticas que podem ser avaliadas durante a análise da morfologia espermática. Estão incluídas anomalias da cabeça, peça intermédia, presença de restos citoplasmáticos e da cauda. Adaptado de (World Health Organization, 2010; Paoli *et al.*, 2020)..... 50

Figura 13. Células redondas possíveis de serem observadas numa lâmina de morfologia espermática. As células redondas podem ser células da linhagem germinativa (linha superior), onde inclui espermatócitos, espermatócitos em divisão, espermátides e

espermátides em divisão. As células redondas também podem ser leucócitos, onde na figura estão ilustrados macrófagos (linha inferior). Adaptado de World Health Organization (2010)	50
Figura 14. Folículos em diferentes estados de maturação. A – Folículo aparentemente maduro, com as células do cúmulo expandidas; B – Folículo, aparentemente, imaturo, com células do <i>cumulus</i> escuras e densas. Imagens propriedade da clínica Procriar – Centro de Obstetrícia e Medicina da Reprodução do Porto.	59
Figura 15. Representação das possíveis fases de maturação observáveis após a desnudação ovocitária. A – Ovócito com vesícula germinal, em prófase I, imaturo; B – Ovócito em metáfase I, imaturo; C – Ovócito em metáfase II, maduro. Ampliação 200x. Imagens propriedade da clínica Procriar – Centro de Obstetrícia e Medicina da Reprodução do Porto, Lda.	65
Figura 16. Ovócito morfológicamente normal. Adaptado de Rienzi <i>et al.</i> (2012)	66
Figura 17. Exemplos de alterações morfológicas intracitoplasmáticas de ovócitos. A – Ovócito com centro granuloso; B – Ovócito com vacúolo; C – Ovócito com agregado de retículo endoplasmático liso; D – Ovócito com corpo necrótico. Adaptado de Rienzi <i>et al.</i> (2012).	67
Figura 18. Exemplos de alterações morfológicas intracitoplasmáticas de ovócitos. A – Ovócito com zona pelúcida espessa; B – Ovócito com forma oval; C – Ovócito com espaço perivitelino aumentado; D – Ovócito com glóbulo polar aumentado. Adaptado de Rienzi <i>et al.</i> (2012).	68
Figura 19. Placa para a realização da técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoide. Legenda: a – gotas alongadas de PVP; b – gotas de meio tamponado. Imagens propriedade da clínica Procriar – Centro de Obstetrícia e Medicina da Reprodução do Porto.	69
Figura 20. Passos implicados na realização da técnica de ICSI (Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide). A – Seleção do espermatozoide com melhor morfologia com o auxílio da micropipeta de injeção; B- Imobilização do espermatozoide; C – Posicionamento do glóbulo polar no ovócito às 7h; D – Microinjeção do espermatozoide no oolema do ovócito com a micropipeta de injeção posicionada às 3 h. E – Remoção da micropipeta, e formação de um pequeno funil no ovócito. Imagens propriedade da clínica Procriar – Centro de Obstetrícia e Medicina da Reprodução do Porto.	71
Figura 21. Avaliação da fecundação, pela contagem de pronúcleos presentes no zigoto. A – Zigoto com 2 pronúcleos simétricos, com uma posição central e 2 glóbulos polares (16 hora após inseminação). B – Zigoto com 1 pronúcleo e 2 glóbulos polares (22 hora	

após inseminação); C – Zigoto com 3 pronúcleos (16.2 horas após inseminação). Todos os ovócitos foram inseminados pela técnica de ICSI. Imagens propriedade da clínica Procriar – Centro de Obstetrícia e Medicina da Reprodução do Porto. 73

Figura 22. Embrião em fase de clivagem. A – Embrião com 2 células de tamanho semelhante; B – Embrião com 4 células com tamanho semelhante; C – Embrião com 8 células de tamanho semelhante. Imagens propriedade da clínica Procriar – Centro de Obstetrícia e Medicina da Reprodução do Porto. 74

Figura 23. Modelo explicativo do significado de embrião em “estado específico”, e em “estado não-específico”. Os blastómeros (círculos) assinalados a verde-escuro são os embriões em “estado específico”, isto é, as células encontram-se com dimensões adequadas para o número de células presentes. Os blastómeros assinalados a verde-claro, formam um embrião em “estado não-específico”, isto é, as células não apresentam o tamanho adequado, dado ao número de blastómeros. Adaptado de Prados *et al.* (2012). 75

Figura 24. Fases do estado de mórula a D4. A – Embrião em estado de mórula, com adesão; B – Embrião em estado de mórula, totalmente compactado; C – Embrião em estado de mórula a iniciar o processo de cavitação. Imagens propriedade da clínica Procriar – Centro de Obstetrícia e Medicina da Reprodução do Porto. 77

Figura 25. Embrião em fase de blastocisto, D5. A – Blastocisto 4 AA; B – Blastocisto 5 AB; C – Blastocisto a eclodir, libertando-se da zona pelúcida. Imagens propriedade da clínica Procriar – Centro de Obstetrícia e Medicina da Reprodução do Porto. 81

Figura 26. Imagens de um embrião vitrificado para transferência embrionária. A – Embrião de qualidade 4AA, após desvitrificação; B – Embrião após eclosão assistida com a emissão e raios laser, logo após a desvitrificação. É possível observar que o embrião colapsou; C – Embrião momentos antes da transferência embrionária (2/3 horas após desvitrificação), é possível observar o início do processo de eclosão. Ampliação da imagem A, B e C de 200x. As imagens são propriedade da clínica Procriar – Centro de Obstetrícia e Medicina da Reprodução do Porto. 87

Figura 27. Esquema da metodologia de *Kitazato* para vitrificação embrionária. Adaptado de Kitazato (2019). 88

Figura 28. Esquema da metodologia de *Kitazato* para desvitrificação embrionária. TS – Solução de desvitrificação; DS – Solução de diluição; WS – Solução de lavagem. Adaptado de Kitazato (2019). 88

Figura 29. Esquema da metodologia de vitrificação ovocitária, segundo a *Kitazato*. Adaptado de Kitazato (2019). 91

Figura 30. Biópsia embrionária em estado de blastocisto (D5). A – Blastocisto posicionado com a região de células expandidas às 3 horas, e massa celular interna afastada da região de biópsia. As células proeminentes da trofoectoderme são suavemente removidas do blastocisto, com o auxílio da pipeta de biópsia e emissão de pulsos de *laser* (pontos vermelhos). É possível observar as junções intracelulares a serem esticadas pela pipeta de biópsia, onde é aplicado o *laser*, para rompimento das mesmas. Ampliação a 200x. B – Embrião biopsiado e fragmento de células da trofoectoderme extraído do embrião. Ampliação da imagem a 100x. Imagens propriedade da clínica Procriar – Centro de Obstetrícia e Medicina da Reprodução do Porto..... 99

Figura 31. Observação ao microscópio ótico invertido do conteúdo resultante da maceração de fragmentos de túbulos seminíferos recolhidos em biópsia testicular. Na figura A é possível observar hemácias (assinaladas com seta branca) e espermatozoides (assinalados com seta preta). Na figura B está representada uma célula de *Sertoli* (seta branca). Ampliação de 200x. Imagens propriedade da clínica Procriar – Centro de Obstetrícia e Medicina da Reprodução do Porto. 102

Figura 32. Placa de ICSI com espermatozoides de biópsia testicular. a – gotas de meio tamponado; b – bandas alongadas amostra espermática processada; c – gota alongada de PVP. A esta placa é adicionado óleo mineral até cobrir toda a placa, garantindo que todas as gotas estão totalmente submersas. Imagens propriedade da clínica Procriar – Centro de Obstetrícia e Medicina da Reprodução do Porto. 103

Figura 33. Número de ciclos com doação de ovócitos na Europa, desde 1997 até 2016, segundo os registos anuais do grupo EIM, desde 1997 a 2016. 105

Lista de tabelas

Tabela 1. Valores mínimos de referência dos parâmetros analisados durante a análise espermática. Legenda: MP – Motilidade progressiva, MNP – Motilidade não progressiva. Aptado de World Health Organization (2010)..... 41

Tabela 2. Terminologia relativa à análise e qualidade espermática. No caso do indivíduo apresentar alterações em mais que um dos parâmetros, entre a oligozoospermia, astenozoospermia e astenozoospermia, deve ser usada uma nomenclatura combinada. No caso da combinação dos 3, o paciente é diagnosticado com oligoastenoteratozoospermia. 42

Tabela 3. Informação clínica e laboratorial do casal do caso clínico 1, indicado para inseminação intrauterina. Legenda: V – Volume; C – concentração; MP – móveis progressivos; MNP – móveis não progressivos; I – imóveis; FN – formas normais.	54
Tabela 4. Informação clínica e laboratorial do casal do caso clínico 2, indicado para fertilização <i>in vitro</i> . Legenda: V – Volume; C – Concentração; MP – Móveis Progressivos; MNP – Móveis Não Progressivos; I – Imóveis; FN – Formas Normais; HSG – Histerossalpingografia; IIU – Inseminação intrauterina; UI – unidade internacionais; PN – Pronúcleo; BL – Blastocisto; OHSS – Síndrome de hiperestimulação ovárica.	60
Tabela 5. Informação clínica e laboratorial do casal do caso clínico 3 (A), indicado para a realização da técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoide. Legenda: V – Volume; C – Concentração; MP – Móveis Progressivos; MNP – Móveis Não Progressivos; I – Imóveis; FN – Formas Normais; ng – nanogramas; UI – unidades internacionais; PN – Pronúcleos; D – Dia; BL – Blastocisto.	62
Tabela 6. Tempos de observação esperados das várias fases de desenvolvimento, desde a fecundação até ao dia 5 de desenvolvimento embrionário. Legenda: hpi – horas pós-inseminação, ICSI – Injeção intracitoplasmática de espermatozoide, IVF – Fertilização <i>in vitro</i> . Tabela adaptada de Alpha SiRM and ESHRE SIGE (2011).	72
Tabela 7. Classificação embrionária de embriões em estado de clivagem, segundo o ASEBIR. Legenda: N° - Número; “→” – do dia 2 para o dia 3; SS – Estado específico; NSS – Estado não específico; bn – binucleação. Adaptado de Saiz <i>et al.</i> (2018).	76
Tabela 8. Classificação de embriões em estado de mórula, segundo o ASEBIR. Adaptado de Saiz <i>et al.</i> (2018).	78
Tabela 9. Classificação de embriões em estado de blastocisto ao Dia 5, segundo o ASEBIR. Legenda: MCI – Massa celular interna; TE – Trofoectoderme. Adaptado de Saiz <i>et al.</i> (2018).	79
Tabela 10. Classificação de embriões em estado de blastocisto ao Dia 6, segundo o ASEBIR. Legenda: MCI – Massa celular interna; TE – Trofoectoderme. Adaptado de Saiz <i>et al.</i> (2018).	80
Tabela 11. Classificação do grau de expansão do blastocisto. Legenda: ZP – Zona pelúcida. Adaptado de Alpha SiRM and ESHRE SIGE (2011).	80
Tabela 12. Informação clínica e laboratorial do casal do caso clínico 4, indicado para vitrificação ovocitária.	89
Tabela 13. Informação clínica e laboratorial do casal do caso clínico 5, indicado para criopreservação espermática. Legenda: V – Volume; C – concentração; MP – móveis progressivos; MNP – móveis não progressivos; I – imóveis; FN – formas normais.	91

Tabela 14. Informação clínica e laboratorial do casal do caso clínico 6, indicado para biópsia embrionária. Legenda: V – Volume; C – concentração; MP – móveis progressivos; MNP – móveis não progressivos; I – imóveis; FN – formas normais. ng – nanogramas; UI – unidades internacionais; PN – Pronúcleos; D – Dia; BL – Blastocisto. 95

Tabela 15. Informação clínica e laboratorial do casal do caso clínico 7, indicado para biópsia testicular. Legenda: V – Volume; C – concentração; MP – móveis progressivos; MNP – móveis não progressivos; I – imóveis; FN – formas normais; ng – nanogramas; UI – unidades internacionais; PN – Pronúcleos; D – Dia; BL – Blastocisto. 100

Tabela 16. Análise descritiva dos dados para dadoras submetidas a 2 ciclos de estimulação ovárica (n=51), assim como a significância das diferenças para cada uma das variáveis entre os grupos (ciclo 1 vs ciclo 2). Dados apresentados como média ± desvio padrão para variáveis contínuas ou percentagem (frequência) para variáveis categóricas. NS, não significativo; NA, não aplicável; Teste de *Wilcoxon* para amostras emparelhadas. 112

Tabela 17. Análise descritiva dos dados para dadoras submetidas a 3 ciclos de estimulação ovárica (n=19), assim como a significância das diferenças para cada uma das variáveis entre os grupos (ciclo 1 vs ciclo 2 vs ciclo 3). Dados apresentados como média ± desvio padrão para variáveis contínuas ou percentagem (frequência) para variáveis categóricas. NA, não aplicável; NS, não significativo. Teste de *Friedman* para análise de variância. 113

Tabela 18. Correlações (*Spearman*) entre os diferentes parâmetros. Dados apresentados como Rho (p-value). 114

Tabela 19. Correlações (*Spearman*) entre o IMC e Dias de estimulação e Dose total. Dados apresentados como Rho (p-value). 114

Tabela 20. Logbook durante o período de estágio na clínica Procriar- Centro de Obstetrícia e Medicina da Reprodução do Porto (28 de setembro de 2020 a 29 de setembro de 2021). 118

Lista de abreviaturas

°C	graus Celsius
µm	micrómetros
AMH	Hormona Anti-Mülleriana
ASEBIR	<i>Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción</i>
AZF	<i>Azoospermic Factor</i>
BS	Solução Básica, <i>Basic Solution</i>
CBAVD	Ausência Bilateral Congénita dos Vasos Deferente
cm	Centímetros
CNPMA	Concelho Nacional de Procriação Medicamente Assistida
CO ₂	Dióxido de Carbono
COC	Complexo cumulus-oócito, <i>Cumulus-oocyte complex</i>
COS	Estimulação Ovárica Controlada, <i>Controlled Ovarian Stimulation</i>
CPN	Corpos Precursores de Nucléolos
DGPI	Diagnóstico Genético Pré-Implantatório
DIP	Doença inflamatória pélvica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DS	Solução de diluição, <i>Diluent Solution</i>
EIM	<i>European IVF-monitoring</i>
ES	Solução de equilíbrio, <i>Equilibration Solution</i>
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FOP	Falência Ovárica Prematura
FSH	Hormona folículo-estimulante, <i>Follicle-stimulating hormone</i>
GnRH	Hormona libertadora de gonadotrofinas
GP	Glóbulo Polar
h	horas
HAS	Soro de Albumina Humana
hCG	Gonadotrofina Coriónica Humana
HH	Hipogonadismo Hipogonadotrófico
HOC	Hiperestimulação Ovárica Controlada
HOS	Hipoosmolaridade
hpi	horas após inseminação, <i>hours post-insimination</i>
HSG	Histerossalpingografia
HTLV	Vírus linfotrópico da célula humana
ICSI	Microinjeção Intracitoplasmática de Espermatozoide
IUI	Inseminação Intrauterina
IMC	Índice de Massa Corporal
IVM	Maturação <i>in-vitro</i> , <i>In Vitro Maturation</i>
kg	Quilograma
LH	Hormona Luteinizante
MCI	Massa Celular Interna
MESA	Aspiração de Espermatozoides dos Epidídimos por Microcirurgia, <i>Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration</i>
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
min	minutos

mL	mililitro
mRNA	RNA mensageiro, <i>messenger RNA</i>
n	Número
ng	Nanogramas
O ₂	Oxigénio
OHSS	Síndrome de hiperestimulação ovárica
OMS	Organização Mundial de Saúde
PESA	Aspiração Percutânea de Espermatozoides dos Epidídimos, <i>Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration</i>
PGT	Teste Genético Pré-implantação
PMA	Procriação Medicamente Assistida
PN	Pronúcleo
PVP	Polivinilpirrolidona
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio
rpm	rotações por minuto
SNS	Sistema Nacional de Saúde
SOP	Síndrome do Ovário Poliquístico
SRY	<i>Sex-determining Region Y</i>
s	segundos
TESA	Aspiração de Espermatozoides Testicular, <i>Testicular Sperm Aspiration</i>
TESE	Extração de Espermatozoides Testicular, <i>Testicular Sperm Extraction</i>
TSH	Hormona Estimulante da Tireoide, <i>Thyroid Stimulating Hormone</i>
UI	Unidades Internacionais
VG	Vesícula Germinativa
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana
VS	Solução de vitrificação, <i>Vitrification Solution</i>
WHO	World Health Organization
WS	Solução de lavagem, <i>Washing Solution</i>
ZP	Zona Pelúcida

1. Aspectos Básicos da Biologia da Reprodução

Para compreensão das causas de infertilidade, assim como, das técnicas de Procriação Medicamente Assistida (PMA), é essencial conhecer e compreender os aspetos inerentes à biologia da reprodução. Deste modo, é fundamental o estudo da anatomia e fisiologia dos sistemas reprodutores feminino e masculino (Jones & Lopez, 2006a). Estes sistemas reprodutores são amplamente distintos, ao contrário de todos os outros sistemas de órgãos do corpo humano. Estes estão desenhados para permitir a união dos dois gâmetas, e culminar na formação de um novo indivíduo, com um conjunto único de informação genética (Sherwood, 2016). Paralelamente, é também necessária a compreensão do sistema endócrino envolvido na reprodução, já que, para um correto funcionamento e regulação do sistema reprodutor, é necessária a atuação das mais variadas hormonas (Jones & Lopez, 2006a).

1.1 Aparelho Reprodutor Feminino

1.1.1 Anatomia e Fisiologia do Sistema Reprodutor Feminino

O sistema reprodutor feminino (Figura 1) é constituído por 2 ovários (as gónadas), pelas estruturas acessórias, trompas de Falópio, útero, e vagina, e pela genitália externa, a vulva que inclui o clitóris, os lábios maiores e lábios menores.

Os ovários têm um papel fundamental na função reprodutiva, já que, são os órgãos responsáveis pela génese dos gâmetas femininos, os ovócitos, e pela síntese e libertação de hormonas esteroides, dentro das quais, se destacam os estrogénios e a progesterona.

As trompas de Falópio são 2 tubos que se alongam desde a região proximal de cada ovário, até ao topo do útero. As trompas funcionam como um canal de comunicação entre os espermatozoides e o ovócito e a fecundação ocorre na ampola da trompa uterina. As trompas de Falópio são constituídas por várias camadas, das quais se destaca a camada muscular, que quando estimulada a contrair, auxilia o transporte do ovócito e, mais tarde, o ovócito fertilizado e em desenvolvimento, em direção ao útero. As trompas de Falópio estão revestidas, internamente, por uma camada de células ciliadas e não ciliadas, bem como por um conjunto de glândulas mucosas. Os movimentos ciliares aliados às secreções produzidas, desempenham um papel

fundamental no transporte do ovócito/embrião até ao útero, e o movimento dos espermatozoides em direção ao ovócito (Jones & Lopez, 2006b).

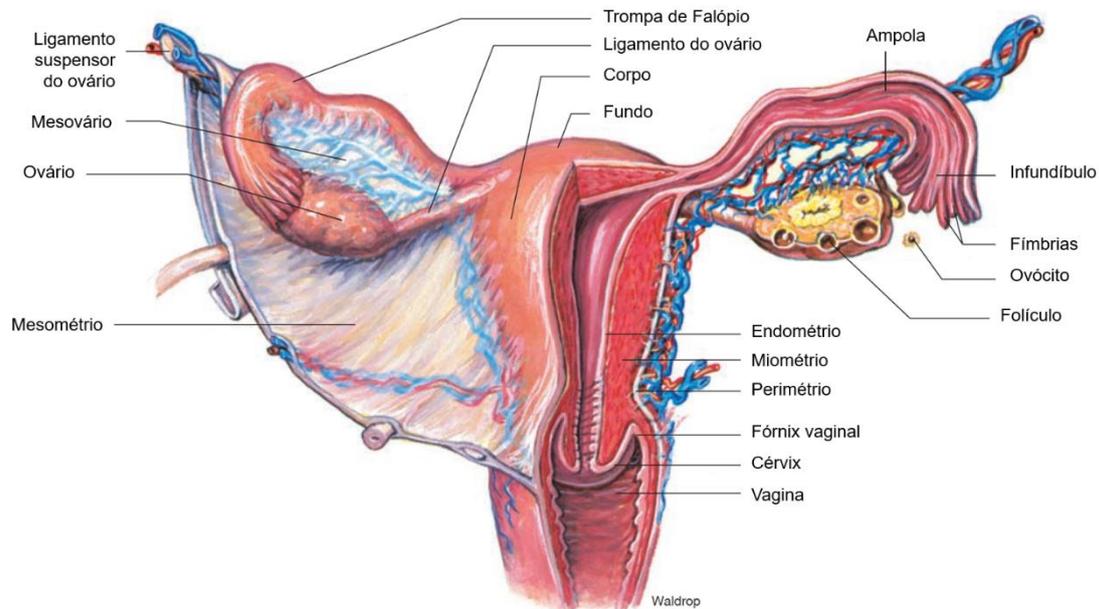


Figura 1. Constituição anatómica do aparelho reprodutor feminino em vista posterior. Os órgãos constituintes do sistema reprodutor feminino são a vagina, o útero, dividido em fundo, corpo e cérvix, as trompas de Falópio, constituídas pelo infundíbulo, ampola e istmo e 2 ovários. São também representados cortes transversais destes órgãos para demonstração da anatomia interna. Adaptado de Fox (2011).

O útero é o local onde ocorre a implantação do embrião e o seu desenvolvimento. A parte superior do útero é chamada de fundo. A região central é denominada de corpo. Por fim, a região mais estreita é o colo do útero, onde se encontra o canal cervical, revestido por glândulas mucosas (Seeley *et al.*, 2016). A parede uterina é constituída por 3 túnicas distintas. A camada mais externa é a camada serosa ou perimétrio, constituída por tecido conjuntivo. A camada média, é o miométrio, formada por músculo liso. Por fim, a camada mais interna, é o endométrio, caracterizado pela presença de epitélio estratificado, composto pelo estrato basal e pelo estrato funcional. A camada basal está localizada adjacente ao miométrio e não sofre alterações histológicas significativas durante o ciclo menstrual. Esta camada contém glândulas, vasculatura de suporte e tem a capacidade de regenerar a camada funcional do endométrio. O estrato funcional é uma camada transitória constituída por estroma e glândulas, que sofre grandes alterações ao longo do ciclo menstrual (descamação, regeneração e espessamento) devido às alterações hormonais cíclicas (Fox, 2011; Strauss & Williams, 2014; Seeley *et al.*, 2016).

A vagina é um tubo fibromuscular, com cerca de 10 cm de comprimento, que funciona como ligação entre o útero e o exterior. É o órgão feminino de cópula, já que funciona como recetáculo para o pênis durante o ato sexual. Também, funciona como uma passagem do fluxo menstrual e canal de parto (Jones & Lopez, 2006b; Seeley *et al.*, 2016).

1.1.2 Oogénese e desenvolvimento folicular

A oogénese é o processo biológico caracterizado pelo desenvolvimento dos ovócitos e tem lugar nos ovários (Figura 2). Durante o desenvolvimento embrionário, as células germinativas que migram para os ovários multiplicam-se por sucessivas mitoses, formando as **oogónias** (Seeley *et al.*, 2016). Aos 5 meses de gestação, os ovários contêm cerca de 6 a 7 milhões de oogónias. Contudo, a grande maioria destas oogónias sofre um processo de apoptose. As restantes iniciam o processo de divisão meiótica. Contudo, a divisão cessa em prófase I (na fase de diploteno), passando a ser denominados de **ovócitos primários**. Os ovócitos primários são ainda entidades diploides (2n), que permanecem neste estado até ao início da puberdade (Fox, 2011). Assim, quando a criança do sexo feminino nasce, contém um *pool* de cerca de 2 milhões de ovócitos retidos em prófase I, envolvidos por uma única camada de células foliculares achatadas – o **folículo primordial**. Este *pool* ovocitário constitui o reservatório de ovócitos, que se vai esgotando, à medida que vão sendo recrutados folículos para desenvolvimento. O desenvolvimento folicular inicial é independente da estimulação hormonal, logo alguns folículos, ao longo da infância, vão sofrendo desenvolvimento, mas devido à falta de uma correta estimulação hormonal os folículos acabam por sofrer um processo designado de atresia (Sherwood, 2016). Aquando do momento da puberdade, o número de ovócitos está reduzido a cerca de 400 mil, e apenas 400 folículos, deste *pool* ovocitário, em média, irão ovular no decurso da vida reprodutiva da mulher. Os restantes sofrem atresia e apoptose. O ciclo reprodutivo da mulher cessa por completo, quando a reserva ovocitária é praticamente nula, marcando o início da menopausa e a incapacidade reprodutiva feminina (Fox, 2011; Sherwood, 2016).

Após a puberdade, com o aumento da produção das hormonas FSH (Hormona Folículo-Estimulante) e LH (Hormona Luteinizante), vai ocorrendo o recrutamento de vários folículos, e as células foliculares vão aumentando o seu tamanho, diferenciando-se em células cúbicas (células da granulosa) – **folículo primário**. As células da granulosa vão-se multiplicando e, juntamente com o ovócito, começam a segregar glicoproteínas que auxiliam na formação de uma camada protetora, que envolve o ovócito, a zona pelúcida

(ZP) (Fox, 2011; Sherwood, 2016). As células da granulosa continuam a proliferar e diferenciam-se formando uma camada externa – as células da teca – que são produtoras de estrogénios, juntamente com as células da granulosa. Porém, nesta fase ainda não são segregadas hormonas. O conjunto das células da granulosa e da teca, que rodeiam o ovócito primário formam o **folículo secundário**, ou **pré-antral**. O desenvolvimento até esta fase folicular requer vários meses de desenvolvimento e ocorre sem a ação das gonadotrofinas. A fase seguinte do desenvolvimento folicular é dependente da produção hormonal e envolve a libertação de um fluído pelas células da granulosa, que se vai acumulando entre as células, formando o antro, uma cavidade cheia de líquido. O folículo designa-se, agora, de **folículo antral** e é iniciada a produção de estrogénios. Esta fase é caracterizada por um crescimento folicular rápido, resultante da contínua proliferação das células da granulosa, mas essencialmente pela expansão crescente do antro. O crescimento do folículo antral é acompanhado pela produção crescente de estrogénios. Dos folículos recrutados, apenas um folículo - o folículo dominante - cresce mais rapidamente que os outros, denominando-se **folículo de Graaf**, um folículo maduro, por possuir um maior número de recetores para a FSH. O ovócito rodeado pela ZP e por uma única camada de células da granulosa, é deslocada para a lateral do folículo, que se projeta para o interior do antro, formando a *corona radiata* (camada de células mais interna), e o *cumulus oophorus* (camada mais externa de células) (Fox, 2011; Sherwood, 2016). Os restantes folículos recrutados irão sofrer o processo de atresia, que resulta da interação complexa de várias hormonas (Fox, 2011). Ao 14º dia do ciclo, o folículo dominante cresce exponencialmente, devido à produção hormonal, criando uma fina camada celular à superfície, que acaba por lisar e libertar o ovócito para o lúmen das trompas de Falópio. Este processo é denominado de ovulação (Fox, 2011). Este acontecimento é acompanhado e facilitado pela libertação de enzimas das células foliculares que digerem a parede celular. Momentos antes da libertação do ovócito, este completa a primeira divisão meiótica. Esta divisão produz 2 células filhas, com 23 cromossomas duplicados em cada uma. Contudo, a divisão citoplasmática é assimétrica, já que uma das células-filha, a que vai formar o ovócito haploide, recebe a maior parte do citoplasma, rico em nutrientes, necessários para assegurar as fases iniciais de um futuro embrião. Enquanto a outra célula irá formar o 1º glóbulo polar, que acabará por degenerar. O ovócito inicia, assim, a segunda divisão meiótica, na qual fica retido em metáfase II – **ovócito secundário** (Seeley *et al.*, 2016; Sherwood, 2016). Desta forma, a célula libertada no momento da ovulação é um ovócito secundário rodeado pela zona pelúcia e pelas células da *corona radiata* e *cumulus oophorus*. O ovócito secundário só terminará a segunda divisão meiótica, caso seja fecundado por

um espermatozoide, culminando na formação de um zigoto (Seeley *et al.*, 2016). Caso contrário, o ovócito irá degenerar em poucos dias. As células da granulosa e outras células que permaneceram no folículo remanescente passam por uma transformação quer estrutural, como funcional. Este processo é designado de luteinização, que culmina na formação do *corpus luteum* (ou lúteo ou amarelo). As células do *corpus luteum* aumentam e iniciam a produção temporária de grandes quantidade de progesterona e de estrogénios, em menor quantidade (Sherwood, 2016).

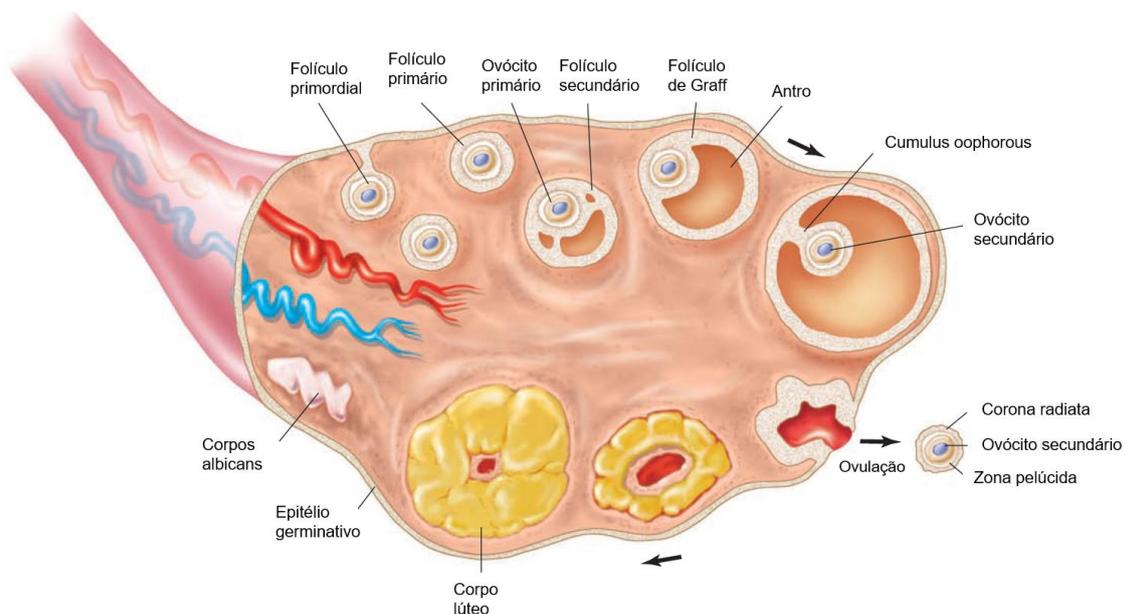


Figura 2. Representação de um corte longitudinal do ovário e representação do desenvolvimento folicular. O desenvolvimento folicular é iniciado com um *coorte* de folículos primordiais, que se desenvolvem em folículo primário, que por sua vez se desenvolvem em folículo secundário. Nestas fases o ovócito encontra-se em prófase I (ovócito primário). Depois da formação de um folículo dominante – folículo de *Graaf*, ocorre a ovulação de um ovócito secundário, rodeado pela zona pelúcida, e pelas células da *corona radiata*. Após ovulação, ocorre a luteinização, com a formação do corpo lúteo, mas que rapidamente se degenera, formando o corpo *albicans*. As setas indicam a sequência temporal de acontecimentos. Adaptado de Fox (2011).

Caso o ovócito não tenha sido fecundado ou o embrião não tenha implantado, o corpo lúteo irá degenerar cerca de 14 dias após a sua formação. As células são fagocitadas e rapidamente são preenchidas por tecido conjuntivo, formando uma massa fibrosa – corpo *albicans*. Desta forma, a última fase do ciclo ovárico está terminada e o ciclo está completo. Uma nova fase de recrutamento folicular é iniciada (Sherwood, 2016).

1.1.3 Controlo hormonal

O sistema reprodutor feminino é regulado por um complexo sistema hormonal, controlado pelo eixo hipotálamo-hipófise-ovário (Figura 3). As hormonas intervenientes neste sistema são a GnRH (Hormona Libertadora de Gonadotrofinas) segregada pelo

hipotálamo, de modo pulsante, que por sua vez é transportada por um sistema porta até à hipófise, estimulando a produção de gonadotrofinas, FSH e LH. Por fim, estas hormonas levarão a que o ovário produza hormonas sexuais femininas como, os estrogénios e progesterona (Guyton & Hall, 2011a). Antes da puberdade, os estrogénios e a progesterona são segregados em baixas concentrações, assim como, a GnRH, FSH e LH, não produzindo qualquer efeito no sistema reprodutor feminino. Nesta altura, os estrogénios e a progesterona possuem um forte papel inibidor do sistema hipotálamo-hipófise (Seeley *et al.*, 2016). O início da puberdade caracteriza-se por um aumento gradual da secreção de hormonas pelo eixo hipotálamo-hipófise. A partir da puberdade, o controlo hormonal é caracterizado por alterações rítmicas mensais nas taxas de secreção hormonal, e, conseqüentemente, alterações mensais em determinados órgãos sexuais. O primeiro ciclo menstrual, que marca o início da puberdade, é denominado de menarca, e ocorre quando é estabelecido o equilíbrio hormonal e o ovário torna-se recetivo à ação das hormonas hipofisárias (Guyton & Hall, 2011a; Seeley *et al.*, 2016).

1.1.3.1 Ciclo ovárico

O ovário possui duas identidades endócrinas dependendo da fase do ciclo: o folículo na primeira fase, que liberta estrogénios e o corpo lúteo que segrega tanto progesterona como estrogénios na última fase do ciclo. A secreção destas hormonas pelo ovário é regulada pela estimulação das hormonas gonodotróficas libertadas pela hipófise anterior. O ciclo ovárico tem uma duração média de 28 dias e é caracterizado por 3 fases distintas: a fase folicular, a ovulação e a fase lútea (Figura 3) (Fox, 2011; Sherwood, 2016).

Como referido, as primeiras fases de desenvolvimento folicular não são dependentes da produção hormonal. No entanto, para a continuação do desenvolvimento folicular e formação de um folículo maduro, capaz de segregar estrogénios e ovular, é necessário um apoio hormonal. O início do ciclo é marcado pelo aumento das concentrações de FSH, e LH em menores concentrações, libertada pela hipófise anterior, que marca o início da **fase folicular**. O ovário responde a este aumento com o desenvolvimento de 3 a 11 folículos antrais (recrutamento folicular), já que a FSH estimula a proliferação das células da granulosa (com recetores para a FSH) dos folículos selecionados. Os folículos em crescimento iniciam a produção de estrogénios, dependentes quer da produção da hormona FSH como da LH. Os estrogénios possuem a sua génese no colesterol, e a sua conversão requer uma serie de passos sequenciais. A LH estimula as células da teca a converter o colesterol em androgénios (que são cruciais durante a

maturação folicular, para a comunicação hormonal entre as células da granulosa e os ovócitos), que se difundem para as células da granulosa, enquanto a FSH estimula as células da granulosa a converter os androgénios formados em estrogénios através da enzima aromatase (Sherwood, 2016). Os estrogénios produzidos são libertados na corrente sanguínea, responsáveis pelo aumento desta hormona na fase folicular. Todavia, parte dos estrogénios permanecem no interior do folículo, contribuindo para a expansão do antro, e juntamente com a FSH para a proliferação das células da granulosa. Desta forma, devido ao número crescente de células produtoras de estrogénios, verifica-se um aumento exponencial das suas concentrações no sangue. Consequentemente, por *feedback* negativo, o aumento dos níveis de estrogénios, levam à inibição da produção de FSH e LH pela hipófise anterior, diminuindo a sua concentração (Sherwood, 2016). Para além disso, durante a fase folicular ocorre também a produção da hormona inibina pelas células foliculares. A inibina, como o nome indica, inibe, preferencialmente, a secreção de FSH. A queda dos níveis de FSH levam à atresia dos folículos recrutados, à exceção de um folículo, o folículo dominante, que teve um desenvolvimento mais acentuado, e possui um maior número de recetores para a FSH e, portanto, apesar da concentração de FSH serem menores, este folículo consegue prolongar o seu crescimento. Em contraste, a secreção de LH continua a subir lentamente durante a fase folicular, apesar da inibição da glândula pituitária. Para que ocorra uma inibição da libertação de LH é necessário a presença quer de estrogénios, como de progesterona. Como nesta fase do ciclo ainda não ocorre libertação de progesterona, os níveis de LH continuam a sofrer um ligeiro aumento (Sherwood, 2016).

Na período final da fase folicular, o folículo dominante produz uma elevada quantidade de estrogénios. O pico da concentração de estrogénios estimula a libertação exponencial de LH, por *feedback* positivo, que consequentemente, leva a um pico de LH. Este pico de LH ocorre durante um dia, a meio do ciclo, pouco antes de ocorrer a ovulação, período denominado de pré-ovulatório. A **ovulação** é provocada pelo pico de LH e FSH, que vai culminar em 4 grandes alterações a nível folicular: (1) cessa a síntese de estrogénio pelas células da granulosa; (2) dá-se o reinício da meiose do ovócito, que estava bloqueado em prófase I; (3) é iniciada a produção de prostaglandinas locais, que provocam contrações na parede folicular e simultaneamente, ocorre a libertação de enzimas proteolíticas, que digerem as células da *corona radiata*, parede do folículo e do ovário. A ação conjunta das prostaglandinas e das enzimas proteolíticas, culmina na libertação do ovócito em metáfase II, rodeado pelas células da *corona radiata*; (4) luteinização das células foliculares e formação do corpo lúteo. Assim o pico de LH (e

FSH) desencadeia a ovulação e dá-se início à próxima fase do ciclo ovárico, a **fase lútea** (Sherwood, 2016).

O corpo lúteo, ou corpo amarelo, é constituído pelas células do folículo de *Graaf* que permaneceram no ovário. O corpo lúteo possui inúmeros recetores para a LH, que estimula o seu desenvolvimento e a produção contínua de hormonas esteroides, os estrogénios, mas sobretudo a progesterona. Os níveis de estrogénios sofrem uma queda transitória, quando as células foliculares param o seu desenvolvimento, mas durante a fase lútea ocorre uma nova subida da sua concentração, devido à atividade do corpo lúteo, contudo não atinge o mesmo pico que ocorreu na fase folicular. Os níveis de progesterona no sangue são negligenciáveis antes da ovulação, contudo na fase lútea ocorre um aumento rápido, até ao seu nível máximo, perto do 21º dia do ciclo (Sherwood, 2016). Os níveis elevados de progesterona, associados aos níveis de estrogénios durante a fase lútea, exercem, por *feedback* negativo, a inibição da secreção de FSH e LH. O corpo amarelo produz inibina durante a fase lútea, de modo a impedir a libertação de FSH (menores valores de FSH do que de LH), para que, não ocorra desenvolvimento de novos folículos e múltiplas ovulações, durante o mesmo ciclo (Fox, 2011). O corpo amarelo acaba por degenerar (cerca do 26º dia do ciclo), caso não ocorra fecundação e implantação, e deste modo, os níveis de progesterona e estradiol diminuem drasticamente. O fator que contribui para a degeneração do corpo amarelo, é o declínio do nível de LH, impulsionado pela ação inibitória que a progesterona exerce sobre a hipófise em produzir LH. Com a diminuição dos níveis de progesterona e estrogénios em circulação na corrente sanguínea, a hipófise deixa de estar inibida, o que permite nova produção de FSH e LH. Sob a influência das gonadotrofinas, ocorre a seleção de alguns folículos antrais para desenvolvimento, dando-se início a um novo ciclo.

Caso se verifique implantação de um embrião, o corpo lúteo não degenera e continua o seu desenvolvimento, libertando quantidades crescentes de progesterona e estrogénios. Assim, não ocorre a descamação do endométrio e ocorre a inibição da FSH e LH, impedindo o início de um novo ciclo. Desta forma, o corpo lúteo fornece as hormonas necessárias para a manutenção da gravidez até que se forme a placenta (Sherwood, 2016).

1.1.3.2 Ciclo uterino ou menstrual

O ciclo uterino é um reflexo do ciclo ovárico, já que o útero vai responder aos níveis de estrogénios e progesterona, resultantes das variações ao nível do ovário durante os

ciclos mensais. O ciclo uterino tem como base os efeitos que as flutuações das concentrações de estrogénios e progesterona, exercem no endométrio. Como foi referido anteriormente, o útero é constituído pelo miométrio, uma camada muscular externa e pelo endométrio, uma camada de revestimento interno rica em vasos sanguíneos e glândulas. As hormonas ováricas vão exercer os seus efeitos nestas 2 camadas. O ciclo uterino é dividido em: fase menstrual, fase proliferativa e fase secretora (Figura 3). Por convenção o primeiro dia da menstruação é considerado o primeiro dia do ciclo (Fox, 2011; Guyton & Hall, 2011a). As mudanças que ocorrem no endométrio têm como principal objetivo a preparação do útero para implantação, caso o ovócito seja fecundado.

A **fase proliferativa** (assim como, a fase menstrual) são sobreponíveis à fase folicular do ciclo ovárico. A fase folicular é caracterizada por uma crescente concentração de estrogénios. Os estrogénios vão estimular, a nível endometrial, a proliferação de células epiteliais, glândulas e vasos sanguíneos. O endométrio sofre, assim, um aumento na sua espessura (3 a 5 mm) (Guyton & Hall, 2011a). Ao 15º dia do ciclo é iniciada a **fase secretora**, que coincide com a fase lútea. Esta fase é caracterizada pela elevada concentração de progesterona, que exerce um papel fundamental na preparação do endométrio para a implantação do embrião. A progesterona irá promover o aumento de secreção e armazenamento de substâncias, sobretudo glicogénio, importantes para a nutrição de um futuro embrião, e diminuir a frequência e intensidade de contrações do útero, de modo a proporcionar um ambiente ideal para implantação e desenvolvimento embrionário (Guyton & Hall, 2011a). No final da fase lútea, com a descida abrupta das concentrações de progesterona e estrogénios, devido à regressão do corpo amarelo, ocorrem alterações drásticas no endométrio, provocando a menstruação. A **fase menstrual** marca a ausência de gravidez, e é caracterizada pela descamação do estrato funcional do endométrio. Com a perda de estímulos ováricos no endométrio associado à presença de prostaglandinas, ocorre a vasoconstrição dos vasos sanguíneos, e subsequente redução do fornecimento de oxigénio (hipoxia dos tecidos), causando a morte celular do tecido endometrial. As prostaglandinas também estimulam contrações no miométrio, que ajudam a expelir o sangue pela vagina. Paralelamente, a menstruação também pode ser consequência de uma resposta inflamatória devido à queda de progesterona. Durante a fase pré-menstrual, é observada uma acumulação de leucócitos no endométrio, e a libertação de enzimas, que decompõem a matriz endometrial, característico de uma resposta inflamatória, levando à morte celular. A

menstruação dura, normalmente, 4 a 6 dias (Strauss & Williams, 2014; Sherwood, 2016).

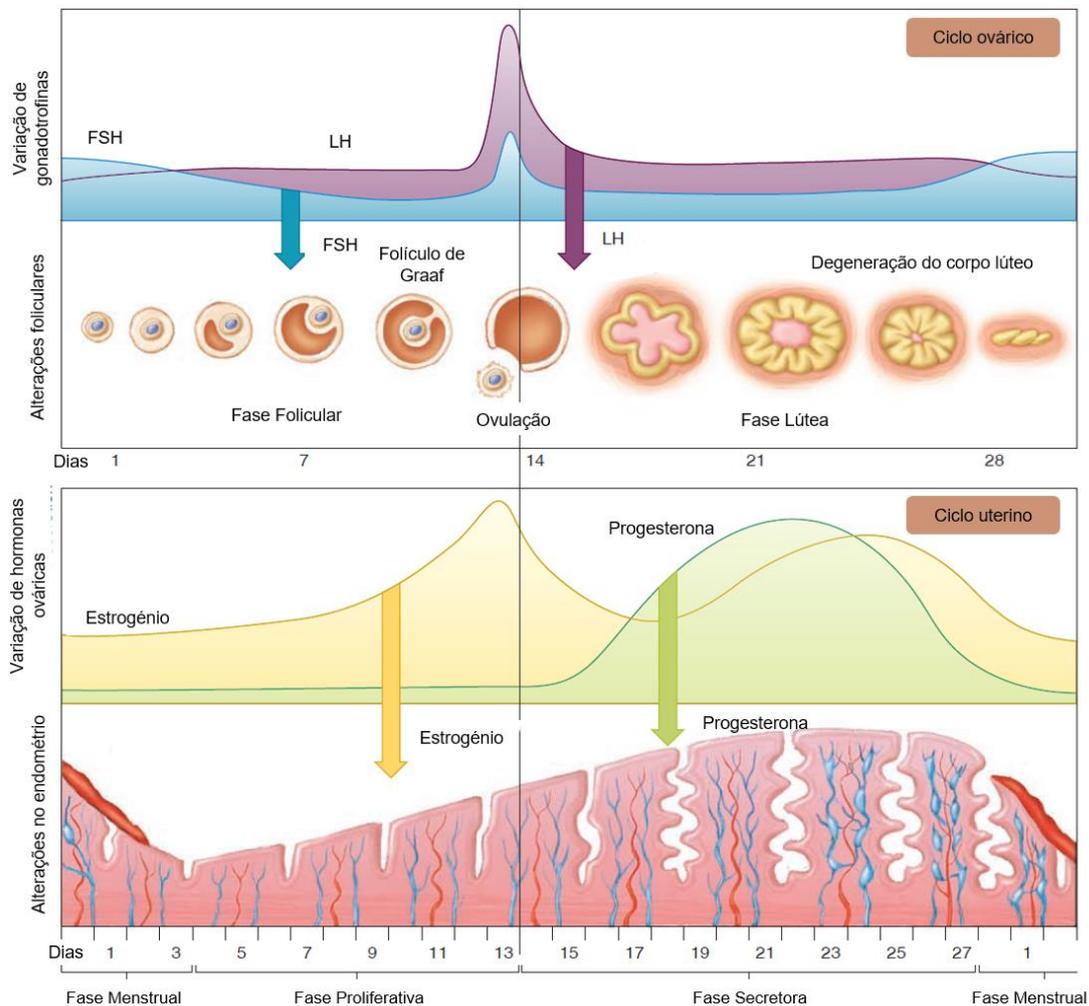


Figura 3. Representação do ciclo ovário e uterino. Estão representadas as alterações nas secreções das gonadotrofinas (FSH e LH) e hormonas ováricas (estrogénios e progesterona), assim como, o desenvolvimento folicular e formação do corpo amarelo e alterações no endométrio. Adaptado de Fox (2011).

1.2 Aparelho Reprodutor Masculino

1.2.1 Anatomia e Fisiologia do Sistema Reprodutor Masculino

O sistema reprodutor masculino (Figura 4) é constituído por 2 **testículos**, que constituem as gónadas masculinas. Os testículos estão envolvidos pelo escroto e encontram-se fora da cavidade abdominal, levando a uma diminuição da temperatura de aproximadamente 3°C. Facto de extrema importância, já que, a espermatogénese não deverá ocorrer a temperaturas superiores a 35°C. Nos testículos ocorre a produção dos gâmetas masculinos, os espermatozoides, assim como, da hormona, testosterona

(Jones & Lopez, 2006d). Os testículos são constituídos por 2 partes principais (Figura 5): (i) uma rede extensa de túbulos seminíferos altamente enrolados (80% da massa testicular), onde se encontram localizadas as células da linha germinativa e as células de suporte – as células de *Sertoli*, que criam um ambiente único para a ocorrência da espermatogénese (Jones & Lopez, 2014; Schlegel & Katzovitz, 2020); (ii) tecido intersticial (tecido conjuntivo entre os túbulos), onde estão localizadas as células produtoras de testosterona, as células de *Leyding* (Sherwood, 2016). O espaço intersticial é também rico em vasos sanguíneos e linfáticos para que seja possível o transporte das hormonas produzidas para as células-alvo (Fox, 2011).

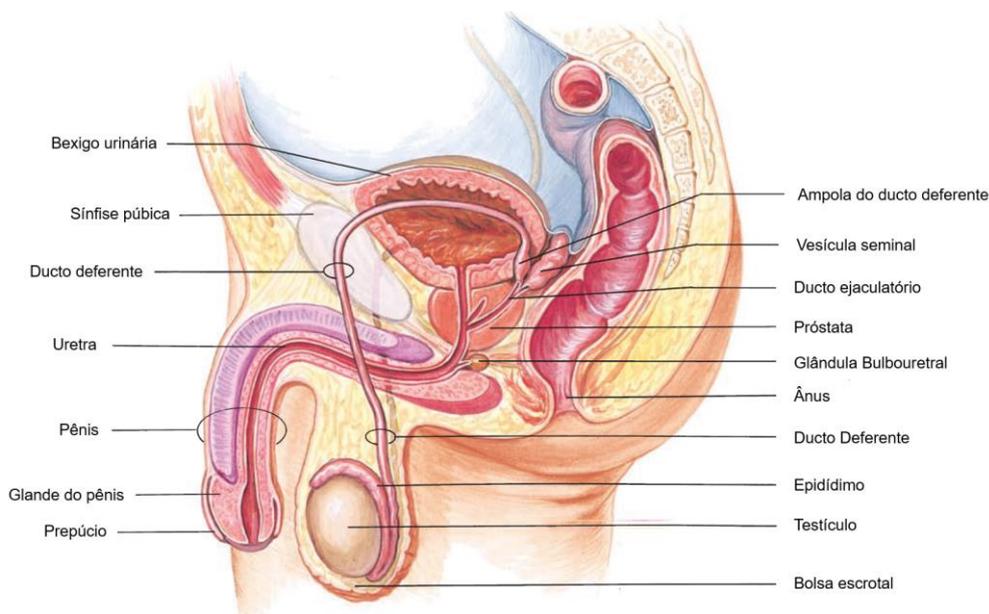


Figura 4. Constituição anatómica do aparelho reprodutor masculino em corte sagital. Os órgãos sexuais masculinos incluem um par de testículos com o epidídimo acoplado, envolvidos pela bolsa escrotal, um par de ductos deferentes que convergem no ducto ejaculatório, a uretra (órgão misto), um par de vesículas seminais, a próstata e as glândulas bulbouretrais e o órgão copulador, o pênis. Adaptado de Fox (2011).

A testosterona é uma hormona esteroide, que tem na sua génese o colesterol, tal como as hormonas sexuais femininas. Esta é libertada na corrente sanguínea e vai atuar em células-alvo, ligando-se a recetores androgénicos no citoplasma dessas células, que, subsequentemente, levará à síntese de novas proteínas que irão realizar a resposta celular desejada (Sherwood, 2016).

O sistema reprodutor masculino também inclui um **sistema de ductos** (epidídimos, canal deferente, ducto ejaculador, uretra) que têm como principais funções: receber, armazenar, e transportar os espermatozoides, e posteriormente o esperma (Jones & Lopez, 2006d).

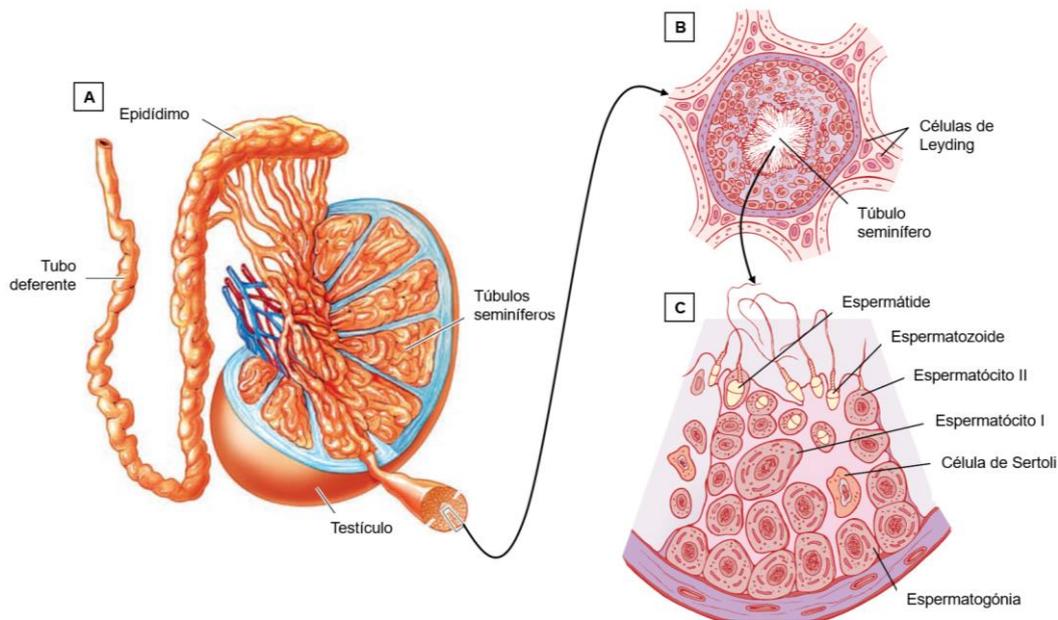


Figura 5. Representação esquemática de um corte longitudinal do testículo, (A), onde é possível observar com maior pormenor o interior dos túbulos seminíferos (B e C). Na Secção B, está representado um corte transversal de um túbulo seminífero, onde se observa as células da linhagem germinativa e formação dos espermatozoides e nos espaços intersticiais as células de *Leyding*. Na Secção C, observa-se com maior pormenor uma secção do túbulo seminífero, com o desenvolvimento de uma espermatogónia até ao estado de espermatóide (espermatogénese). Imagem (A) adaptada de Sherwood (2016). Imagem B e C adaptadas de Guyton and Hall (2011c).

No final do processo da espermatogénese, os espermatozoides são libertados dos túbulos seminíferos e são direcionados para os **epidídimos**, como resultado da pressão criada pela contínua secreção de fluido tubular, produzido pelas células de *Sertoli* (Sherwood, 2016). Quando são libertados, os espermatozoides ainda não adquiriram a capacidade de movimento, nem de fecundação. Os espermatozoides sofrem maturação no epidídimo e o flagelo torna-se funcional. O epidídimo tem a capacidade de concentrar os espermatozoides, já que, estes absorvem a maior parte do fluido. Cada epidídimo, acoplado a cada testículo converge no canal deferente. Os espermatozoides em maturação vão lentamente sendo direcionados para o canal deferente, estimulados a partir de contrações rítmicas do músculo liso, presente nas paredes dos epidídimos (Fox, 2011; Sherwood, 2016). Os **canais deferentes** têm como função o armazenamento dos espermatozoides. No momento da ejaculação, a camada muscular presente em volta do canal deferente, contrai-se e liberta os espermatozoides para o ducto ejaculatório (Seeley *et al.*, 2016). Os **ductos ejaculatórios** recebem os espermatozoides vindos dos vasos deferentes e as secreções das vesículas seminais. Os ductos esvaziam-se na uretra (Seeley *et al.*, 2016). A **uretra** é o último local de passagem do esperma, que será ejaculado pelo pénis. É um canal com dupla função,

já que, serve de passagem tanto do esperma, como da urina (Seeley *et al.*, 2016; Sherwood, 2016).

As **glândulas anexas** masculinas incluem as vesículas seminais, a próstata, e as glândulas bulbouretrais. As **vesículas seminais** produzem um líquido viscoso e alcalino, que têm na sua constituição: frutose, fonte de energia para os espermatozoides; prostaglandinas, que induzem contrações no músculo liso; e fibrinogénio, um precursor da fibrina, importante para coagulação do sémen. Durante o processo de ejaculação, cada vesícula esvazia o seu conteúdo para o ducto ejaculatório (Guyton & Hall, 2011c; Sherwood, 2016). A **próstata** sintetiza um líquido aquoso e ligeiramente ácido que contém, ácido cítrico, zinco, e 2 tipos de enzimas proteolíticas, umas que irão atuar no fibrinogénio para a coagulação e outras que irão atuar na liquefação do coágulo. Durante a ejaculação, o músculo liso, que envolve a próstata, contrai para libertar o seu conteúdo para a uretra (Seeley *et al.*, 2016). As **glândulas bulbouretrais**, ou glândulas de *Cowper*, produzem muco, e são estimuladas a produzir e libertar as suas secreções durante o estímulo sexual, para auxiliar na lubrificação durante o coito e ajudar a neutralizar o conteúdo ácido da uretra e da vagina (Seeley *et al.*, 2016).

O **pénis** (genitália externa) é o órgão copulador, encarregue da transferência dos espermatozoides para o trato reprodutivo feminino. É constituído por tecido erétil, responsável pelo processo de ereção (Seeley *et al.*, 2016).

Todos os fluidos das glândulas e espermatozoides estão localizados em compartimentos distintos e apenas se misturam no momento da ejaculação, transportados pelo sistema de ductos, formando o sémen (Sherwood, 2016). O sémen constitui uma junção dos espermatozoides com fluido proveniente dos testículos, e produtos segregados pelas glândulas anexas. As secreções das vesículas seminais correspondem a cerca de 60% do total do volume do esperma, a próstata contribui com cerca de 30%, os testículos e as glândulas bulbouretrais contribuem 5% cada (Seeley *et al.*, 2016). O plasma seminal contém inúmeras substâncias essenciais para o sucesso da fertilização, que tem como principais funções a manutenção e transporte dos espermatozoides (Jones & Lopez, 2006d).

1.2.2 Controlo hormonal

Os mecanismos endócrinos que regulam a função testicular são semelhantes aos que controlam a atividade ovárica. Todavia, umas das principais diferenças entre os 2

sistemas, é o facto de no sexo masculino a produção hormonal e de gâmetas ser um processo contínuo a partir da puberdade, e não cíclico, ao contrário do que sucede no sexo feminino. O eixo hipotálamo-hipófise é o principal responsável pelo controlo da função testicular através de um sistema de *feedback* negativo (Figura 6) (Dale & Elder, 2010b).

Na infância, são produzidas quantidades vestigiais de testosterona, segregada pelos testículos, o que inibe a secreção de GnRH. Na puberdade, normalmente, entre os 12 e os 14 anos, o hipotálamo sofre alterações no seu desenvolvimento, fazendo com que este se torne menos sensível ao efeito inibidor da testosterona, e o nível de secreção de GnRH, e, conseqüentemente, de FSH e LH, pela hipófise, aumentem. Desta forma, ocorre o estímulo da espermatogénese e produção mais intensa de testosterona. A secreção destas hormonas é iniciada na puberdade e é contínua ao longo da vida (Seeley *et al.*, 2016).

O hipotálamo produz e liberta a hormona GnRH, de um modo pulsante, que é diretamente direcionada para a hipófise anterior, devido à existência de um sistema porta de vasos sanguíneos que envolve o sistema hipotálamo-hipófise (Schlegel & Katzovitz, 2020). A hormona GnRH estimula a hipófise anterior a produzir e libertar as gonadotrofinas, FSH e LH, que, por sua vez, irão atuar nas células alvo, via corrente sanguínea (Guyton & Hall, 2011c). A hormona LH vai atuar nas células de *Leyding*, levando à síntese da hormona testosterona. Quando a concentração desta hormona esteroide é elevada, o hipotálamo e, subseqüentemente, a hipófise diminuem a libertação de GnRH, FSH e LH, levando a uma redução da secreção de testosterona nos testículos. Pelo contrário, níveis de testosterona reduzidos estimulam o hipotálamo a produzir GnRH, e conseqüentemente, as concentrações de FSH e LH também aumentam, assim como, a estimulação da secreção testicular de testosterona. Desta forma, os níveis de testosterona mantêm-se estáveis por um mecanismo constante de *feedback* negativo, através da inibição ou estimulação da sua produção (Guyton & Hall, 2011c).

A FSH libertada na corrente sanguínea, vai ligar-se a recetores específicos para a FSH localizados nas células de *Sertoli*, impulsionando a espermatogénese e a produção e libertação de inibina. Simultaneamente, a testosterona produzida pelas células de *Leyding* possui também um forte efeito trópico na espermatogénese (Guyton & Hall, 2011c). Tanto a FSH, como a testosterona, são essenciais para o estímulo da génese de espermatozoides. Quando existe alguma anomalia, e não ocorre produção de espermatozoides, a secreção de FSH mantêm-se sempre muito elevada. Por outro lado,

quando ocorre uma produção intensiva de espermatozoides, a sua secreção diminui (Guyton & Hall, 2011c).

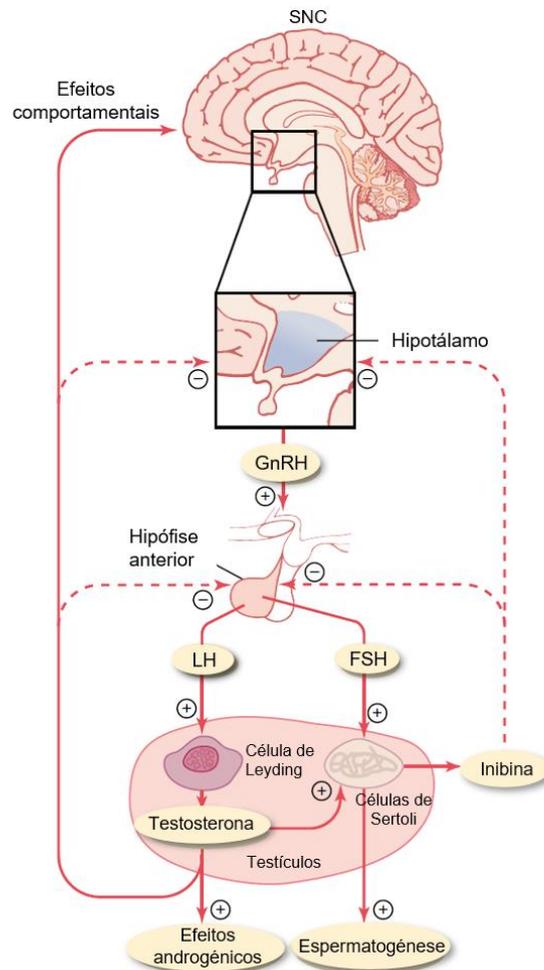


Figura 6. Esquema representativo do controlo hormonal da função testicular através do eixo hipotálamo-hipófise. O hipotálamo secreta GnRH, que estimula a produção de FSH e LH pela hipófise anterior. A FSH atua nas células de Sertoli que estimula a espermatogénese e a LH atua nas células de Leyding que produzem testosterona que exercerá vários efeitos androgénicos. A testosterona e a presença da Inibina produzida pelas células de Sertoli, provocam, por *feedback* negativo, a inibição da hipófise anterior. O sinal (+) é indicativo de ação estimulante, enquanto o sinal (-) é indicativo de ação inibitória. SNC - Sistema Nervoso Central; GnRH - Hormona Libertadora de Gonadotrofinas; FSH - Hormona Folículo-Estimulante; LH - Hormona Lúteo-Estimulante. Adaptado de Guyton and Hall (2011c).

Aliado a este *feedback*, outra hormona, a Inibina B, auxilia o controlo dos níveis de espermatogénese e de testosterona. Esta hormona inibitória possui um efeito direto na inibição da produção de FSH, pela hipófise anterior (Guyton & Hall, 2011c; Schlegel & Katzovitz, 2020).

1.2.3 Espermatogénese

O principal objetivo da espermatogénese é a produção de gâmetas masculinos que possuam a capacidade de fertilizar o ovócito e originar um embrião viável. Este é um

processo complexo e contínuo que ocorre nos túbulos seminíferos, onde as células de *Sertoli* fornecem suporte. Estas encontram-se em torno do lúmen do túbulo seminífero, unidas por ligações apertadas, formando um anel, onde cada célula se encontra posicionada entre a zona exterior do túbulo até ao lúmen (Sherwood, 2016). As **espermátogónias** são células diploides com 46 cromossomas, que darão origem as outras células da linha germinativa. Estas são formadas ainda numa fase fetal, mas não sofrem qualquer desenvolvimento até à puberdade (Paoli *et al.*, 2020). As espermátogónias estão localizadas no compartimento basal das células de *Sertoli* e possuem dupla funcionalidade: (i) sofrem sucessivas mitoses para se autorrenovarem, de modo a garantir uma produção contínua de espermatozoides, ao longo da vida do homem, denominadas de espermátogónias tipo A; (ii) as espermátogónias tipo B, irão sofrer divisões meióticas para a produção dos gâmetas propriamente ditos. Ao iniciarem o processo de divisão meiótica, transformam-se em **espermátócitos primários**, que se deslocarão para o compartimento adluminal, das células de *Sertoli* (Kretser *et al.*, 1998; Jones & Lopez, 2006d; Neto *et al.*, 2016). Os espermátócitos primários sofrem a primeira divisão meiótica, onde o número de cromossomas passa de 46 para 23, e são designadas de **espermátócitos secundários**. De seguida, os espermátócitos secundários são submetidos à segunda divisão meiótica e produzem 4 células haploides (n), os espermátídios. Assim sendo, cada espermátócito primário dividiu-se 2 vezes, dando origem a 4 espermátides (Jones & Lopez, 2006d; Neto *et al.*, 2016). O processo de espermátogénese ainda não está concluído. As espermátides sofrem um processo de maturação celular, denominado de espermiogénese, e transformam-se em espermatozoides funcionais. A espermiogénese é a única fase que não envolve divisões mitóticas ou meióticas, apenas um processo de diferenciação, e uma série de mudanças nucleares e citoplasmáticas (Neto *et al.*, 2016). A espermiogénese envolve a formação do acrossoma, uma vesícula formada a partir do complexo de *Golgi*. O acrossoma é uma vesícula constituída por enzimas, incluindo a hialuronidase e a acrosina, e enzimas proteolíticas. Estas enzimas permanecem inativas até contactarem com o complexo *cumulus-oophorus*, desempenhando um papel crucial, já que permitem que o espermatozoide penetre nas várias camadas celulares do ovócito e o fertilize (Sherwood, 2016). O núcleo torna-se mais condensado e alongado e migra para as extremidades. Os centríolos deslocam-se para a extremidade posterior e formam o flagelo, que vai alongando, gradualmente, a forma espermática. As mitocôndrias aumentam em número e acumulam-se à volta da base da cauda, formando a peça intermédia. De modo a maximizar a mobilidade espermática, o excesso de citoplasma é fagocitado pelas células de *Sertoli* envolventes (Jones & Lopez, 2006d; Neto *et al.*,

2016). Deste modo, forma-se um espermatozoide, que se distingue em 3 partes (Figura 7): a cabeça, a peça intermédia, e a cauda. Na cabeça encontra-se a informação genética contida no núcleo, e o acrossoma. A cauda possibilita a movimentação do espermatozoide, cuja energia necessária é proveniente das mitocôndrias localizadas na peça intermédia. Contudo, os espermatozoides nesta fase, não estão completamente funcionais, apenas quando migram para o epidídimo é que sofrem um processo de maturação e tornam-se móveis e com uma maior resistência (Fox, 2011). Apenas quando há a diferenciação total em espermatozoides, é que estes são libertados para o lúmen dos túbulos seminíferos, num processo designado de espermição, que envolve a quebra das junções entre as células de *Sertoli* e os espermatozoides. À medida que os espermatozoides se vão libertando, vão sendo empurrados pelo fluido tubar, presente no lúmen, em direção aos epidídimos (Neto *et al.*, 2016; Sherwood, 2016).

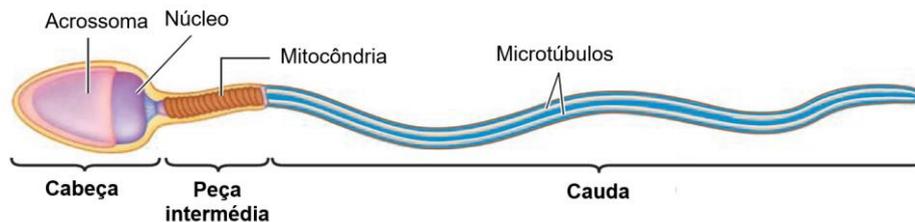


Figura 7. Esquema representativa das partes constituintes de um espermatozoide humano. O espermatozoide é formado pela cabeça, composta pelo núcleo e acrossoma, pela peça intermédia, que contém as mitocôndrias e por fim, a cauda que possui na sua constituição uma serie de microtúbulo. Adaptado de Sherwood (2016).

Durante as divisões mitóticas das células da linhagem germinativa, não ocorre uma divisão citoplasmática completa, as células mantêm-se unidas por pontes citoplasmáticas. Durante a meiose, 2 espermatozoides irão receber o material genético do cromossoma Y e a outra metade receberá o cromossoma X. Esta divisão incompleta permite que os espermatozoides que contém a informação genética do cromossoma Y, recebam informações genéticas, que apenas estão presentes no cromossoma X, essenciais para o desenvolvimento dos espermatozoides. Caso não ocorresse esta ligação, apenas os espermatozoides com o cromossoma X, se conseguiriam desenvolver, e os espermatozoides com o cromossoma Y não conseguiriam sobreviver e continuar o seu desenvolvimento. Assim, apenas na fase de espermatíde, é que ocorre a divisão citoplasmática completa (Sherwood, 2016).

No homem, são necessários cerca de 65 a 75 dias para que, ocorra um ciclo completo, desde a espermatogónia até à fase final de espermatozoide. Através de uma análise microscopia das regiões do epitélio seminífero, é possível verificar que as células da

linhagem germinativa, não se encontram todas na mesma fase da espermatogénese (Jones & Lopez, 2006d; Neto *et al.*, 2016).

1.3 A fecundação e o desenvolvimento embrionário

1.3.1 Percurso dos espermatozoides

A fecundação caracteriza-se pela união dos gâmetas feminino e masculino. A sucessão de acontecimentos que culminam na fecundação, iniciam-se com a ejaculação masculina, onde os espermatozoides são depositados na vagina. O número de espermatozoides presentes no ejaculado pode variar em média entre 40 e 500 milhões, contudo, cerca de 30% dos espermatozoides são incapazes de fecundar o ovócito, por possuírem anomalias estruturais ou bioquímicas, ou por não terem vitalidade. Estes espermatozoides são, ou absorvidos pelo trato reprodutor feminino, ou são expelidos pela vagina (Jones & Lopez, 2006c).

Cerca de 1 minuto após a deposição do sémen na vagina, ocorre a coagulação do líquido seminal por ação da vesiculase (enzima prostática) no fibrinogénio (glicoproteína seminal), que o converte em fibrina, formando uma rede de fibrina. Este processo é essencial, para impedir a saída do sémen da vagina, aquando da retirada do pénis. Todavia, cerca de 20 min após a coagulação, através da ação da quimiotripsina (enzima prostática), ocorre a quebra das ligações da rede de fibrina e o sémen liquefaz, para que seja possível a libertação dos espermatozoides da rede (Jones & Lopez, 2006c).

O ambiente da vagina é um local inóspito para a sobrevivência dos espermatozoides e o seu pH ácido (pH de 3,5 a 4,0) inibe a motilidade espermática. Contudo, na presença do esperma, caracterizado por um pH alcalino, na vagina, ocorre uma neutralização do pH vaginal, aumentando-o para cerca de 6.0 a 6.5, criando um ambiente favorável à aquisição de motilidade dos espermatozoides (Jones & Lopez, 2006d; Guyton & Hall, 2011b).

O canal cervical é a primeira barreira física que os espermatozoides terão de atravessar, que se encontra bloqueado pelo muco cervical. Dependendo da fase do ciclo menstrual (Sherwood, 2016) este muco é mais espesso/viscoso, contudo durante a fase pré-ovulatória (cerca de 2 a 3 dias), com o aumento dos níveis de estrogénios (e níveis de progesterona baixos), leva a que o muco se torne mais aquoso. Nesta fase, a passagem dos espermatozoides para o útero é facilitada, caso contrário, o muco espesso dificultaria a passagem pelo canal cervical. Apenas uma pequena percentagem de espermatozoides consegue ultrapassar esta barreira, e apenas 100 a 1000

espermatozoides alcançam as trompas de Falópio (Jones & Lopez, 2006c; Sherwood, 2016). As contrações da musculatura uterina, fortemente presentes no período pré-ovulatório (caraterizado por uma elevada concentração de estrogénios), também estimuladas devido à presença de prostaglandinas no líquido seminal, auxiliam o movimento dos espermatozoides até às trompas de Falópio, aliado aos movimentos direcionais dos espermatozoides (Seeley *et al.*, 2016).

1.3.2 Capacitação espermática

Os espermatozoides não têm a capacidade de fertilizar o ovócito, logo após a ejaculação. Os espermatozoides terão de sofrer uma série de alterações estruturais e bioquímicas que lhes permitirão fecundar o ovócito. Este processo, designado de capacitação, ocorre quando os espermatozoides atravessam o canal cervical (Dale & Elder, 2010e; Seeley *et al.*, 2016). A capacitação carateriza-se por uma reorganização e fluidez membranar, através da perda de fatores descapacitantes seminais, fluxo de colesterol e iões, que alteram o potencial de membrana e fosforilação de proteínas. Este processo é importante para induzir a hiperativação da motilidade, assim como, da reação acrossómica (Lamirande *et al.*, 1997; Dale & Elder, 2010e). A hiperativação da motilidade carateriza-se por movimentos violentos da cauda, fundamentais para a penetração das várias camadas de células que rodeiam o ovócito, permitindo alcançá-lo (Lamirande *et al.*, 1997).

1.3.3 Fecundação

No momento da ovulação, o ovócito rodeado pela zona pelúcida e pelas células da *corona radiata* é libertado nas trompas de Falópio. Devido às contrações da musculatura das trompas, ao fluxo de secreções, e do movimento dos cílios das trompas em direção ao útero, direcionam o fluido com o ovócito pelo infundíbulo, até à ampola em direção à cavidade uterina (Figura 9) (Jones & Lopez, 2006c; Fox, 2011).

Os espermatozoides capacitados são atraídos por fatores químicos libertados pelas células do cúmulo do ovócito, guiando os espermatozoides até ao ovócito, por um processo designado de quimiotaxia (Kaupp *et al.*, 2008). Apenas algumas centenas de espermatozoides chegam à região da ampola, e terão agora de penetrar as várias camadas de células que rodeiam o ovócito. Inicialmente, o que irá auxiliar na penetração das camadas celulares da granulosa, serão os movimentos bruscos dos espermatozoides (Figura 8) (Jones & Lopez, 2006c). O processo de reconhecimento e atração dos espermatozoides ao ovócito ainda não está totalmente esclarecido. A

interação entre os 2 gâmetas parece ser resultado de um processo biológico complexo, que envolve uma série de proteínas espermáticas e a ligação a glicoproteínas da zona pelúcida, ZP1, ZP3 e ZP4 (Kaser *et al.*, 2014). Quando o espermatozoide capacitado se liga à zona pelúcida, ocorre a reação acrossómica, induzida pela ligação do espermatozoide à glicoproteína, ZP3, presente na camada externa da ZP, que desencadeia alterações na permeabilidade da membrana do espermatozoide (Dale & Elder, 2010e; Kaser *et al.*, 2014).

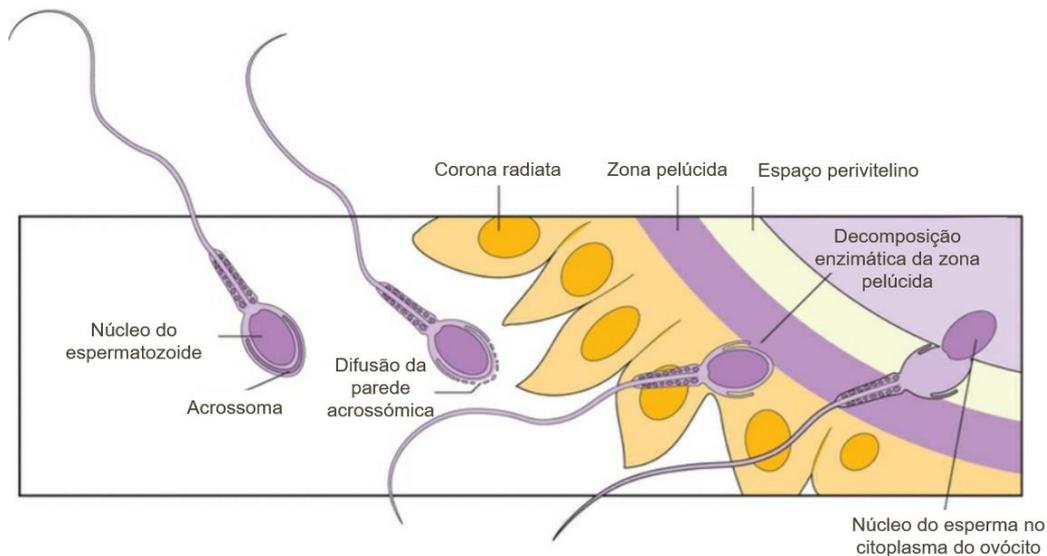


Figura 8. Representação esquemática do processo de interação do espermatozoide com o ovócito que culmina na sua fecundação. Adaptado de Taylor *et al.* (2019).

A reação acrossómica envolve, inicialmente, a fusão da membrana acrossómica externa com a membrana da cabeça do espermatozoide, permitindo a exocitose do conteúdo do acrossoma (Figura 8). Desta forma, ocorre a libertação de enzimas, a hialuronidase que irá digerir a ligação entre as células da *corona radiata* e a acrosina que irá dissolver as células da zona pelúcida do ovócito (Dale & Elder, 2010e; Seeley *et al.*, 2016). Assim, ocorre a fusão da membrana do ovócito com a membrana do espermatozoide, levando a que o núcleo do espermatozoide seja libertado no citosol do ovócito (Figura 8). A entrada do núcleo do espermatozoide no oolema do ovócito, conduz a alterações químicas membranares, que irá despoletar um aumento de Ca^{2+} no citoplasma do ovócito (despolarização do oolema) (Kaser *et al.*, 2014). Este aumento catiónico é um fator chave para o desencadear de 2 etapas fundamentais para a correta formação do zigoto: o bloqueio à polispermia (fertilização por mais do que um espermatozoide) e a ativação do zigoto. O aumento catiónico leva à exocitose de grânulos corticais no espaço entre a membrana do ovócito e a zona pelúcida. Os grânulos corticais são pequenas bolsas cheias de enzimas, que irão inativar os recetores ZP3 e endurecimento

da membrana, que impossibilita a ligação e penetração de mais espermatozoides. A ativação do zigoto, envolve a finalização da segunda divisão meiótica, que leva a formação do pronúcleo feminino e a extrusão do segundo glóbulo polar (Kaser *et al.*, 2014; Sherwood, 2016). O ovócito, anteriormente, em metáfase II, progride para telófase II, caracterizada pela eliminação de um dos cromossomas irmãos (2º glóbulo polar), para assim, se formar uma estrutura haploide. Desta forma, um ovócito fertilizado é caracterizado pela presença de 2 glóbulos polares e 2 pronúcleos (um de origem materna e outro paterno) (Kaser *et al.*, 2014).

Aquando a finalização da segunda divisão meiótica, o núcleo do ovócito assume uma posição central, onde se encontra com o pronúcleo do espermatozoide. Cada núcleo, tem uma composição genética haploide (23 cromossomas). No momento da fusão - singamia, passo final da fertilização, forma-se o zigoto com 46 cromossomas (diploide), retomando o *pool* cromossómico característico da espécie humana, que dará origem a um organismo com um material genético único (Fox, 2011; Seeley *et al.*, 2016).

Caso o ovócito resultante da ovulação, não seja fertilizado, não completará a segunda divisão meiótica, será transportado até ao útero, onde irá degenerar e, conseqüentemente, será fagocitado, cerca de 12 a 24 horas após a ovulação. Neste sentido, se a relação sexual não ocorrer durante este período não irá ocorrer fertilização do ovócito. Desta forma, para que a fertilização seja bem-sucedida, o ato sexual deverá ocorrer num período de até 3 dias antes da ovulação e no máximo um dia depois da mesma, o denominado de período fértil (Fox, 2011).

1.3.4 Desenvolvimento embrionário

O zigoto inicia uma série de divisões mitóticas, ainda na trompa de Falópio (Figura 9). Cerca de 30 a 36 h após a fertilização, o zigoto divide-se em duas células filhas idênticas, denominadas de blastómeros. Cerca de 40h após a fertilização, ocorre uma nova clivagem, originando 4 células. Uma terceira divisão acontece entre 50 a 60 h após a fertilização, formando 8 blastómeros. Ao 4º dia, a clivagem continua, e são iniciados fenómenos de compactação e adesão entre os blastómeros, devido à secreção de moléculas de adesão celular, formando uma massa celular com 16 a 30 células, denominada de mórula. Neste momento, a concentração de progesterona é elevada o suficiente para relaxar a musculatura no istmo, permitindo que a mórula seja impelida para a cavidade uterina. Este atraso na chegada ao útero permite a preparação endometrial para receber o embrião em desenvolvimento. O endométrio torna-se amplamente vascularizado, e ocorre o armazenamento de nutrientes. Caso a mórula

chegasse prematuramente, degeneraria (Sherwood, 2016). A mórula continua em desenvolvimento por divisões mitóticas, que culmina na diferenciação em blastocisto. É iniciado o processo de cavitação, devido à ativação das bombas de K^+ e Na^+ e fluxo de outros iões (cloreto e bicarbonato) nos polos, que leva à formação de uma cavidade com um fluido aquoso, o blastocélio. Diferencia-se a massa celular interna (MCI), na periferia, que dará origem ao feto e uma camada de células que envolvem o blastocélio, a trofoectoderme, que dará origem à placenta e tecido extraembrionário. O blastocisto vai expandindo, devido acumulação ativa de fluido. Nesta fase, o embrião ainda se encontra rodeado pela zona pelúcida, que funciona como uma capa protetora, mas à medida que o blastocisto desenvolve, a ZP vai ficando cada vez mais fina. Para se iniciar o processo de implantação é necessário que ocorra a eclosão do embrião, isto é a saída do blastocisto da zona pelúcida, para permitir a interação entre as células do trofoblasto com o epitélio uterino (Kaser *et al.*, 2014). A eclosão é conseguida, devido à acumulação de líquido, que permite a expansão e pela libertação de enzimas proteolíticas, pelas células da trofoectoderme, que digerem a ZP (Dale & Elder, 2010a; Kaser *et al.*, 2014).

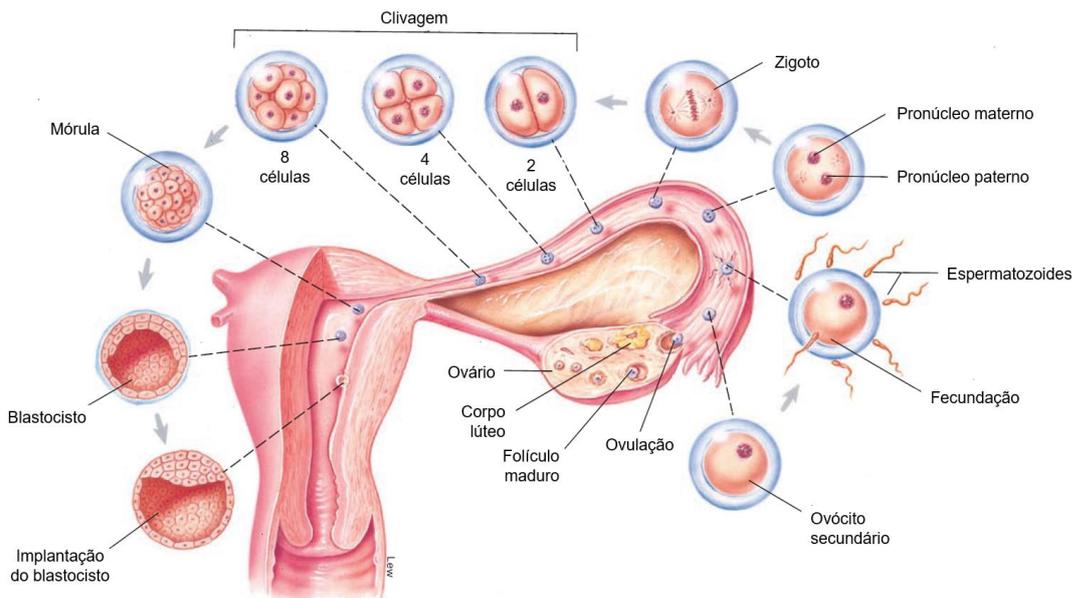


Figura 9. Desenvolvimento embrionário ao longo do sistema reprodutor feminino. No ovário é possível observar o desenvolvimento folicular e o momento da ovulação, onde o ovócito é expulso para as trompas de Falópio, local onde ocorre o encontro do ovócito com os espermatozoides, e onde ocorre a fecundação. Adaptado de Fox (2011).

1.3.5 Implantação

O sucesso da implantação envolve uma interação altamente complexa e sincronismo entre o endométrio, as hormonas ováricas e o embrião formado. A implantação dá-se ao 7º dia após a fecundação. Este período permite a preparação endometrial e embrionária para a implantação (Sherwood, 2016). Na fase folicular, o endométrio

aumenta a sua espessura, devido à proliferação celular, induzida pela elevada concentração de estrogénios. Na fase lútea, com o aumento dos níveis de progesterona, o endométrio inicia a fase secretora, tornando-se recetivo para a chegada do blastocisto (Strauss & Williams, 2014). O blastocisto só pode ligar-se ao endométrio durante a designada, janela de implantação (Kaser *et al.*, 2014).

O processo de implantação é caracterizado por 3 fases distintas: (i) a **aposição**, na qual o blastocisto se desloca e direciona a MCI para a parede uterina; (ii) de seguida, ocorre a **adesão** ao endométrio, devido à ligação de moléculas de aderência entre o embrião e o endométrio; (iii) por fim, ocorre a fase de **invasão** do endométrio, onde as células do trofoblasto produzem enzimas que digerem a matriz extracelular do endométrio, e é estabelecida a interface entre a mãe e o feto (Dale & Elder, 2010c).

Cerca de 12 dias após a fertilização, o embrião está totalmente incorporado no estroma uterino. Uma vez concluída esta etapa, inicia-se a secreção de hCG (gonadotrofina coriónica humana), podendo ser detetada por um teste de gravidez (Kaser *et al.*, 2014).

2. A Infertilidade e o seu Diagnóstico

2.1 A Infertilidade

O sonho da parentalidade é um dos desejos mais comuns da vida adulta do ser humano. A fertilidade é definida como a capacidade de estabelecimento de uma gravidez clínica (Zegers-Hochschild *et al.*, 2017). Porém, 1 em cada 4 casais não alcançam espontaneamente a gravidez, e uma grande percentagem vai necessitar de ajuda médica para o conseguir (Boivin *et al.*, 2007). A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece a infertilidade como uma doença definida como a incapacidade de alcançar uma gravidez após, pelo menos, 12 meses de relações sexuais regulares, desprotegidas (Zegers-Hochschild *et al.*, 2017), atingindo a nível global, cerca de 15% dos casais em idade reprodutiva (Sun *et al.*, 2019).

O termo infertilidade pode ser dividido em 2 conceitos: infertilidade primária, e infertilidade secundária. A infertilidade primária feminina é descrita, quando uma mulher nunca alcançou uma gravidez clínica e preenche os critérios associados à definição de infertilidade. O termo de infertilidade secundária feminina aplica-se a uma mulher incapaz de estabelecer uma gravidez clínica, tendo já existido uma gravidez (com nado vivo ou não) prévia. A mesma categorização é aplicável ao sexo masculino, referente à sua participação no início de uma gravidez (Zegers-Hochschild *et al.*, 2017).

Outros conceitos importantes na área de PMA, são a fecundabilidade e fecundidade. A fecundabilidade é definida como a capacidade de se atingir uma gravidez num ciclo menstrual. Na espécie humana, a taxa de fecundabilidade é de apenas 25% em casais jovens em idade reprodutiva, no início de tentativa de conceção (Barbieri, 2014). A fecundidade é a capacidade de alcançar uma gravidez, que resulta no nascimento de um nado vivo, baseado em tentativas de conceção durante um ciclo menstrual. A fecundabilidade é um bom indicativo da eficácia dos tratamentos de infertilidade. Um casal infértil que possui uma fecundabilidade estimada em 4%, caso recorra a técnicas de PMA, essa taxa pode aumentar. Se recorrer a técnicas de tratamento como uma inseminação intrauterina com estimulação ovárica, a taxa sobe para cerca de 8%. Se recorrer a técnicas mais sofisticadas como a uma FIV (Fertilização *in vitro*) ou a ICSI (Injeção intracitoplasmática de espermatozoide), a taxa aumentará para cerca de 30% (Barbieri, 2014).

2.2 Diagnóstico da Infertilidade

Um casal deve recorrer a ajuda médica após um 1 ano de relações sexuais desprotegidas, com ausência de concepção. Contudo, devido ao decréscimo acentuado da fertilidade feminina a partir dos 35 anos de idade, é aconselhável que a partir dessa idade, a avaliação da infertilidade seja iniciada após 6 meses de tentativas de concepção, e em mulheres com mais de 40 anos de idade, após 3 meses. No caso de mulheres já diagnosticadas, previamente, com algum fator de infertilidade, deve iniciar-se de imediato o estudo e possível tratamento (Datta *et al.*, 2016).

É de extrema importância a presença de ambos os elementos do casal na primeira consulta de infertilidade, já que os dois desempenham, igualmente, um papel fundamental na parentalidade. O sucesso de uma gravidez implica uma série de eventos fisiológicos, tanto femininos, como masculinos, que inclui a ovulação, produção de gâmetas competentes, o percurso dos espermatozoides e o seu encontro com o gâmeta feminino, e a implantação do embrião no endométrio, e o seu desenvolvimento. Quando se verifica alguma falha durante este complexo processo, pode-se verificar um quadro de infertilidade.

O objetivo da anamnese inicial é a identificação dos fatores de risco ou patologias que podem ser explicativos do estado de infertilidade (será abordado no capítulo 2.3). Na primeira consulta, é abordada a duração da infertilidade (quanto mais longo o período de tentativas, menor será o prognóstico), se algum dos elementos ou ambos tiveram paternidades anteriores, tratamentos de infertilidade anteriores, a frequência e periodicidade das relações sexuais. É também avaliado o historial médico completo, onde são abordadas questões relacionadas com doenças e cirurgias prévias, principalmente na zona abdominal ou pélvica, alergias, medicação, doenças sexualmente transmissíveis, entre outras. Outro tema questionado durante a consulta, são os hábitos de estilo de vida e o risco ocupacional, como o consumo de álcool, drogas, exposição a stress e a ambientes tóxicos (Brugh & Lipshultz, 2004; McLaren, 2012).

Durante a avaliação da fertilidade do casal é possível a identificação de condições reversíveis ou tratáveis, que poderão permitir uma concepção natural. Por outro lado, existem determinadas condições de infertilidade que apenas são ultrapassáveis recorrendo a tratamentos de PMA. Por último, existem condições que a utilização de esperma e/ou ovócitos próprios é não é possível, sendo a única solução recorrer a um banco de dadores ou adoção (Sharlip *et al.*, 2002).

2.2.1 Avaliação do Fator Feminino

Na avaliação de um possível fator de infertilidade associado ao elemento feminino é importante incluir na história reprodutiva, a idade da menarca, a regularidade e periodicidade do ciclo menstrual, percepção da ovulação e os métodos de contraceção anteriormente utilizados (Committee on Gynecologic Practice & ASRM, 2019). Na primeira consulta é, normalmente, realizada uma ecografia ginecológica transvaginal. Este exame permite a obtenção de informações básicas sobre o útero, ovários e, também, sobre as trompas de Falópio.

Os teste de avaliação complementar da fertilidade feminina centram-se na avaliação da reserva ovárica, na função ovulatória e nas anomalias estruturais do sistema reprodutor. A avaliação da reserva ovárica, isto é, do número de folículos disponíveis, pode ser conseguida pela determinação da FSH e estradiol entre o 2º e 5º dia do ciclo menstrual, ou pela contagem de folículos antrais através de uma ecografia transvaginal (Barbieri, 2014; Committee on Gynecologic Practice & ASRM, 2019). Um outro marcador da reserva ovárica é a determinação dos níveis de AMH (Hormona Anti-Mülleriana). A AMH é uma hormona produzida pelas células da granulosa dos folículos pré-antrais. Os valores de AMH são mantidos relativamente estáveis ao longo de todo o ciclo menstrual. Desta forma, a AMH pode ser avaliada em qualquer altura do ciclo (Roux *et al.*, 2012; Committee on Gynecologic Practice & ASRM, 2019). Para avaliação da cavidade uterina e patência das trompas de Falópio, pode ser realizada uma histerossalpingografia (HSG). Esta técnica consiste na introdução de um contraste pelo canal cervical, que permite visualizar a passagem do fluido pela cavidade uterina e trompas. Caso o líquido não progrida, é indicativo de uma obstrução tubar (Baramki, 2005; Roux *et al.*, 2012). Para além da HSG, também pode ser realizada uma histerossonossalpingografia, onde o conceito é igual, mas é realizada sob ecografia e não pela emissão de raio-X (Maheux-Lacroix *et al.*, 2014). Para estudo da cavidade uterina pode ser realizada uma histeroscopia, que consiste na introdução de um histeroscópio, que contém uma câmara para visualização da cavidade (Emanuel, 2013). A laparoscopia, outra técnica utilizada para a avaliar a cavidade uterina, para além, de uma carater diagnóstico possui um caráter terapêutico, quando necessário. Devido à índole invasiva e dispendiosa desta técnica, a laparoscopia deve ser aplicada, apenas em última necessidade.

Nos casos em que se desconfie de uma anomalia endócrina, ao nível do funcionamento da tiroide ou produção de prolactina, pode ser pedido a determinação dos níveis de TSH (Hormona Estimulante da Tiroide) e prolactina (Roux *et al.*, 2012)

2.2.2 Avaliação do Fator Masculino

A história clínica masculina deve abordar o desenvolvimento masculino, como malformações congénitas dos genitais, criptorquidismo, atraso da puberdade, presença de orquite. As funções erétil e ejaculatória também deverão ser abordadas durante a avaliação da infertilidade (Roux *et al.*, 2012).

O espermograma é o exame de eleição para o diagnóstico da infertilidade masculina, e será abordado de forma mais pormenorizada na Secção 3.2 (Bayer & Alper, 2007). Caso o paciente possua parâmetros alterados, infertilidade idiopática e persistente, este é encaminhado para consulta de especialidade, para um estudo mais aprofundado (Sharlip *et al.*, 2002).

Durante a avaliação do fator masculino, pelo médico especialista, deve-se proceder à realização de um exame físico geral, mas com especial importância à genitália, incluindo o pénis, palpação dos testículos e observação do seu tamanho e consistência, a presença dos vasos deferentes, verificar o tamanho, textura, posição e orientação dos epidídimos, presença de varicocele, e por fim, realizar uma observação atenta sob as características sexuais secundárias (Sharlip *et al.*, 2002; Roux *et al.*, 2012).

Para além disso, também é aconselhável a realização de um novo espermograma, 2 a 4 semanas depois da primeira análise, caso os parâmetros avaliados se encontrem alterados. A repetição do exame é importante já que ocorre uma variabilidade normal nos parâmetros espermáticos, ao longo do tempo. A observação de um determinado parâmetro anormal pode ser explicativa de um evento pontual, stressante, como por exemplo um estado febril, que pode ter ocorrido 2 a 3 semanas antes da realização do exame, que perturbou o normal funcionamento da espermatogénese (Bayer & Alper, 2007; World Health Organization, 2010). Para além da repetição do espermograma, pode também ser aconselhável a indicação para a realização de outros testes de avaliação complementares, nomeadamente a avaliação endócrina, onde devem ser verificados os valores de FSH e testosterona. Em casos mais específicos devem ser também avaliados os níveis de LH e prolactina (Sharlip *et al.*, 2002).

Por vezes, é aconselhável a realização de um estudo genético, principalmente se o paciente não possuir espermatozoides no ejaculado ou possuir um número muito reduzido (McLaren, 2012). Podem ser realizados testes mais específicos para identificação da causa de infertilidade, como a quantificação de leucócitos, testes de

anticorpos anti-espermatozoides, testes de vitalidade, fragmentação de DNA, e estudo de cariótipo (Sharlip *et al.*, 2002).

2.3 Causas de infertilidade

Existem inúmeros fatores que poderão contribuir para a infertilidade de um indivíduo. A origem explicativa da infertilidade é, normalmente, categorizada em não patológica ou patológica, feminina e ou masculina. Também pode estar relacionada com o estilo de vida dos indivíduos, ou em alguns casos possuir um cariz idiopático.

2.3.1 Fatores não-patológicos

O fator mais premente que influencia a probabilidade de um casal conceber naturalmente ou, mesmo recorrendo a técnicas de PMA, é a **idade** da mulher. Este tornou-se um problema recorrente, já que, nas últimas décadas, a idade média de procriação, especialmente, nas sociedades ocidentais tem vindo a aumentar. Paralelamente, a este aumento, a idade do primeiro filho nunca foi tão tardia, como a observada nos últimos anos (Balasch & Gratacós, 2012). Este adiamento na maternidade está, maioritariamente, associado a mudanças de estilos de vida, a fatores sociológicos, de progressão na carreira e melhoria das habilitações académicas. O problema que surge com o adiamento da maternidade é que a partir dos 25-30 anos de idade, verifica-se uma diminuição gradual da quantidade e qualidade ovocitária, assim como da função uterina (Committee on Gynecologic Practice of American College of Obstetricians and Gynecologists & Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, 2008). Com o avançar da idade, há uma maior probabilidade da ocorrência de erros durante a meiose, levando a uma errada segregação dos cromossomas. Como consequência os ovócitos e futuros embriões terão maiores taxas de anomalias cromossómicas, que explicam o aumento das taxas de abortamento espontâneo em idades avançadas. Em mulheres com idade superior a 40 anos, a taxa de incidência de aneuploidias é superior a 60% (Bayer, 2007). Paralelamente, a recetividade do útero também sofre uma diminuição, mais acentuadamente a partir dos 45 anos, onde são observadas menores taxas de implantação e gravidez e aumento da taxa de abortamento em ciclos onde a mulher recorre a doação de ovócitos (boa qualidade embrionária) (Soares *et al.*, 2005). Muitas mulheres ignoram as consequências que os atrasos na procriação podem envolver, pois falsamente acreditam que os avanços na área de PMA podem compensar o declínio da fertilidade

associado à idade. Contudo, as taxas de sucesso recorrendo a tratamentos de PMA, também diminuem com o avançar da idade (Balasch & Gratacós, 2012).

Relativamente, aos homens, a fertilidade masculina sofre um decréscimo a partir dos 40 de idade, mas não tão acentuada, como no caso feminino. Segundo a literatura, é possível afirmar que com o aumento da idade, existe uma diminuição do volume, motilidade e morfologia espermática, provavelmente, porque parece existir uma diminuição dos níveis de testosterona, a partir dos 40 anos de idade. Verifica-se também um aumento da fragmentação de DNA e maior incidência de anomalias cromossómicas (Kühnert & Nieschlag, 2004; Bayer, 2007; Eisenberg & Meldrum, 2017).

A **periodicidade e frequência das relações sexuais** é outro fator a ter em atenção. O estabelecimento de uma gravidez depende de inúmeros fatores, dos quais se destaca o momento da relação sexual, que tem de coincidir com o momento da ovulação. A identificação da “janela de fertilidade” no ciclo menstrual, é essencial para que os casais que desejam engravidar, tenham conhecimento da altura ideal para terem relações sexuais. Uma alternativa à identificação da janela fértil, é ter relações sexuais frequentes, 2 a 3 vezes por semana, ao longo de todo o ciclo menstrual, de modo a maximizar as hipóteses de gravidez (Stanford *et al.*, 2002; Bayer, 2007).

2.3.2 Fatores patológicos

2.3.2.1 Fatores Femininos

As **disfunções ovulatórias** são a causa mais comum de infertilidade feminina, atingindo cerca de 30% das mulheres inférteis. As disfunções ovulatórias incluem um conjunto de perturbações na função ovárica, que podem provocar ciclos irregulares e anovulação (Hamilton-Fairley & Taylor, 2003). A anovulação tem diversas origens, como o hipogonadismo hipogonadotrófico (HH), hiperprolactinemia, síndrome do ovário poliquístico (SOP), falência ovárica prematura, amenorreia hipotalâmica. O HH é caracterizado por uma falha no normal funcionamento da hipófise, que leva uma baixa concentração de LH e FSH e, conseqüentemente, de estradiol. A origem desta patologia pode ser devida ao exercício físico excessivo, IMC (índice de massa corporal) baixo, ou devido à presença de um tumor (Hamilton-Fairley & Taylor, 2003). A hiperprolactinemia pode ter origem num adenoma da hipófise ou devido a um bloqueio ou na produção ou envio da dopamina e é caracterizada por níveis elevados de prolactina na corrente sanguínea. Os níveis elevados de prolactina, inibem a produção de GnRH, que por sua vez, inibe a produção de LH e FSH que irão atuar ao nível do ovário, e por isso, não ocorre recrutamento, desenvolvimento folicular e nem ovulação (Hamilton-Fairley &

Taylor, 2003). A administração de agonistas da dopamina consiste no tratamento de primeira linha (Unuane *et al.*, 2011). O SOP é a causa mais comum de disfunção ovulatória (Hamilton-Fairley & Taylor, 2003). A SOP é uma doença endócrina, caracterizada por hiperandrogenismo (excesso de androgénios) e pela presença de um elevado número de folículos pré-antrais. Contudo, este elevado número de folículos não responde de forma normal à FSH e o desenvolvimento de um folículo dominante é raramente conseguido. A obesidade é um fator de risco para o desenvolvimento deste síndrome (Hamilton-Fairley & Taylor, 2003; Azziz *et al.*, 2016). Os tratamentos podem estar associados, à diminuição do peso, à administração de antagonistas de estrogénio de modo a auxiliar a estimulação da ovulação. Também é possível recorrer à fertilização *in vitro*, contudo é necessário ter em atenção que ao estimular a ovulação, incorre um maior risco de desenvolver síndrome de hiperestimulação ovárica (Unuane *et al.*, 2011). A falência ovárica prematura (FOP) é uma condição irreversível, onde os ovários deixam de funcionar antes da idade esperada de menopausa (<40 anos). Mulheres diagnosticadas com esta patologia apresentam amenorreia, níveis elevados de FSH, níveis de estrogénios diminuídos e AMH diminuída. As possíveis causas são: anomalias genéticas, fatores hereditários, fatores ambientais, distúrbios imunológicos. A quimioterapia na região pélvica é frequentemente seguida de FOP, já que estes tratamentos são gonadotóxicos. Nestas situações é aconselhável a criopreservação de gâmetas ou de tecido ovárico (Rebar, 2009; Unuane *et al.*, 2011). A amenorreia hipotalâmica é uma patologia que resulta de uma alteração do padrão normal pulsante de secreção de GnRH pelo hipotálamo, resultando num mau funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-ovário que culmina na ausência de ovulação e amenorreia. Esta patologia pode ser provocada por causas funcionais, como exercício físico excessivo, défice nutricional, por causas fisiológicas, como a amamentação, associada a doenças psiquiátricas, como a anorexia ou bulimia, e por fim, associada a anomalias anatómicas ou anomalias no eixo hipotalâmico-hipófise (Unuane *et al.*, 2011).

Cerca de 30% a 35% das causas de infertilidade feminina estão associadas a **fatores tubo-peritoneais**. A causa mais prevalente de alterações anatómicas tubárias é a doença inflamatória pélvica (DIP), que pode afetar vários locais da trompa de Falópio, A lesão tubária causada pela DIP provoca inflamação e, conseqüentemente, pode provocar alterações tubárias como, obstrução tubária e hidrossalpinge (dilatação das trompas de Falópio em reação a uma infeção) (Dun & Nezhat, 2012). Para além desta patologia, outras causas podem influenciar a função tubar, como malformações congénitas, endometriose, aborto séptico, cirurgia pélvica e doenças sexualmente

transmissíveis (Kodaman *et al.*, 2004). A endometriose é uma doença inflamatória crónica, definida pela presença de tecido endometrial ectópico, que provoca uma reação inflamatória crónica e formação de aderências. A endometriose tem uma prevalência de 6 a 10% da população feminina mundial. Cerca de 25 a 50 % das mulheres inférteis são diagnosticadas com endometriose (Bulletti *et al.*, 2010; Giudice, 2010). Este tecido endometrial fora do útero, é igualmente sensível às hormonas ováricas, provocando uma resposta inflamatória. Esta resposta é acompanhada por angiogênese, aderências, fibrose, cicatrizes e distorção anatómica provocando dor e por vezes, infertilidade, caso este tecido esteja alocado numa região do trato reprodutor feminino, que impeça a o transporte de gâmetas e ou do embrião (Bulletti *et al.*, 2010). O tratamento consiste em terapia médica, com a administração hormonal ou cirúrgica com a remoção do tecido, por laparoscopia ou ambas (Giudice, 2010). Outras possíveis causas incluídas no fator tubar são as cicatrizes resultantes de cirurgias abdominais e pélvica, e a presença de miomas nas trompas de Falópio, provocando um bloqueio da mesmas (Dun & Nezhat, 2012).

O **fator cervical** representa apenas 5% das causas que afetam a fertilidade feminina. Alterações estruturais e de composição do muco cervical podem impedir a passagem dos espermatozoides pelo canal cervical até às trompas de Falópio. As características do muco são hormono-dependentes, e existe uma fase no ciclo ideal para a passagem dos espermatozoides. No período anterior à ovulação, com a elevada quantidade de estrogénios, o muco encontra-se fino e aquoso, o que facilita a passagem dos espermatozoides pelo canal cervical. Pelo contrário, no início da fase folicular, com níveis baixos de estrogénio e durante a fase lútea, com a progesterona a neutralizar os efeitos das concentrações de estrogénio, o muco é espesso. Desta forma, se as relações sexuais ocorrerem durante estas fases, os espermatozoides são incapazes de penetrar a malha de muco espesso, impossibilitando o sucesso da fecundação e gravidez (Bayer & Alper, 2007).

A infertilidade feminina pode ser causada por um **fator uterino**. Este pode ter uma origem congénita ou adquirida (Hatasaka, 2011). Durante o desenvolvimento embrionário, ocorre o processo de diferenciação dos ductos e desenvolve-se os canais de Muller, que darão origem às trompas de Falópio, útero e parte superior da vagina, através de um conjunto complexo de transformações. Caso ocorra alguma falha durante a diferenciação, culminará numa anomalia congénita (Hur *et al.*, 2019). Relativamente, ao fator uterino adquirido este pode ser causado pela presença: de pólipos, fibroides uterinos, adenomiose (Hur *et al.*, 2019). Estas alterações podem provocar infertilidade,

devido à formação de uma obstrução que impede a passagem dos espermatozoides, ou a implantação, ou o desenvolvimento fetal.

Por fim, a condição **genética** desempenha, também, um papel importantíssimo na fertilidade feminina. Desde anomalias cromossómicas numéricas, estruturais, mutações genéticas, no DNA mitocondrial e as alterações epigenéticas podem interferir com o normal funcionamento do sistema reprodutor feminino e provocar um estado de infertilidade (The ESHRE Capri Workshop Group, 2008). As alterações cromossómicas numéricas mais comumente observadas são o Síndrome de Turner (45, X0), que devido ao subdesenvolvimento do ovário, resulta em amenorreia ou falência ovárica primária (Hamilton-Fairley & Taylor, 2003; Zorrilla & Yatsenko, 2013); e o síndrome de 47,XXX (trissomia do X), que pode provocar insuficiência ovárica prematura e malformações no trato genital (Zorrilla & Yatsenko, 2013).

2.3.2.2 Fatores Masculinos

Aproximadamente, 20% da infertilidade masculina pode ser explicada por um fator endócrino. Qualquer anomalia presente no eixo hipotálamo-hipófise-testículos possui um impacto negativo da fertilidade masculina. O síndrome de *Kallmann* é caracterizado por uma mutação genética que provoca uma deficiente secreção de GnRH. Estas patologias podem ser tratadas através de uma terapia de substituição hormonal (Brugh & Lipshultz, 2004). Também se pode verificar hiperprolactinemia no sexo masculino, associado a tumores hipofisários. A prolactina elevada vai perturbar a libertação de GnRH, tendo impacto em todo o eixo hipotálamo-hipófise-gónada (Brugh & Lipshultz, 2004). Outra anomalia endócrina é a deficiente produção de GnRH e conseqüentemente, LH e FSH, patologia designada por hipogonadismo hipogonadotrófico (HH). O HH adquirido pode ser causado pelo desenvolvimento de tumores, infeções, afetando a produção de hormonas pela hipófise ou hipotálamo (Krausz, 2011).

Podem ocorrer vários tipos de alterações genéticas, como anomalias cromossómicas numéricas e estruturais, mutações ou deleções de áreas específicas de um cromossoma que interferem na fertilidade masculina (Brugh & Lipshultz, 2004). O síndrome de Klinefelter (47,XXY) é uma aneuploidia que provoca falência e atrofia testicular, associado a concentrações elevadas das hormonas gonodotróficas (Asero *et al.*, 2014). Homens com este síndrome são azoospérmicos ou possuem uma oligozoospermia severa (Brugh & Lipshultz, 2004). O cromossoma Y possui um papel importantíssimo na função reprodutiva masculina. A região SRY (*sex-determining region Y*) é a que leva à

determinação testicular no início da embriogénese. A integridade na região AZF (*azoospermic factor*) localizada no braço longo do cromossoma Y é essencial para o normal funcionamento da espermatogénese. Microdeleções nestas regiões estão associadas a quadros de infertilidade, já que estes genes codificam proteínas relacionadas com a regulação da espermatogénese. Cerca de 4% dos homens com oligozoospermia possuem microdeleções na região AZF, e esta incidência sobe para 18% no caso de homens azoospermicos. Caso um indivíduo seja diagnosticado com uma anomalia genética deve ser encaminhado para uma consulta de aconselhamento genético antes de nova tentativa de uma gravidez (Brugh & Lipshultz, 2004; Krausz, 2011).

O uso de esteroides anabolizantes, como outro tipo de medicação, pode resultar em oligozoospermia e em alguns casos, azoospermia, devido à supressão da produção de testosterona endógena (Bayer & Alper, 2007). A reversibilidade dos efeitos prejudiciais estão dependentes da dose e duração do uso dos esteroides (Brugh & Lipshultz, 2004).

O **varicocelo** é a causa mais comum de infertilidade masculina. O varicocelo é definido como um refluxo venoso, que resulta numa dilatação das veias do cordão espermático. Este refluxo leva a um aumento da temperatura escrotal, que prejudica a normal função da espermatogénese e pode causar um aumento de produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), aumentando os níveis de stress oxidativo. O stress oxidativo também possui um grande impacto nas células da linha germinativa, podendo induzir a apoptose. O diagnóstico pode ser realizado por palpação da zona escrotal. O tratamento eleito é a realização de uma varicocelectomia, que melhora os parâmetros e função espermática, e leva a *outcomes* positivos no atingir de uma gravidez (Jarow, 2001; Jensen *et al.*, 2017).

Uma **obstrução** no sistema de ductos do aparelho reprodutor masculino, pode impedir/limitar a passagem dos espermatozoides e por isso diminuir a fertilidade do indivíduo. Os pacientes podem sofrer de uma patologia denominada de ausência bilateral congénita dos vasos deferente (CBAVD), caracterizada por um desenvolvimento inadequado dos vasos deferentes e ausência de vesículas seminais. Homens com CBAVD possuem um baixo volume seminal, pH ácido e ausência de espermatozoides no ejaculado. Certos procedimentos cirúrgicos na região pélvica ou inguinal podem resultar numa lesão e obstrução dos canais deferentes. Nestes casos os pacientes podem ser submetidos a uma reconstrução cirúrgica, permitindo a conceção natural, ou os espermatozoides podem ser recolhidos diretamente dos testículos ou epidídimos (Brugh & Lipshultz, 2004; Krausz, 2011).

O **criptorquidismo** é uma condição na qual um testículo ou o 2 testículos não descem totalmente para a posição escrotal. Esta patologia pode ser solucionada através de uma orquidopexia. Esta cirurgia deve ser realizada no primeiro ano de vida, de modo a minimizar os efeitos que conferem infertilidade. Contudo, a função testicular pode permanecer alterada, devido à deficiente maturação das células germinativas (Cendron *et al.*, 1989).

A infertilidade masculina pode ser causada por **distúrbios na ejaculação**. O processo de ejaculação está dependente do controlo do sistema nervoso central e periférico. Distúrbios na ejaculação podem estar associados a causas neurológicas, condições psicológicas ou a anomalias anatómicas. Lesões no sistema nervoso central, como a lesão da medula espinal podem impedir o processo ejaculatório. Neste caso, é possível recorrer a uma estimulação vibratória ou eletroejaculação para se obter uma amostra espermática. Alguns medicamentos também podem afetar o processo de ejaculação, como a toma de antidepressivos e antipsicóticos (Brugh & Lipshultz, 2004). A **ejaculação retrógrada** caracteriza-se por uma anomalia anatómica no esfíncter da uretra, que obriga ao refluxo do sémen em direção à bexiga. A ejaculação retrógrada pode ser congénita ou adquirida, devido a uma condição médica, cirurgia ou lesão traumática (Aust & Lewis-Jones, 2004). O diagnóstico é alertado, quando se verifica um baixo volume espermático, aliado a uma baixa concentração ou ausência de espermatozoides, ou quando o orgasmo não é acompanhado pela ejaculação. O diagnóstico é confirmado pela presença de espermatozoides na urina pós-ejaculação (Aust & Lewis-Jones, 2004; Jefferys *et al.*, 2012). O tratamento pode ser realizado através de medicação ou cirurgia. De modo a, ultrapassar o problema de infertilidade, também é possível recuperar os espermatozoides viáveis da urina, e após processamento das amostras a nível laboratorial, realizar uma FIV ou ICSI (Jefferys *et al.*, 2012). Quando não é possível a recolha de espermatozoides viáveis para tratamento, pode-se realizar a recuperação dos espermatozoides diretamente dos testículos, já que nunca contactaram com as substâncias tóxicas presentes na urina (Aust & Lewis-Jones, 2004).

Por vezes, verifica-se no esperma a presença de **anticorpos anti-espermatozoides**, maioritariamente, associados a homens que sofreram uma vasectomia ou infeções. A presença de anticorpos anti-espermatozoides diminui o potencial de fertilidade do indivíduo, já que leva a formação de fenómenos de aglutinação que vão impedir a motilidade espermática, limita a penetração dos espermatozoides pelo muco cervical, a reação acrossómica e a ligação à zona pelúcida do ovócito (Brugh & Lipshultz, 2004).

2.3.3 Estilos de Vida como Fator de Infertilidade

Atualmente, existe uma série de fatores ambientais e comportamentais que possuem um papel preponderante na fertilidade dos casais, com diferentes consequências no desempenho reprodutivo. Nomeadamente, consumo de álcool, tabaco, drogas, a obesidade, exposição contínua a substâncias tóxicas e radiações.

- Obesidade:

A obesidade é uma doença cada vez mais comum nas sociedades atuais. O excesso de peso, para além de, estar relacionado com um aumento de risco de desenvolvimento de determinadas doenças crónicas, também afeta a saúde reprodutiva dos indivíduos (Nguyen *et al.*, 2007), interferindo nos seus sistemas hormonais e metabólicos. Casais que padeçam desta condição médica, com dificuldade a engravidar são aconselhados a perder peso, já que alguns dos efeitos adversos poderão ser reversíveis (Nguyen *et al.*, 2007; Dondorp *et al.*, 2010).

A obesidade feminina pode levar a um funcionamento deficiente do eixo hipotálamo-hipófise-ovário, diminuição da qualidade ovocitária e menor recetividade do endométrio (Talmor & Dunphy, 2015). A obesidade tem vindo a ser associada a uma maior probabilidade de desenvolver a síndrome do ovário poliquístico (Dondorp *et al.*, 2010; Talmor & Dunphy, 2015). Para além das taxas de gestação espontânea de mulheres obesas serem significativamente inferiores, as taxas de sucesso dos tratamentos de infertilidade, recorrendo a técnicas de PMA, também diminuem nesta condição. Quando comparado mulheres com IMC normal, com mulheres obesas, é notório que, estas últimas necessitam de uma maior dosagem de gonadotrofinas em ciclos de tratamento, que a probabilidade de engravidar diminui e que ocorre um aumento das taxas de abortamento (Dondorp *et al.*, 2010). Quanto à obesidade masculina, embora não tão estudada quanto a feminina, é possível afirmar que, quando presente, está associada a um desequilíbrio hormonal, podendo ocorrer uma diminuição da concentração de testosterona, levando a uma menor taxa de produção espermática, aumento da temperatura escrotal, associada a uma maior probabilidade de desenvolver uma disfunção erétil (Dondorp *et al.*, 2010).

- Hábitos tabágicos

O consumo de tabaco está associado à infertilidade, devido à vulnerabilidade da gametogénese, quando exposta às substâncias químicas tóxicas presentes no tabaco.

Estas parecem perturbar o normal funcionamento do fuso meiótico, levando a um maior risco da ocorrência de anomalias cromossómicas (Dondorp *et al.*, 2010).

Em mulheres fumadoras, é possível assistir a uma redução da idade da menopausa, entre 1 a 4 anos, relativamente às não fumadoras. Os níveis de AMH são mais baixos em mulheres fumadoras e a concentração de FSH mais elevada. Tais factos, são sugestivos de que, fumar acelera o esgotamento folicular ovárico e é tóxico para os ovários (Bayer & Alper, 2007; Practice Committee of the ASRM, 2018). Tudo indica que mulheres fumadoras estão associadas a maior predisposição de abortamentos espontâneos, complicações placentárias, gravidez ectópica e morte neonatal precoce (Dondorp *et al.*, 2010; Practice Committee of the ASRM, 2018). Relativamente, às taxas de sucesso em PMA, é estimado que mulheres fumadoras necessitam do dobro de ciclos até alcançarem uma gravidez, em comparação com mulheres não fumadoras (Dondorp *et al.*, 2010). Para além disso, necessitam de uma maior dosagem de gonadotrofinas para o sucesso da estimulação folicular (Practice Committee of the ASRM, 2018). Relativamente, aos homens fumadores, a qualidade e concentração espermática são inferiores. O seu consumo, está, também, associado ao aumento da fragmentação de DNA espermático. Caso o consumo seja cessado, estima-se que os efeitos podem ser revertidos após um ano (Dondorp *et al.*, 2010).

- Consumo de álcool

O elevado consumo de álcool conduz a uma anovulação, uma diminuição da taxa de implantação, disfunção da fase lútea e potencial desenvolvimento embrionário anómalo. Estudos revelam que estes efeitos podem estar associados a alterações hormonais, já que o consumo de álcool leva a um aumento da concentração de estrogénios, que consequentemente reduzem os níveis de FSH, suprimindo o desenvolvimento folicular e ovulação (Sharma *et al.*, 2013). O álcool é conhecido por ser uma substância teratogénica, levando a um anormal desenvolvimento embrionário e fetal (Sharma *et al.*, 2013). O consumo de álcool afeta negativamente a fertilidade masculina, exercendo efeitos adversos no metabolismo da testosterona, induzindo níveis abaixo do normal, níveis de FSH e LH elevados, e consequentemente uma deficiente espermatogénese. O volume do sêmen, a concentração espermática, e o número de espermatozoides morfológicamente normais são significativamente menores (Sansone *et al.*, 2018). Nos homens, o consumo excessivo de álcool pode ainda levar a atrofia testicular e diminuição da libido (Sharma *et al.*, 2013).

- Consumo de drogas

O consumo de marijuana, no homem, está associado a perturbações no eixo hipotálamo-hipófise-gónada, na espermatogênese, na motilidade, e na reação acrossómica (Plessis *et al.*, 2015). O canábis também influencia a saúde reprodutiva, já que induz alterações nos parâmetros espermáticos, com redução da concentração, aumento de anomalias morfológicas dos espermatozoides, redução de motilidade e viabilidade espermática, e inibe a capacidade de fertilização dos espermatozoides (Payne *et al.*, 2019).

- Consumo de cafeína

Os estudos sobre consumo de cafeína associado a uma diminuição da fertilidade, são ainda inconclusivos. Contudo, a sua ingestão excessiva parece provocar danos no DNA dos espermatozoides e por isso pode afetar a função reprodutiva masculina (Ricci *et al.*, 2017). Existem também estudos em que o consumo excessivo tem efeitos negativos na fertilidade feminina, estando associado a um aumento do período de gestação e uma maior probabilidade de abortamento espontâneo e morte fetal (Sharma *et al.*, 2013).

- Exposição a substâncias tóxicas e radiações

Durante a vida quotidiana, o ser humano está exposto a inúmeras ameaças à sua saúde reprodutiva. O meio laboral ou o meio envolvente podem expor o ser humano a agentes tóxicos, a metais pesados e pesticidas, que conduzem a uma diminuição da saúde reprodutiva e diminuição da fertilidade. Homens que desempenhem funções em regiões agrícolas, estufas, devido à exposição a pesticidas, possuem uma maior incidência de oligozoospermia. Homens que trabalhem na indústria, podem estar expostos a metais pesados e outros compostos tóxicos, que podem estar associados a quadros de astenozoospermia e teratozoospermia. Também a exposição a radiação (raios-X e raios-γ) tem um efeito prejudicial nas células do corpo humano, nomeadamente, nas células da linha germinativa e nas células de *Leyding*. Os efeitos nocivos causados são dependentes da dose e poderão mesmo causar esterilidade permanente (Sharma *et al.*, 2013).

2.3.4 Infertilidade idiopática

Em cerca de 30% dos casais inférteis, não lhes é diagnosticada uma causa aparente, que explique a origem da infertilidade, a denominada **infertilidade idiopática**. Este estado é caracterizado com uma aparente ausência de alteração nos exames base, como testes de ovulação, permeabilidade tubar, espermograma, entre outros. Para muitos casais o diagnóstico de infertilidade idiopática pode ser muito frustrante, já que, este

termo está associado à dificuldade de indicação de um tratamento direcionado para a resolução da infertilidade. O diagnóstico padrão não faz uma avaliação completa das possíveis causas de infertilidade. Há vários exames que não são avaliados por rotina ou porque ainda não existem (Ray *et al.*, 2012). A disponibilidade de recursos, a idade do casal, assim como, o número de anos de infertilidade, devem ser considerados para a escolha do tratamento, que pode ser mais eficaz. A literatura atual sugere que se inicie os tratamentos com progressão na sua complexidade. Como tratamentos mais simples e baratos é possível recorrer a administração de citrato de clomifeno, para indução da ovulação, inseminação intrauterina, mas os tratamentos com maior sucesso são a FIV e a ICSI (Ray *et al.*, 2012). Através da realização de uma FIV ou ICSI, certas formas de infertilidade podem ser facilmente superadas, como disfunções ováricas, alterações na função tubar e cervical, e determinados fatores masculinos não detetáveis por um espermograma (ESHRE Capri Workshop Group, 2017).

3. Laboratório de Andrologia

Neste capítulo serão abordados os vários termos relacionados com os procedimentos realizados num laboratório de andrologia, onde estão incluídos os métodos de recolha da amostra seminal, espermograma e métodos de processamento espermático para uso em técnicas de PMA, como a inseminação intrauterina, a fertilização *in vitro* e a injeção intracitoplasmática de espermatozoide.

3.1 Métodos de recolha da amostra seminal

A recolha da amostra seminal pode ter um cariz de diagnóstico ou ter como finalidade a utilização em ciclo de PMA. O método de eleição para a colheita da amostra seminal é a masturbação. A amostra deverá ser colhida numa sala privada, próxima do laboratório de andrologia, à temperatura ambiente, com o intuito de evitar flutuações de temperatura. A colheita da amostra deve ser realizada para um recipiente, previamente identificado, estéril de plástico, não tóxico para os espermatozoides. O paciente deverá ser informado, oralmente ou por escrito, dos cuidados a ter no decorrer da colheita. É essencial o registo do paciente, por parte da clínica, onde deve constar o nome do indivíduo, o período de abstinência, a data, a hora, e o local de colheita. Aquando a marcação do exame, o paciente deve ser informado do período de abstinência, que deve cumprir. Este deve compreender entre no mínimo 2 dias e no máximo 1 semana (World Health Organization, 2010). É de extrema importância o cumprimento do período de abstinência, já que períodos mais longos levam a uma diminuição da motilidade e aumento da fragmentação de DNA, mas a um maior volume seminal e concentração espermática, enquanto que, períodos mais curtos resultam numa diminuição de volume e concentração espermática. Contudo, períodos mais curtos estão associados a melhor motilidade e morfologia espermática, assim como, uma menor presença de espermatozoides com DNA fragmentado (Brugh & Lipshultz, 2004; Majzoub *et al.*, 2020; Baskaran *et al.*, 2021).

Caso ocorra perda de ejaculado durante a colheita, ou outras eventualidades incomuns, estas devem ser transmitidas e registadas. A ejaculação masculina é constituída por 3 fases: a pré-ejaculatória, que não contém espermatozoides e resulta das secreções da glândulas de *Cowper*; a primeira fração ejaculatória, com uma representatividade de 15 a 45% do total da ejaculação, constituindo a fração com maior quantidade de espermatozoides e contém secreções dos epidídimos e prostáticas; a segunda fração ejaculatória apresenta uma baixa concentração espermática, contendo secreções

principalmente oriundas das vesículas seminais (Hebles *et al.*, 2015). Desta forma, perder a primeira fração do ejaculado pode ter um grande impacto nos resultados durante a análise espermática e resultar numa falsa avaliação (World Health Organization, 2010).

Em casos excepcionais, a colheita poderá ser realizada fora das instalações da clínica, com o compromisso que a amostra deverá ser entregue ao laboratório num período máximo de 1 hora, após a ejaculação. Para além disso, a amostra deve ser mantida à temperatura corporal, para não afetar a qualidade espermática. O paciente deve ser alertado de todos os procedimentos a cumprir, sob a forma de um consentimento informado (World Health Organization, 2010).

Quando não é possível realizar a colheita da amostra seminal via masturbação, é possível realizá-la através da utilização de um preservativo não tóxico, sem espermicidas, próprios para a recolha de esperma, via ato sexual. Não podem ser utilizados preservativos comuns de látex, já que estes possuem na sua constituição substâncias nocivas para os espermatozoides, que interferem com a sua motilidade. O coito interrompido não pode ser usado como método de colheita, uma vez que, a primeira fração de sémen, onde existe uma elevada concentração de espermatozoides pode ser perdida. Para além disso, existe o risco crescente de contaminação da amostra espermática com células e bactérias típicas da flora vaginal, e a motilidade espermática poderá ser afetada pelo pH ácido vaginal (World Health Organization, 2010).

Em casos mais extremos, como no caso de pacientes com azoospermia, devido à ausência de espermatozoides no ejaculado, foram desenvolvidos métodos cirúrgicos para recuperação de espermatozoides, diretamente, dos epidídimos ou dos testículos. Os métodos de recolha via epidídimos são designados por: MESA (*Microsurgical Epididimal Sperm Aspiration*) e PESA (*Percutaneous Epididimal Sperm Aspiration*). A MESA consiste na aspiração do fluido dos epidídimos através de uma pequena incisão na parte superior da região do epidídimo, com o auxílio de um microscópio cirúrgico. Relativamente, à PESA, esta consiste na palpação da região do epidídimo, para perfuração, percutaneamente, com uma agulha fina, seguido de aspiração do conteúdo do epidídimo. Este método pode alcançar vários tubos, que pode danificar a estrutura, já que se trata de um procedimento feito “às cegas” (Shin & Turek, 2013).

Também podem ser recuperados espermatozoides a partir dos testículos. Para tal, existem 2 procedimentos cirúrgicos, a TESA (*Testicular Sperm Aspiration*) e a TESE (*Testicular Sperm Extration*). A TESA consiste na inserção de uma agulha em direção

ao parênquima testicular, através da pele escrotal. É aplicada pressão negativa para aspiração do conteúdo testicular (Shin & Turek, 2013; Bormann, 2014). A TESE é um método de cirurgia aberta, por isso mais invasiva, que consiste na remoção de várias porções, de vários locais, da polpa testicular. A procura de espermatozoides na polpa testicular é um procedimento trabalhoso que pode demorar várias horas, dependendo do grau de produção espermática e pode mesmo não ser encontrado nenhum espermatozoide (Bormann, 2014). Contudo, a TESE tem demonstrado maiores taxas de recuperação espermática que a técnica TESA (Shin & Turek, 2013). A TESE é a técnica mais recorrente, principalmente em casos de azoospermia não obstrutiva (Hwang *et al.*, 2012). Também é comum a utilização de TESE, quando o paciente é diagnosticado com uma elevada taxa de fragmentação de DNA no ejaculado. A fragmentação de DNA é formada durante a espermatogénese e durante o transporte dos espermatozoides ao longo do trato reprodutivo masculino. Segundo a literatura, a taxa de fragmentação é mais elevada no ejaculado, seguido do epidídimo, e por fim nos testículos, onde se registam taxas inferior de fragmentação de DNA (Moskovtsev *et al.*, 2010; Sakkas & Alvarez, 2010).

3.2 O Espermograma

A análise espermática reflete a função testicular da produção de espermatozoides e atividade das glândulas acessórias e permite avaliar a funcionalidade do sistema de ductos do trato reprodutor masculino (Baskaran *et al.*, 2021). O espermograma consiste numa avaliação de parâmetros tanto macroscópicos, como microscópicos, abordados na secção seguinte. Os valores obtidos durante a análise da amostra seminal são comparados com os valores de referência, determinados pelo manual da WHO de análise e processamento espermático, apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores mínimos de referência dos parâmetros analisados durante a análise espermática. Legenda: MP – Motilidade progressiva, MNP – Motilidade não progressiva. Aptado de World Health Organization (2010).

Parâmetro	Valor mínimo de referência
Volume	> 1,5 mL
pH	> 7.2
Concentração espermática	> 15.10 ⁶ epz/mL
Motilidade total (MP+MNP)	> 40%
Motilidade Progressiva	> 32%
Morfologia	> 4%
Vitalidade	> 58%
Leucócitos	< 1.10 ⁶

O espermograma é utilizado como ferramenta de diagnóstico de infertilidade masculina, mas também pode ser realizado para confirmação do sucesso de uma vasectomia, permitindo a avaliação da presença/ausência de espermatozoides no ejaculado (World Health Organization, 2010). O espermograma é o exame de eleição, já que, para além do seu poder diagnóstico, não é invasivo e é pouco dispendioso. Na Tabela 2, estão listados os possíveis diagnósticos resultantes da realização de um espermograma.

Tabela 2. Terminologia relativa à análise e qualidade espermática. No caso do indivíduo apresentar alterações em mais que um dos parâmetros, entre a oligozoospermia, astenozoospermia e astenozoospermia, deve ser usada uma nomenclatura combinada. No caso da combinação dos 3, o paciente é diagnosticado com oligoastenoteratozoospermia.

Terminologia	Significado científico
Normozoospermia	Todos os parâmetros analisados encontram-se de acordo com os valores de referência.
Aspermia	Ausência de ejaculado.
Oligozoospermia	Concentração espermática inferior à do valor mínimo de referência.
Criptozoospermia	Ausência de espermatozoides a fresco, mas observados após centrifugação.
Azoospermia	Ausência de espermatozoides no ejaculado e confirmada a ausência com a observação após centrifugação.
Astenozoospermia	% motilidade progressiva inferior ao nível mínimo de referência.
Teratozoospermia	% morfologia inferior ao valor mínimo de referência.
Hipospermia	Volume de ejaculado inferior a 1,5 mL.
Hematospermia	Presença de sangue no ejaculado.
Leucocitospermia	% leucócitos superior ao valor mínimo de referência.
Necrozoospermia	% vitalidade inferior ao valor mínimo de referência.

3.2.1 Análise macroscópica

Inicialmente, para a realização do espermograma é realizada uma análise macroscópica da amostra, com a avaliação dos seguintes parâmetros: liquefação, aparência visual, volume, viscosidade e pH. É essencial que a amostra seja analisada, no máximo 1 hora após a ejaculação, já que períodos superiores podem levar à modificação dos parâmetros da amostra, devido à desidratação, mudanças de temperatura e perdas de CO₂ (World Health Organization, 2010).

3.2.1.1 Liquefação

Imediatamente, após a ejaculação, a amostra seminal sofre o processo de coagulação devido à ação da vesiculase no fibrinogénio presentes no sémen. Em média, cerca de

15 min após a colheita, a amostra seminal completa a sua **liquefação**, à temperatura ambiente assumindo uma consistência fluida, devido à presença das protéases prostáticas que desfazem o coágulo, inicialmente, formado. Embora raro, este período pode estender-se até 1h. Caso, após 1h, a liquefação ainda não se encontre concluída, deve ser registado. Em alguns casos, o sémen liquefeito pode conter alguns grânulos com um aspeto gelatinoso, que não sofreram liquefação, mas não exercem qualquer impacto a nível clínico (World Health Organization, 2010). Uma amostra seminal aguada, isto é, com ausência de coagulação, pode indicar ausência do ducto ejaculatório ou das vesículas seminais. Pelo contrário, quando a liquefação é incompleta e apresenta coágulos, pode indicar alguma anomalia nas enzimas produzidas pela próstata (Silverberg & Turner, 2009).

3.2.1.2 Aparência visual

A **aparência** da amostra, é a primeira inspeção a ser realizada. Deve-se ter em atenção à cor e opacidade. Uma amostra seminal considerada normal é caracterizada por uma coloração cinza opalescente com uma aparência homogénea. Uma amostra com uma coloração translúcida é indicativa de que a concentração espermática é baixa ou nula. A amostra poderá ter uma cor acastanhada, devido à presença de sangue no ejaculado. Também é possível que a amostra apresente uma cor amarelada, o que é indicativo de icterícia ou devido à ingestão de determinadas vitaminas ou drogas (World Health Organization, 2010).

3.2.1.3 Volume

O **volume** da amostra seminal é, maioritariamente, resultante das secreções das vesículas seminais e próstata e em menor quantidade das glândulas bulbouretrais e epidídimos. O volume varia conforme os dias de abstinência sexual, isto é, quanto maior for o período de abstinência, maior o volume. A medição rigorosa do volume é essencial, já que permite calcular o número total de espermatozoides, assim como, de células redondas (World Health Organization, 2010). O volume da amostra seminal deve ser medido com o auxílio de uma pipeta serológica estéril graduada, com uma precisão de 0,1 mL. Um baixo volume (<1,5 mL) pode ser indicativo de uma obstrução do ducto ejaculatório, ou ausência congénita bilateral dos canais deferentes, ejaculação retrógrada ou hipogonadismo hipogonadotrófico. O baixo volume também pode estar associado a perda de uma porção seminal durante a colheita. Por outro lado, um volume elevado (>5 mL) poderá ser indicativo de uma inflamação nas glândulas acessórias (World Health Organization, 2010; Baskaran *et al.*, 2021).

3.2.1.4 Viscosidade

A **viscosidade** é determinada através da observação do fio de esperma formado através da aspiração da amostra com uma pipeta e posterior queda por gravidade. Uma amostra considerada normal, forma pequenas gotas discretas ao cair da pipeta. No caso de uma amostra com viscosidade aumentada, visualiza-se a formação de um fio com mais de 2 cm de comprimento. A viscosidade elevada também é identificada, quando há dificuldade em pipetar a amostra. É necessário ter em atenção que, a elevada viscosidade pode interferir com a determinação da motilidade espermática. Esta alteração é indicativa de uma disfunção ou infeção nas glândulas acessórias (World Health Organization, 2010; Baskaran *et al.*, 2021).

3.2.1.5 pH

O **pH** da amostra seminal reflete o balanço entre os valores de pH das secreções alcalinas das vesículas seminais e das secreções ácidas da próstata. A medição do pH é realizada através do contacto de uma amostra de sémen numa tira de pH, e posterior comparação da cor formada no papel com de cores de calibração para leitura do pH. Se o pH for inferior a 7, associado a um baixo volume e concentração espermática é sugestivo de obstrução do ducto ejaculatório ou ausência bilateral congênita dos canais deferentes (World Health Organization, 2010). Por outro lado, um pH mais alcalino pode estar associado a um atraso da análise (Baskaran *et al.*, 2021).

3.2.2 Análise microscópica

Depois de finalizada a análise macroscópica procede-se a análise microscópica, onde uma pequena alíquota de 10 µL é colocada numa câmara de *Makler* e é visualizada ao microscópio ótico com contraste de fase. Inicialmente deve-se realizar uma inspeção geral, numa ampliação de 100x (lente objetiva 10x, com lente ocular 10x), para visualização da formação de cordões mucosos, agregação ou aglutinação de espermatozoides. De seguida, a preparação deve ser observada numa maior ampliação, de 200x (objetiva de 20x e ocular de 10x), de modo a ser avaliada a motilidade e concentração espermática (World Health Organization, 2010).

3.2.2.1 Agregação e Aglutinação

Fenómenos de **agregação** são caracterizados pela aderência de espermatozoides a cordões de muco, a células não espermáticas ou a detritos. Este fenómeno não deve ser confundido, com os fenómenos de **aglutinação**. Estes são caracterizados pela

aderência entre espermatozoides móveis, cabeça a cabeça, cauda a cauda ou misto. É de salientar que este fenómeno dificulta a avaliação da motilidade, devido à limitação de movimento e concentração espermática. A aglutinação é sugestiva da presença de anticorpos anti-espermatozoides, sendo necessário mais exames para identificação de uma possível causa imunológica (World Health Organization, 2010; Baskaran *et al.*, 2021).

3.2.2.2 Concentração

A **concentração** espermática é definida como o número de espermatozoides por unidade de volume. A concentração permite o diagnóstico e ou prognóstico de doenças reprodutivas, e indicação para o tipo tratamento de PMA (Brito *et al.*, 2016). Apesar de apenas 1 espermatozoide fecundar o ovócito, é necessária uma elevada concentração, de modo a que, os espermatozoides conseguiram ultrapassar a barreira de muco e ascenderem até às trompas de Falópio. Para além disso, são necessários vários espermatozoides para quebrarem a camada de células em torno do ovócito através das enzimas presentes no acrossoma, até que apenas um penetre no citoplasma do ovócito (Sherwood, 2016). No caso de não ser encontrado qualquer espermatozoide na preparação, a amostra deve ser centrifugada e o *pellet* deve ser analisado, de modo a verificar se existem espermatozoides no volume total da amostra. Caso não seja encontrado nenhum espermatozoide, a amostra é considerada azoospérmica. Para cálculo da concentração devem ser contabilizados todos os espermatozoides presentes numa linha com 10 quadrados da câmara de *Makler*.

A concentração espermática e o número total de espermatozoides são conceitos distintos. O número total de espermatozoides é calculado multiplicando a concentração espermática pelo volume total da amostra (World Health Organization, 2010).

3.2.2.3 Motilidade

A **motilidade** espermática é um indicador do potencial de fertilidade dos espermatozoides, já que, para o sucesso da fertilização é necessária a penetração do muco cervical, transporte pelo trato genital feminino e penetração das células da *corona radiata* e zona pelúcida. Vários estudos demonstram uma correlação clara entre a percentagem de espermatozoides móveis e a taxa de fertilização *in vivo*. Uma percentagem superior a 40% é indicativa de um desenvolvimento normal do espermatozoides durante a espermatogénese, do sucesso de maturação dos espermatozoides nos epidídimos, assim como, de uma normal constituição do plasma

seminal. As causas de astenozoospermia estão relacionadas com o funcionamento anormal de um ou mais destes 3 passos inumerados (Nallella *et al.*, 2006).

Para uma correta avaliação da motilidade, no mínimo 200 espermatozoides deverão ser contabilizados. Anteriormente, o parâmetro da motilidade espermática era classificado em 4 categorias: motilidade progressiva rápida, motilidade progressiva lenta, motilidade não progressiva e imóvel. Contudo, devido à dificuldade de diferenciação dos tipos de motilidade pelos técnicos de laboratório, a classificação passou apenas a ser dividida em apenas 3 categorias: motilidade progressiva, motilidade não progressiva e imóveis. O espermatozoide é categorizado como tendo uma motilidade progressiva, quando apresenta um movimento ativo, quer de forma linear ou curvilíneo, independentemente da sua velocidade. Um espermatozoide com uma motilidade não progressiva, é um espermatozoide com ausência de progressão, onde se observa apenas uma batida flagelar em pequenos círculos. Quando se observa um espermatozoide sem qualquer tipo de movimento, classifica-se como imóvel (Roux *et al.*, 2012).

3.2.2.4 Vitalidade

Caso o valor da motilidade progressiva espermática seja inferior a 40%, é necessário realizar um teste de **vitalidade** (Roux *et al.*, 2012). A vitalidade espermática reflete a proporção de espermatozoides vivos através da avaliação da integridade da membrana celular, permitindo diferenciar um espermatozoide imóvel vivo de um morto. Para a avaliação da vitalidade estão disponíveis 2 testes: a Coloração de Eosina-Nigrosina e o teste da hipoosmolaridade (Baskaran *et al.*, 2021).

O teste de Coloração de Eosina-Nigrosina baseia-se na capacidade de a membrana celular impermeabilizar a entrada de corante (eosina) para o interior da célula, ou no caso da membrana plasmática se encontrar danificada (espermatozoides mortos), ocorre a entrada de corante para dentro da célula. Para tal, uma alíquota de amostra seminal é misturada com um igual volume da solução de Eosina-Nigrosina numa lâmina. Posteriormente, a preparação é observada ao microscópio ótico numa ampliação de 200x. Os espermatozoides não viáveis irão apresentar uma coloração rosa-claro ou escuro, enquanto que, as células vivas apresentam uma coloração ligeiramente verde, ou transparente. Um total de 200 espermatozoides devem ser contabilizados. A utilização da Nigrosina é facultativa e tem como função a facilitação da avaliação microscópica ao manchar o fundo com uma cor escura. A vitalidade espermática também pode ser avaliada através da realização de um teste de hipoosmolaridade (HOS). Este teste avalia ocorrência de inchaço flagelar, quando os espermatozoides vivos são

incubados com uma solução hipoosmótica. Apenas as células viáveis, com uma membrana semipermeável intacta, isto é, com integridade funcional, são capazes de inchar sob condições hipoosmóticas. Para a realização do teste de HOS, mistura-se uma alíquota da amostra seminal com a solução osmótica. Após um período de incubação de 30 minutos, no caso de diagnóstico, ou de 5 minutos, no caso da utilização da amostra espermática num ciclo de PMA, observa-se a preparação ao microscópio ótico. Deve ser contabilizado um total de 200 espermatozoides. Os espermatozoides viáveis são facilmente identificáveis pelo enrolamento e inchaço da cauda. Os espermatozoides não viáveis não apresentarão qualquer modificação (Figura 10). A grande vantagem do uso deste método, é que permite a utilização dos espermatozoides em tratamentos terapêuticos (World Health Organization, 2010; Baskaran *et al.*, 2021).

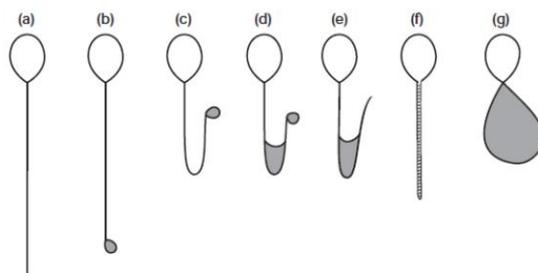


Figura 10. Representação das alterações observáveis nos espermatozoides quando são incubados numa solução hipoosmótica. Legenda: a – nenhum alteração/morto, b-g – Vários tipos de alterações observáveis na cauda dos espermatozoides. A região com coloração cinzenta é indicativa de inchaço. Adaptado de World Health Organization (2010).

3.2.2.5 Morfologia

Estudos revelaram que a morfologia espermática e a concentração de espermatozoides progressivos móveis são os fatores preditivos do sucesso de uma fertilização *in vitro* e são critérios para o suporte da decisão clínica sobre o tratamento de infertilidade a ser proposto. Contudo, a morfologia como um indicador é muitas vezes desafiante, já que a classificação de espermatozoides pode variar, devido à existência de inúmeros fatores, que inclui, diferentes técnicas usadas para preparação de esfregaços, experiência entre os técnicos, diferentes critérios de classificação. A avaliação da morfologia através de um microscópio ótico é uma técnica bastante subjetiva. Desta forma, torna-se difícil a comparação de resultados entre laboratórios (Franken *et al.*, 2000)

Num estudo de Dubey *et al.* (2008), onde foram realizados testes genéticos a embriões obtidos durante um ciclo de PMA, concluíram que homens com uma morfologia espermática normal tinham uma maior probabilidade de obter embriões euploides, e

taxas de implantação e gravidez clínica mais elevadas, do que os homens que apresentavam um quadro de teratozoospermia. Tal facto, releva que a morfologia dos espermatozoides desempenha um papel importante nos *outcomes* dos ciclos de PMA (Dubey *et al.*, 2008). Uma amostra espermática com uma elevada percentagem de espermatozoides anormais deve-se a erros durante a espermatogénese ou durante a maturação espermática nos epidídimos. No caso de anomalias morfológicas específicas, como a globozoospermia, anomalias múltiplas na região da cauda, espermatozoides acéfalos são indicativos de alguma anomalia genética (Danis & Samplaski, 2019; Baskaran *et al.*, 2021). A globozoospermia é caracterizada pela presença de uma elevada percentagem de espermatozoides com a cabeça redonda desprovidos de acrossoma. Também podem ser observados espermatozoides macrocéfalos, que estão associados à presença de aneuploidias, não sendo recomendado o seu uso na técnica de ICSI (Danis & Samplaski, 2019).

Para a avaliação da morfologia espermática, é necessária a realização de um esfregaço, formando um ângulo de 45°. Dependendo da concentração espermática é possível ajustar a quantidade de amostra pipetada, o ângulo, assim como, a velocidade do esfregaço. Um ângulo pequeno e baixa velocidade permite uma maior quantidade de espermatozoides por campo, enquanto que, uma maior velocidade e menor ângulo permite uma menor quantidade de espermatozoides por campo. O ideal é que se visualizem 5 a 10 espermatozoides dispersos por campo, para facilitar a observação e classificação dos mesmos (Menkveld *et al.*, 1990). Depois de o esfregaço estar seco, efetua-se a sua coloração. Estão disponíveis vários métodos de coloração, mas os mais frequentemente usados e recomendados são o *Papanicolaou*, *Shorr* e o *Diff-quick* (Natali *et al.*, 2013). Todos estes métodos resultam numa coloração diferencial, onde a cabeça do espermatozoide adquire uma coloração azul-pálido na região do acrossoma e azul-escuro na região pós-acrossómica, a peça intermédia pode apresentar uma coloração avermelhada e a cauda adquire uma coloração azul ou avermelhada (Natali *et al.*, 2013).

Após secagem à temperatura ambiente, a lâmina é observada ao microscópio ótico numa ampliação de 1000x (objetiva de imersão). Deve-se contabilizar o número de espermatozoides normais, o número de espermatozoides com defeito da cabeça, da peça intermédia, da cauda e contabilizar espermatozoides que possuam restos citoplasmáticos. Deve-se ter em conta que o mesmo espermatozoide pode ser caracterizado pela presença de mais que uma anomalia, mas deve ser contabilizado apenas como 1 espermatozoide. Pelo menos 100 espermatozoides devem ser

contados, mas, preferencialmente, deverão ser avaliados 200 espermatozoides (Menkveld *et al.*, 1990). No final, é calculado o índice de teratozoospermia, que determina o número médio de anomalias por espermatozoide anormal.



Figura 11. Espermatozoide com uma morfologia considerada normal. Aptado de (World Health Organization, 2010)

O critério usado para classificar um espermatozoide como normal é baseado na aparência dos espermatozoides quando recuperados do trato reprodutor feminino, especialmente no útero, trompas de Falópio e no muco cervical pós-coital. Um espermatozoide categorizado como normal, possui as seguintes características (Figura 11): (i) cabeça oval, de contornos suaves e lisa. A região do acrossoma deve ser bem definida, e deve compreender uma área de 40-70% da totalidade da cabeça. O

acrossoma deve ser desprovido de vacúolos de grandes dimensões, e não mais que 2 pequenos vacúolos. A região do núcleo não deve conter vacúolos; (ii) a peça intermédia deve ser delgada, regular e com um comprimento semelhante ao comprimento da cabeça. O eixo principal da peça deve estar alinhado com o eixo principal da cabeça. Restos citoplasmáticos apenas são considerados como anomalia, quando excedem um terço do tamanho da cabeça espermatozoide; (iii) por fim, a cauda deverá ser única, com diâmetro uniforme ao longo de todo o seu comprimento, mais fina que a peça intermédia, sem sinais de quebra flagelar, e com um comprimento cerca de 10 vezes o comprimento da cabeça. Para um espermatozoide ser considerado normal tem que cumprir todos estes critérios, caso contrário é considerado anormal.

Na figura 12, podem ser observados os vários tipos de anomalias espermáticas. A contagem dos espermatozoides deve ser realizada com o auxílio de um contador diferencial, definindo uma tecla para uma morfologia normal, e uma tecla para cada uma das 4 categorias de anomalias morfológicas: cabeça, peça intermédia, cauda e restos citoplasmáticos.

3.2.2.6 Presença de células redondas

Aquando a determinação da morfologia espermática podem ser observadas no mesmo esfregaço células redondas, que podem ser células da linhagem germinativa ou leucócitos. A observação de leucócitos no esfregaço é indicativa da presença de alguma infecção no trato genital masculino. Os leucócitos podem ser diferenciados das células da linhagem germinativa imaturas pela coloração (leucócitos com tom azulado e as espermátides com uma coloração mais rosada), tamanho e forma nuclear (Figura 13).

As células da linhagem germinativa possíveis de observar incluem espermátides, espermatócitos e mais raramente espermátogónias (World Health Organization, 2010).

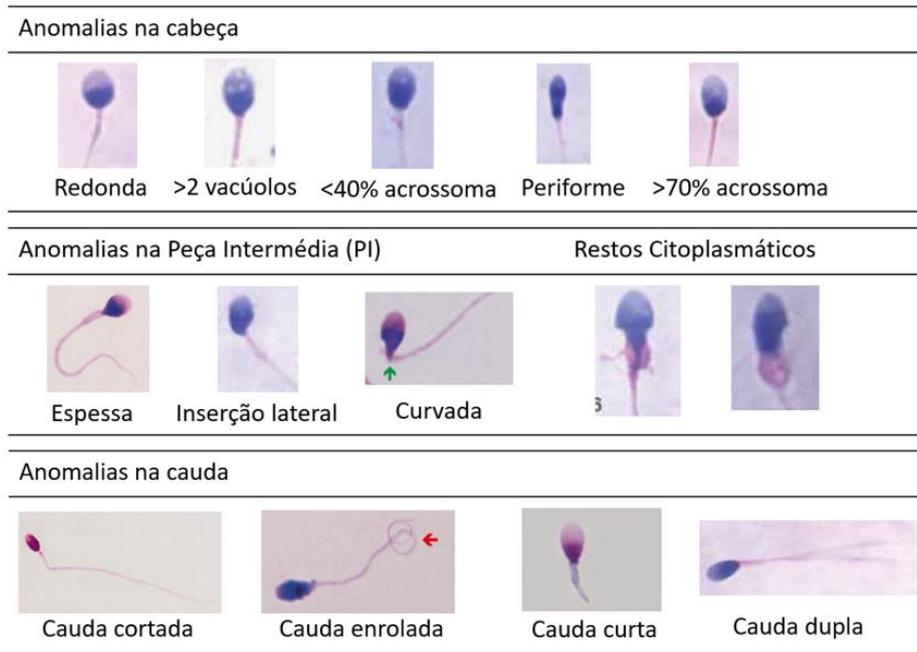


Figura 12. Imagens representativas das anomalias espermáticas que podem ser avaliadas durante a análise da morfologia espermática. Estão incluídas anomalias da cabeça, peça intermédia, presença de restos citoplasmáticos e da cauda. Adaptado de (World Health Organization, 2010; Paoli *et al.*, 2020).

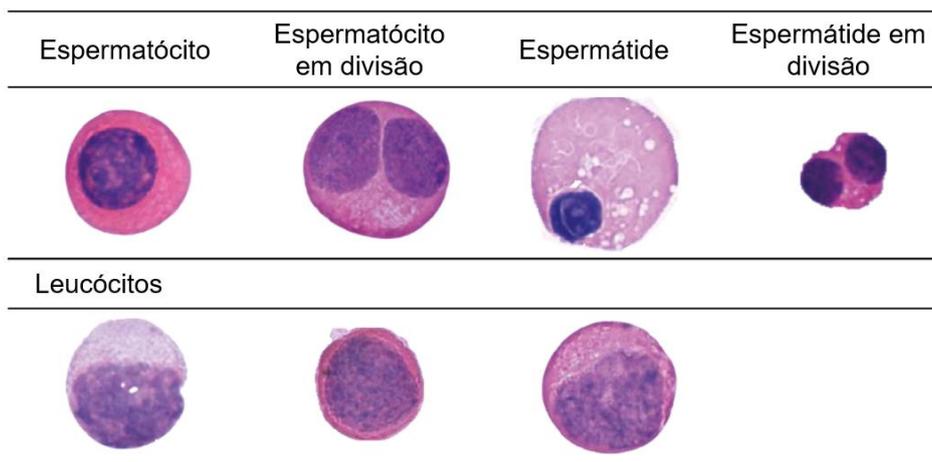


Figura 13. Células redondas possíveis de serem observadas numa lâmina de morfologia espermática. As células redondas podem ser células da linhagem germinativa (linha superior), onde inclui espermatócitos, espermatócitos em divisão, espermátides e espermátides em divisão. As células redondas também podem ser leucócitos, onde na figura estão ilustrados macrófagos (linha inferior). Adaptado de World Health Organization (2010)

3.3 Processamento da amostra seminal para uso em técnicas de PMA

3.3.1 Processamento de amostras seminais via ejaculado

O processamento da amostra seminal, antes da realização de uma técnica de PMA, apresenta uma enorme importância para sucesso dos tratamentos, já que o sémen possui fatores que não permitem a capacitação espermática (como o Zinco e prostaglandinas) (World Health Organization, 2010; Volpes *et al.*, 2016). O processamento seminal tem como principais objetivos, a eliminação do plasma seminal, células da linha germinativa, espermatozoides mortos, detritos e possíveis contaminantes presentes na amostra, aliado à concentração e seleção dos espermatozoides móveis progressivos, morfológicamente normais (World Health Organization, 2010; Santos *et al.*, 2016). Todavia, é necessário ter em conta que, estes parâmetros não são indicativos da sua viabilidade, apenas auxiliam na escolha dos espermatozoides com melhor motilidade (Volpes *et al.*, 2016).

Existem várias técnicas de processamento de esperma, e a sua escolha é dependente da qualidade e quantidade de espermatozoides presentes na amostra (World Health Organization, 2010). A técnica de *swim-up* direto é normalmente utilizada, quando a amostra espermática possui parâmetros normais, já que é caracterizada por possuir um baixo rendimento (World Health Organization, 2010; Bormann, 2014). Já no caso de homens diagnosticados com oligozoospermia, teratozoospermia ou astenozoospermia, é recomendada a utilização da técnica de gradientes de densidade descontínuos (World Health Organization, 2010). Os meios de cultura de espermatozoides utilizados durante o processamento da amostra, incluem diversos componentes importantes para a viabilidade espermática. Os meios contêm soro de albumina humana (HAS), que atua como antioxidante, e contém proteínas importantes para evitar a aderência de espermatozoides à superfície. O meio também contém iões de bicarbonato, necessários para a estimulação da motilidade e capacitação espermática. Normalmente, a glicose é o substrato metabólico utilizado para preparação espermática (Bourne *et al.*, 2009). Adicionalmente, o meio de cultura contém antibiótico (como a gentamicina) que evita o crescimento microbiano (Štšepetova *et al.*, 2020).

Na técnica de *swim-up* a seleção espermática é baseada na motilidade e na capacidade de os espermatozoides nadarem para fora do plasma seminal, em direção ao meio de cultura. Esta técnica é caracterizada pela sua simplicidade e pelo facto de não requer

equipamento sofisticado, nem técnicos especializados (Bormann, 2014). O processamento da amostra seminal através de **gradientes de densidade descontínuos** é o método mais, frequentemente, utilizado nos laboratórios de PMA (World Health Organization, 2010; Bormann, 2014). O método de gradientes de densidade descontínuos, tem como base o princípio de que, os espermatozoides móveis e morfológicamente normais, os espermatozoides mortos e outros detritos, possuem diferentes densidades (Bormann, 2014). O processamento por gradientes consiste na centrifugação da amostra seminal, sobre gradientes de densidade descontínuos, uma camada superior com uma densidade de 40% (v/v), e a camada inferior com uma densidade de 80% (v/v) de partículas de sílica coloidal revestidas com silício. Estas camadas têm a capacidade de separar as células pela sua densidade. Para além da densidade, os espermatozoides móveis nadam ativamente através das camadas na direção da força de centrifugação, e formam um *pellet* no fundo do tubo. Os restantes tipos celulares ficam retidos nas interfases (World Health Organization, 2010; Bormann, 2014). Este método permite a seleção dos melhores espermatozoides, com boa motilidade e morfologia, livres de detritos, leucócitos, células não germinativas e células degeneradas (World Health Organization, 2010). O uso desta técnica está associado à seleção de espermatozoides de boa qualidade, e elevadas taxas de gravidez, superiores às obtidas apenas pela técnica de *swim-up* (World Health Organization, 2010). A utilização de ambos os métodos, isto é, realizar a preparação espermática, inicialmente, com gradientes descontínuos, seguida da técnica de *swim-up*, está associada a um maior rendimento relativamente à concentração de espermatozoides de melhor qualidade (Bourne *et al.*, 2009). Nos laboratórios de PMA, é comum a utilização diária do método combinado de gradientes e *swim-up*.

3.3.1.1 Procedimento da técnica de *swim-up*

Para a realização da técnica de *swim-up*, adiciona-se à amostra seminal, um volume igual de meio de cultura. Procede-se à centrifugação durante 10 min, a uma força de 1300 rpm. Após centrifugação, retira-se o sobrenadante cuidadosamente, não interferindo com o *pellet*. Conforme o volume de *pellet* formado e os parâmetros iniciais, adiciona-se uma maior ou menor quantidade de meio de cultura, para que a preparação espermática não fique demasiado diluída ou muito concentrada. O tubo é colocado com uma inclinação de 45°, de modo a aumentar a área de superfície do meio de cultura, à temperatura ambiente. A amostra fica nestas condições entre 30 min a 1 h (World Health Organization, 2010; Bormann, 2014). No final, retira-se uma pequena alíquota da fração superior da amostra para determinação da concentração e motilidade espermática. No

final, o sobrenadante deve conter uma elevada fração de espermatozoides altamente móveis.

3.3.1.2 Procedimento da técnica de gradientes de densidade descontínuos

Para preparação dos gradientes, deve-se preparar 2 tubos de ensaio identificados, com 1 a 2 mL de meio de gradiente de densidade a 40% (v/v) num tubo, e 1 a 2 mL de meio de gradiente de densidade de 80% (v/v) no outro tubo (World Health Organization, 2010). Quando a amostra espermática apresenta um baixo volume, coloca-se apenas 0.5 mL de cada solução. Cuidadosamente, para evitar misturas de fases, transfere-se o gradiente de menor densidade (40%) para o tubo que contém o gradiente de maior densidade (80%). Depois de bem misturada a amostra seminal, colocar 1-2 mL da amostra sobre os gradientes preparados e centrifuga-se durante 20 min a 1800 rpm. De seguida, retira-se o sobrenadante e ressuspende-se o sedimento em 1 mL de meio de cultura, e proceder-se à sua centrifugação por 10 min, a 1300 rpm. Esta centrifugação tem como objetivo a eliminação do meio de gradientes de densidade. O sobrenadante é novamente rejeitado. De seguida, é adicionado, novamente meio de cultura. O volume adicionado está dependente do *pellet* formado, assim como, os parâmetros iniciais de concentração e motilidade. Retira-se uma pequena alíquota para avaliação da concentração e motilidade (World Health Organization, 2010).

4. Casos clínicos e indicação para técnicas de PMA

Neste capítulo serão apresentados vários casos clínicos para demonstração da aplicabilidade das várias técnicas realizadas num laboratório de PMA. Em cada caso clínico será apresentada uma tabela com os dados clínicos e laboratoriais relevantes para o diagnóstico e indicação de tratamento de PMA, de ambos, ou apenas um dos elementos do casal. De seguida, será realizado um enquadramento teórico sobre a técnica, assim como a explicação da metodologia utilizada. Os casos clínicos estão separados em tratamentos de primeira e segunda linha.

4.1 Tratamentos de 1ª linha

Nos tratamentos de primeira linha estão incluídos os procedimentos de indução da ovulação com programação de relações sexuais e a inseminação intrauterina. A indução da ovulação implica a indução da maturação folicular e posterior desencadeamento da ovulação. Este tipo de tratamento é indicado em mulheres que não ovulam (anovulação) ou que ovulam irregularmente (oligoovulação), de modo a induzir ciclos menstruais regulares (M. Fauser, 2014). Ao monitorizar ecograficamente o desenvolvimento folicular e induzir a ovulação, é possível a programação das relações sexuais no momento da ovulação, e assim aumentar, a probabilidade de gravidez.

4.1.1 Caso clínico 1 – Inseminação Intrauterina

Tabela 3. Informação clínica e laboratorial do casal do caso clínico 1, indicado para inseminação intrauterina. Legenda: V – Volume; C – concentração; MP – móveis progressivos; MNP – móveis não progressivos; I – imóveis; FN – formas normais.

Mulher ♀	Homem ♂
33 anos, ciclos regulares. Submetida a conização laser por Cin3	38 anos, saudável. Espermograma: V=2.2 mL; pH=8.1; C=52.10 ⁶ /mL; MP=68%; MNP=13%; I=19%; FN=7%
Infertilidade secundária com 4 anos de evolução Indicação para inseminação por fator cervical Protocolo de estimulação: Dose total de estimulação: 900 UI FSH Dias de estimulação: 12 Espessura endometrial: 8.9 mm	

4.1.1.1 Enquadramento teórico

A inseminação intrauterina (IIU) é um tratamento de infertilidade de 1ª linha, de baixa complexidade, indolor, pouco invasivo e dispendioso, comparativamente, a técnicas como a FIV (Fertilização *in vitro*) e a ICSI (Injeção intracitoplasmática de espermatozoide). Na IIU, os espermatozoides depois de processados laboratorialmente, são colocados no interior da cavidade uterina, para ficarem mais próximos do ovócito, aumentando a probabilidade de fecundação. A IIU é indicada para uma vasta gama de diagnósticos clínicos, como, o fator cervical, endometriose ligeira, fator masculino leve/moderado, disfunção ovulatória (associada a um protocolo de estimulação ovárica), a presença de doenças virais (por exemplo, HIV (Vírus da imunodeficiência humana)), problemas ejaculatórios ou coitais, e em casos de infertilidade idiopática (Duran *et al.*, 2002; Kandavel & Cheong, 2018). A IIU está também indicada, quando há necessidade de utilização de esperma de dador em casais heterossexuais (por exemplo, parceiro com azoospermia), em casais de mulheres, ou em mulheres sem parceiro (Kandavel & Cheong, 2018). Para determinados diagnósticos é contraindicado a utilização da IIU, como é o caso de mulheres com atresia cervical, obstrução tubar bilateral, cervicite, endometrite, endometriose grave, ou no caso da presença de um fator masculino grave, como a oligozoospermia severa (ESHRE Capri Workshop Group, 2009; Kandavel & Cheong, 2018).

Este tratamento de 1ª linha pode ser realizado em ciclo natural ou em ciclo estimulado. Quando a técnica de IIU é realizada em ciclo estimulado, as taxas de sucesso são superiores quando comparadas com IIU em ciclo natural (Duran *et al.*, 2002; Bayer *et al.*, 2007). A administração hormonal (progesterona) para suporte da fase lútea e consequente obtenção de um endométrio mais recetivo à implantação, conduz igualmente a um aumento das taxas de sucesso obtidas (Kandavel & Cheong, 2018).

Apesar dos avanços na preparação espermática, e dos protocolos de estimulação ovárica controlada, as taxas de sucesso da IIU são relativamente baixas (8.5% IIU-intraconjugal, 12% IIU-dadores), quando comparadas com as taxas de sucesso da FIV e ICSI, 20.8% e 18.5%, respetivamente (Wyns *et al.*, 2020). Segundo a literatura, vários são os fatores que influenciam as taxas de gravidez após um ciclo de IIU, nomeadamente: (I) a idade feminina e masculina; (II) duração e o tipo de infertilidade; (III) concentração e motilidade de espermatozoides no *swim-up* (Miller *et al.*, 2002; Merviel *et al.*, 2010; Demir *et al.*, 2011); (IV) número de folículos maduros; (V) concentração de estrogénios (E2) no dia da administração da hCG; (VI) momento da realização da técnica; (VII) tipo de cateter utilizado durante a técnica de inseminação

(Merviel *et al.*, 2010). A idade feminina é o fator mais marcante no resultado da IIU. A partir dos 40 anos, ocorre uma diminuição acentuada das taxas de sucesso, possivelmente relacionadas com a diminuição da qualidade ovocitária, não sendo por isso, recomendada a IIU nesta faixa etária (Cohlen *et al.*, 2018).

4.1.1.2 Procedimento da Inseminação Intrauterina

O tratamento começa com a administração de gonadotrofinas para a estimulação ovárica e desencadeamento da ovulação. O objetivo da indução da ovulação é o desenvolvimento unifolicular ou bifolicular, de modo a minimizar o risco de gestação múltipla, sendo que o desenvolvimento folicular é monitorizado ecograficamente. Cerca de 32 a 36 horas após a administração da hCG é agendada a realização da técnica IIU, propriamente dita (ESHRE Capri Workshop Group, 2017). A hCG é administrada quando o(s) folículo(s) atingirem a dimensão máxima de > 20-21 mm.

No dia da realização da técnica, no caso de um ciclo intraconjugal, o parceiro faz uma colheita de esperma, sendo posteriormente determinado o volume e avaliados os parâmetros de concentração, motilidade. O processamento da amostra é realizado através da técnica de gradiente de densidade descontínuos combinada com a técnica de *swim-up* (descrito na Secção 3.3.1). No caso de um ciclo com utilização de gâmetas de dador ou próprio criopreservado, procede-se à descongelação das palhetas (10 minutos à temperatura ambiente), e é devidamente processado.

Antes da realização da IIU propriamente dita, a identidade da paciente é confirmada. A suspensão espermática, é aspirada com o auxílio de uma seringa de 1 mL, acoplada a um cateter de inseminação, que será entregue ao médico ginecologista, para a realização da inseminação. O médico ginecologista procede, previamente, à introdução de um espéculo, para que o canal cervical seja visível e permita a lavagem do muco com uma compressa. De seguida, o médico introduz o cateter na cavidade intrauterina, pelo canal cervical, e liberta lenta e cuidadosamente, a suspensão espermática. A paciente deve cumprir um repouso de 10 a 15 min, de modo a minimizar a perda de uma grande percentagem de conteúdo espermático (Cohlen *et al.*, 2018).

Durante 14 dias após a inseminação, a paciente deve realizar um tratamento de suporte à fase lútea, com a administração diária de progesterona. A determinação do β -hCG deve ser realizada 15 dias após o procedimento. Caso teste de gravidez positivo, deve-se manter a administração de progesterona até às 12 semanas de gestação.

O ciclo de IIU deve ser cancelado quando não são obtidos folículos maduros, ou o endométrio não se encontra com o espessamento necessário, ou quando são observados, ecograficamente, mais de 3 folículos maduros em desenvolvimento, o que confere um maior risco de uma gestação múltipla.

4.2 Tratamentos de 2ª linha

A fertilização *in vitro* e a injeção intracitoplasmática de espermatozoide são duas técnicas de PMA categorizadas como tratamentos de 2ª linha. Estas técnicas consideradas mais invasivas, implicam o estabelecimento de um protocolo de hiperestimulação controlada dos ovários, com a colheita de ovócitos através de uma punção folicular, realização da técnica de junção de gâmetas, desenvolvimento embrionário e transferência embrionária e/ou criopreservação.

Todo o processo de manipulação de ovócitos e embriões deve ser realizado sob condições ótimas de temperatura e osmolaridade. A temperatura das superfícies de trabalho deve estar estável (a 37°C) e o pH mantido constante (~7.3). As placas de cultura de ovócitos ou com embriões, são preparadas com meio submerso em óleo mineral, para evitar a evaporação do meio e, assim, minimizar as flutuações de pH, osmolaridade e temperatura. Para manutenção da temperatura, todos os equipamentos deverão ter uma superfície/platina termostaticada a 37±0.5 °C, e as incubadoras onde são mantidos os ovócitos, devem ser mantidas à mesma temperatura e gaseadas com 6% de CO₂ e 5% de O₂ (Granot & Dekel 2008). Flutuações de temperatura durante a manipulação dos gâmetas, provocam danos nos ovócitos, já que poderão levar a uma desorganização do sistema de microtúbulos, que pode influenciar a normal segregação dos cromossomas, resultando em embriões aneuploides (Granot & Dekel 2008).

4.2.1 Protocolos de hiperestimulação controlada dos ovários

A hiperestimulação controlada dos ovários tem como principal objetivo o desenvolvimento de múltiplos folículos para utilização em ciclos de PMA, e assim aumentar a probabilidade da formação de blastocistos e transferência embrionária/criopreservação (Vaughan *et al.*, 2017). Ao contrário, de um ciclo natural, onde apenas ocorre o desenvolvimento de 1 folículo dominante, através da administração hormonal é possível o desenvolvimento multifolicular (B. C. Fauser & Van Heusden, 1997). Para tal, é necessário manter os níveis de FSH acima do limiar requerido para o recrutamento folicular e sua maturação. A administração de FSH é combinada com o uso de um protocolo de estimulação de GnRH agonista ou

antagonista, de modo a, desencadear a supressão dos níveis de LH e impedir a ovulação prematura (Fatemi *et al.*, 2012; Lambalk *et al.*, 2017). A hCG tem como principal objetivo a maturação final dos ovócitos e a punção folicular é marcada para 35-37h após (Alper, 2012).

Existem diversos protocolos de hiperestimulação controlada dos ovários, contudo os mais comumente utilizados são descritos abaixo:

- Protocolo curto com antagonistas

Num protocolo curto com antagonista, a estimulação controlada dos ovários é conseguida através da administração de doses diárias de gonadotrofinas, normalmente, com início na fase folicular, e com a administração de antagonista da GnRH para dessensibilização da hipófise, quando 1 ou mais folículos atingem o diâmetro ≥ 13 mm. O desenvolvimento folicular é monitorizado através de ecografias transvaginais sucessivas. Conseguindo um número de 2 a 3 folículos dominantes, com dimensões adequadas ($\geq 17-18$ mm) é administrada a hormona hCG, de forma a desencadear a maturação folicular final. A punção folicular é realizada 35 a 36 h após a tomada da hCG. O *trigger* pode ser desencadeado com um agonista GnRH em situação de OHSS.

- Protocolos com agonistas

Os agonistas da GnRH têm desempenhado um papel importante na redução da incidência do pico precoce de LH bloqueando, reversivelmente, a secreção pituitária de gonadotrofinas.

- Protocolo curto agonista

O ciclo de estimulação curto com agonista tem início na fase folicular precoce com administração de agonista de GnRH e no dia seguinte o início da estimulação ovárica com recurso a gonadotrofinas. Quando os folículos atingem um maior diâmetro (≥ 18 mm) é desencadeada a ovulação com *trigger* hCG.

- Protocolo longo agonista

O ciclo de estimulação longo com agonista tem início na fase lútea e, necessita de duas a três semanas para a dessensibilização da hipófise e completa supressão pituitária, que ocorre devido à "*down-regulation*". É nesta fase que se inicia a estimulação com gonadotrofinas. O uso do análogo da GnRH com a gonadotrofina proporciona a maturação folicular e ovocitária.

4.2.2 Punção folicular

A punção folicular é realizada sob sedação e sob controlo ecográfico, e tem como objetivo a aspiração dos folículos com o auxílio de uma agulha acoplada ao guia de punção que se encontra junto da sonda. O líquido folicular é aspirado por pressão negativa e o conteúdo observado em laboratório. Os tubos com líquido folicular, previamente preparados com meio tamponado, são imediatamente encaminhados para o laboratório (mantidos a 37 °C), através de uma janela de conexão com a sala de colheita de ovócitos. Numa câmara de fluxo laminar vertical, o embriologista analisa o conteúdo do tubo numa placa de *Petri*, sob a ajuda de um estereomicroscópio, numa superfície aquecida, onde se realiza uma pesquisa exaustiva de complexos *cumulus*-ovócito (COC) (Elder & Dale, 2011; Bormann, 2014). De notar que, o líquido folicular pode conter coágulos de sangue que devem ser cuidadosamente analisados, dissecados com agulhas, de modo a verificar a presença de COC (Elder & Dale, 2011). Durante a observação do líquido folicular, e conseqüentemente, dos ovócitos, é possível realizar uma primeira avaliação da maturação ovocitária através da observação do aspeto morfológico dos ovócitos. Quando a massa celular do cúmulo e *corona radiata* se encontram expandidas, com um aspeto “nuvem”, de tom claro e brilhante, é indicativo da presença de um ovócito maduro (Figura 14, A). Por outro lado, os ovócitos imaturos, normalmente recuperados de pequenos folículos, possuem células do cúmulo não expandidas, compactas, o que confere uma tonalidade escura (Figura 14, B) (Elder & Dale, 2011). Por vezes, no interior das células do cúmulo, pode ser observada a presença de pequenos coágulos de sangue, tal artefacto é indicativo de um pobre desenvolvimento, qualidade e competência ovocitária (Ebner *et al.*, 2008).

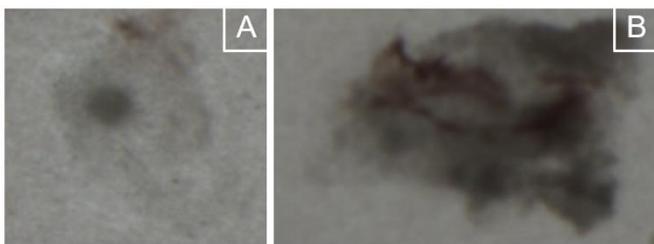


Figura 14. Folículos em diferentes estados de maturação. A – Folículo aparentemente maduro, com as células do cúmulo expandidas; B – Folículo, aparentemente, imaturo, com células do *cumulus* escuras e densas. Imagens propriedade da clínica Procriar – Centro de Obstetrícia e Medicina da Reprodução do Porto.

Em ciclos naturais a maturação ovocitária ocorre, paralelamente, ao desenvolvimento e expansão das células do cúmulo e *corona radiata*. Todavia, em ciclos estimulados, este processo

síncrono pode ser perturbado, devido à sensibilidade distinta dos ovócitos e da massa cúmulo-*corona radiata* às hormonas. Assim, durante a recuperação ovocitária, podem ser observados folículos com um ovócito maduro, mas ainda com células compactas e não

brilhantes, ou ovócitos imaturos com células do cúmulo expandidas (Rienzi *et al.*, 2012).

4.2.3 Caso clínico 2 – Fertilização *In Vitro*

Tabela 4. Informação clínica e laboratorial do casal do caso clínico 2, indicado para fertilização *in vitro*. Legenda: V – Volume; C – Concentração; MP – Móveis Progressivos; MNP – Móveis Não Progressivos; I – Imóveis; FN – Formas Normais; HSG – Histerossalpingografia; IIU – Inseminação intrauterina; UI – unidade internacionais; PN – Pronúcleo; BL – Blastocisto; OHSS – Síndrome de hiperestimulação ovárica.

Mulher ♀	Homem ♂
24 anos, ciclos regulares. HSG – permeabilidade tubar bilateral, cote positivo bilateralmente.	33 anos, saudável. Espermograma: V=2.2 mL; pH=8.1; C=92.10 ⁶ /mL; MP=72%; MNP=11%; I=17%; FN=6%.
Infertilidade secundária com 2 anos de evolução Realizados 2 ciclos de IIU intraconjugal sem sucesso Proposto 3º ciclo de IIU, contudo casal desejou avançar para ciclo FIV Protocolo de estimulação: Curto com antagonista Dose total de estimulação: 1350 UI rFSH Dias de estimulação: 9 Nº ovócitos recuperados e colocados em FIV: 15 Nº ovócitos fecundados (2PN): 10 Nº ovócitos fecundados (3PN): 2 Nº ovócitos MI: 3 Nº embriões criopreservados ao D5: 5 (2x BL 4AA; 2x BL 4AB; BL 4BB) Nº embriões criopreservados ao D6: 2 (2x BL 4BB) Ciclo de <i>freeze all</i> por risco de OHSS.	

4.2.3.1 Enquadramento teórico

A FIV (Fertilização *in vitro*) consiste numa aproximação *in vitro*, do que acontece naturalmente no processo de fertilização, *in vivo*. Os complexos cúmulo-ovócito recolhidos durante a punção folicular são incubados com uma preparação espermática, onde os espermatozoides vão ao encontro do ovócito, e penetram as suas várias camadas até alcançarem o oolema do ovócito. Desde o nascimento de Louise Brown em 1978, mais de 5 milhões de bebés nasceram recorrendo à técnica de FIV convencional (Wyns *et al.*, 2020).

Inicialmente, a FIV era indicada para a resolução de problemas de infertilidade relacionados com o fator tubar. Atualmente, para além do fator tubar, esta técnica é considerada como tratamento para inúmeros fatores de infertilidade, como a infertilidade

idiopática, endometriose, presença de um fator masculino não grave, disfunção ovárica, entre outras (Ben-Ami *et al.*, 2012; Meyer, 2020). A FIV também é indicada para casos sucessivos de insucesso em IIU (Meyer, 2020). Em alguns casos a realização de uma FIV é contraindicada, nomeadamente, quando são utilizados ovócitos desvitrificados, dado que, a criopreservação conduz a um endurecimento da zona pelúcida, impedindo a entrada dos espermatozoides (Meyer, 2020). Outra situação, é quando o ciclo é indicado para a realização de PGT (Teste Genético Pré-implantação). Caso se realizasse FIV, incorria-se num maior risco de contaminação das células biopsiadas, já que alguns espermatozoides podem ficar ligados à zona pelúcida (Meyer, 2020). A FIV não é aconselhada perante um quadro clínico de alterações significativas na qualidade espermática, assim como, de sucessivas falhas de conceção noutras tentativas recorrendo à FIV (Meyer, 2020).

As taxas de sucesso da FIV são dependentes de vários fatores, como: a idade materna, já que a qualidade ovocitária diminui com o avançar da idade (van Loendersloot *et al.*, 2010); a duração da infertilidade, já que, ocorre uma correlação inversa com as taxas de sucesso de FIV (van Loendersloot *et al.*, 2010; Meyer, 2020); os valores de FSH basal, isto é, quanto maior a concentração de FSH, menor é a probabilidade de gravidez (Sabatini *et al.*, 2008); o número de ovócitos recolhidos por ciclo, isto é, quanto maior o número de ovócitos recolhidos, maior é a probabilidade de gravidez (van Loendersloot *et al.*, 2010). Em relação ao fator idade, num estudo de Nelson and Lawlor (2011), demonstraram que, na faixa etária dos 35 aos 37 anos de idade a probabilidade da mulher conseguir uma gravidez com nado-vivo era de 77%, enquanto que para idades compreendidas entre o 43 e 44 anos, a probabilidade decaía para apenas 10%.

4.2.3.2 Procedimento da realização de uma FIV

Quando há indicação para um tratamento de FIV, o protocolo inicia-se com uma hiperestimulação controlada dos ovários, conforme o descrito na Secção 4.2.1, para o desenvolvimento de múltiplos folículos. Em raros casos, o tratamento pode ser realizado em ciclo natural.

Cerca de 36 h após a administração de hCG, é realizada a punção folicular e pesquisa de folículos, conforme o descrito na Secção 4.2.2. A amostra espermática deve ser colhida no dia da realização da técnica, e processada, preferencialmente, pelas técnicas de gradientes descontínuos, seguida de *swim-up* (Secção 3.3.1). A técnica também pode ser realizada com esperma próprio congelado, ou de dador, devendo o mesmo ser descongelado e processado no dia da punção. Aproximadamente, 4h após a punção

folicular, coloca-se uma alíquota da preparação espermática em gotas de meio de cultura de uma placa, previamente, preparada e pré-aquecida a $\pm 37^{\circ}\text{C}$, 6% CO_2 , 5% O_2 . O volume colocado está dependente da concentração espermática e percentagem de espermatozoides móveis. Ao microscópio ótico invertido, devem ser visualizados 15 a 20 espermatozoides por campo, em cada gota, numa ampliação de 200x. A placa com os espermatozoides é, novamente, incubada a 37°C , 6% CO_2 , 5% O_2 , para equilibrar. Depois de um período de 30 min, deve-se verificar novamente as gotas, para avaliar se a motilidade espermática é superior a 20%. Os COC são transferidos para as gotas com os espermatozoides. Devem ser colocados no máximo 3 ovócitos por gota. A placa é incubada a $\pm 37^{\circ}\text{C}$, 6% CO_2 e 5% O_2 . Cerca de 16-18 hpi (horas pós inseminação), os ovócitos são desnudados com uma pipeta de pequeno calibre, para avaliar o sucesso da fecundação. Os ovócitos desnudados devem ser visualizados ao microscópio ótico invertido para a verificação da presença de 2 pronúcleos e 2 glóbulos polares. A avaliação do sucesso da fecundação, assim como o desenvolvimento embrionário, são abordados de forma mais detalhada na Secção 4.3.4.

4.2.4 Caso 3 (A) – Injeção intracitoplasmática de espermatozoide

Tabela 5. Informação clínica e laboratorial do casal do caso clínico 3 (A), indicado para a realização da técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoide. Legenda: V – Volume; C – Concentração; MP – Móveis Progressivos; MNP – Móveis Não Progressivos; I – Imóveis; FN – Formas Normais; ng – nanogramas; UI – unidades internacionais; PN – Pronúcleos; D – Dia; BL – Blastocisto.

Mulher ♀	Homem ♂
41 anos Ciclos curtos Exame ginecológico normal Ovários com 2-3 folículos antrais cada. AMH=1.2 ng	38 anos, saudável. Espermograma: V= 4.2 mL; pH=7.9; C= 11.10^6 /mL; MP=39%; MNP=12%; I=49%; FN=2%.
Infertilidade secundária com 4 anos de evolução Indicação para ciclo ICSI por fator misto (baixa reserva ovárica + fator masculino) Protocolo de estimulação: Curto com antagonista Dose total de estimulação: 3600 UI rFSH Dias de estimulação: 12 Nº ovócitos recuperados: 6 Nº ovócitos maduros: 6 Nº ovócitos fecundados (2PN): 4 Nº blastocistos: 3 Nº embriões transferidos a fresco ao D5: 2 (BL 3AB, BL 3BB) Nº embriões criopreservados ao D6: 1 (BL 3BB)	

4.2.4.1 Enquadramento teórico

A ICSI consiste na microinjeção de um único espermatozoide no oolema do ovócito, ultrapassando a camada da zona pelúcida. Esta técnica foi introduzida no início dos anos 90 e revolucionou a área de PMA, sendo rapidamente integrada nos laboratórios, a nível mundial (Rubino *et al.*, 2015). A sua intensa aplicabilidade deve-se, essencialmente, ao cumulativo aumento de eficácia ao longo dos anos, através de uma técnica altamente padronizada (Rubino *et al.*, 2015). O EIM (*The European IVF-monitoring Consortium*) reportou que, em 2016, a ICSI foi a técnica de PMA mais utilizada a nível europeu, englobando 44.4% de todos os ciclos realizados (Wyns *et al.*, 2020). A ICSI permite ultrapassar a presença de um fator masculino severo, como baixa concentração, motilidade ou morfologia (Mansour, 1998; G. Palermo *et al.*, 2009; French *et al.*, 2010). Esta técnica é eficaz mesmo com a utilização de espermatozoides imaturos, quando recolhidos cirurgicamente via testículo ou epidídimo (G. D. Palermo *et al.*, 1995; G. Palermo *et al.*, 2009). Desta forma, a técnica de ICSI mostra-se indicada para ultrapassar várias barreiras que provocam infertilidade, contornando a maturação do esperma no epidídimo, reação acrossómica, ligação do espermatozoide à zona pelúcida e fusão do núcleo com o oolema do ovócito (G. Palermo *et al.*, 2009).

A realização da ICSI é indicada para inúmeros diagnósticos de infertilidade, mas está sobretudo associada a casos com um fator masculino grave. A técnica de ICSI é indicada: (1) em quadros clínicos de oligozoospermia, astenozoospermia e teratozoospermia, ou na combinação destas alterações; (2) aquando da utilização de métodos cirúrgicos (MESA, PESA, TESA e TESE) para a recolha de espermatozoides; (3) em casos de disfunção ejaculatória, como a ejaculação retrógrada, onde os espermatozoides podem ser recuperados via urina; (4) para casais que obtiveram uma taxa de fecundação praticamente nula, quando recorreram à técnica de FIV, já que, tal situação é indicativa de alguma perturbação na ligação dos 2 gâmetas; (5) quando existem fatores imunológicos associados, como a presença de anticorpos anti-espermatozoides no plasma seminal; (6) na utilização de ovócitos criopreservados, devido ao endurecimento da ZP; (7) para casos, indicativos de teste genético de pré-implantação (Mansour, 1998; Dale & Elder, 2010d).

A realização da ICSI compreende várias etapas: a mulher é submetida a um protocolo de estimulação, seguida de uma punção folicular para colheita dos ovócitos (descritos nas Secções 4.2.1 e 4.2.2, respetivamente). De seguida, procede-se a desnudação ovocitária e avaliação da maturidade e morfologia dos ovócitos. Também é possível a

desvitrificação de ovócitos para utilização em ciclo. Depois de um período de incubação de 4 horas após punção folicular (ovócitos a fresco) ou 2 horas após desvitrificação (ovócitos criopreservados), procede-se à realização da técnica propriamente dita, com a microinjeção do espermatozoide no ovócito.

4.2.4.2 Desnudação ovocitária

A realização da ICSI implica uma desnudação ovocitária, que consiste na remoção enzimática e mecânica das células do cúmulo *oophorus* e *corona radiata*, de forma a visualizar o estado de maturação do ovócito, assim como, a identificar potenciais anomalias intra e extracitoplasmáticas. Para além disso, a remoção das células em redor do ovócito é importante, dado que, as mesmas podem dificultar a manipulação das micropipetas durante a técnica. A desnudação ovocitária é realizada cerca de 3 horas após a punção folicular, sendo que, este hiato de tempo permite a recuperação dos ovócitos após punção folicular (Pujol *et al.*, 2018).

A desnudação inicia-se com a ação enzimática pela hialuronidase, uma vez que, a matriz extracelular do cúmulo *oophorus* é constituída essencialmente por ácido hialurónico. Desta forma, a enzima auxilia a digestão das ligações celulares, para facilitar a libertação do ovócito (Bormann, 2014). Os ovócitos são pipetados sucessivamente em gotas de hialuronidase, durante aproximadamente 1 minuto. Este período não deve ser excedido, visto que pode resultar em danos para o ovócito. De seguida, os ovócitos são transferidos, sucessivamente, entre gotas de meio de cultura, com a ajuda de uma pipeta de pequeno calibre, realizando assim a desnudação mecânica. Terminada a desnudação ovocitária, torna-se possível a observação do ovócito, permitindo a avaliar a maturação nuclear dos ovócitos, assim como, a sua morfologia. Esta avaliação deve ser realizada ao microscópio ótico invertido, a 37 °C.

4.2.4.3 Avaliação da maturação ovocitária

Um ovócito maduro encontra-se em metáfase II e é caracterizado pela presença do 1º glóbulo polar (GP) no espaço perivitelino (Figura 15, C). Em média, 85% dos ovócitos recuperados após hiperestimulação ovocitária, encontram-se em metáfase II (Rienzi *et al.*, 2012). Apenas os ovócitos que se encontram neste estado de maturação são utilizados na ICSI, já que, apenas estes atingiram o estado haploide (Bormann, 2014). Após desnudação, pode-se encontrar ovócitos no estado de prófase I (2n), com a visualização de uma vesícula germinal (VG), isto é, um núcleo intracitoplasmático resultante da primeira divisão meiótica, onde os cromossomas homólogos emparelham

(Figura 15, A) (Rienzi *et al.*, 2012). Também é possível observar ovócitos em metáfase I, que se encontram numa fase intermediária entre a prófase I e a metáfase II, não possuindo por isso, VG ou GP (Figura 15, B) (Ebner *et al.*, 2006; Rienzi *et al.*, 2012).

Um tema ainda em debate é a utilização da maturação *in vitro* (IVM) dos ovócitos ainda imaturos. Os ovócitos em metáfase I, em vez de serem eliminados, podem ser mantidos em cultura por um período maior. Caso, durante este período, os ovócitos sofram maturação, podem ser microinjetados. Todavia, está comprovado que, os ovócitos maturados *in vitro* tem um potencial de desenvolvimento inferior, quando comparados, com ovócitos maturados *in vivo* (Rubino *et al.*, 2015). Os ovócitos maturados *in vitro*, comparativamente, aos ovócitos maturados *in vivo* possuem taxas de fecundação inferiores (Balakier *et al.*, 2004; Strassburger *et al.*, 2010) e possuem uma maior taxa de aneuploidia (Strassburger *et al.*, 2010). A IVM é, essencialmente, colocada em questão, quando são recolhidos um número reduzido de ovócitos em metáfase II, de modo a aumentar o número de embriões disponíveis, para assegurar a transferência embrionária (Rubino *et al.*, 2015).



Figura 15. Representação das possíveis fases de maturação observáveis após a desnudação ovocitária. A – Ovócito com vesícula germinal, em prófase I, imaturo; B – Ovócito em metáfase I, imaturo; C – Ovócito em metáfase II, maduro. Ampliação 200x. Imagens propriedade da clínica Procriar – Centro de Obstetrícia e Medicina da Reprodução do Porto, Lda.

4.2.4.4 Avaliação da morfologia ovocitária

O estado de maturação ovocitária, por si só, não é determinante da qualidade ovocitária. Também é necessário ter em conta o aspeto morfológico do ovócito. Cerca de 60 a 70% dos ovócitos recuperados, resultantes de uma estimulação ovárica apresentam alguma alteração morfológica, que pode afetar o desenvolvimento embrionário (Balaban & Urman, 2006; Rienzi *et al.*, 2012; Saiz *et al.*, 2018). Determinadas alterações

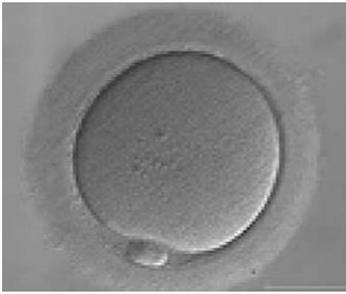


Figura 16. Ovócito morfológicamente normal. Adaptado de Rienzi *et al.* (2012)

morfológicas podem revelar um défice de competência de desenvolvimento, capacidade de fecundação e de implantação embrionária. A qualidade ovocitária não é apenas definida pela informação contida no genoma nuclear e mitocondrial, mas também é influenciada pelo microambiente do ovário e folículo, que podem sofrer alterações na transcrição e tradução, principalmente, num ciclo estimulado (Rienzi *et al.*, 2011). As variações morfológicas podem ser resultantes da idade da mulher, de fatores genéticos, ou devido a fatores extrínsecos, como os protocolos de estimulação e condições de cultura. Um ovócito de boa qualidade, em metáfase II, deverá possuir uma estrutura esférica, um citoplasma claro e uniforme, sem inclusões citoplasmáticas, com baixa/ausência de granulosidade, um espaço perivitelino pequeno, uma zona pelúcida incolor e uniforme, com um glóbulo polar integro de dimensões apropriadas, como representado na Figura 16 (Balaban & Urman, 2006; Alpha SiRM & ESHRE SIGE, 2011).

Um aspeto a ser considerado, em termos morfológicos, é o tamanho do ovócito. Apesar de raramente, é possível observar a presença de ovócitos gigantes. Estes são facilmente detetáveis pelas suas grandes dimensões (~200 μm de diâmetro, comparativamente a ~120 μm) e resulta, da ausência de citocinese durante a divisão meiótica, ou devido à fusão de 2 oogónias. Deste modo, estes gâmetas possuem uma identidade genética diploide ou tetraploide, e não devem ser microinjetados, já que o zigoto resultante pode ser capaz de clivar e dar origem a um blastocisto, que não é compatível com a vida (Balakier *et al.*, 2002; Ebner *et al.*, 2006).

Os ovócitos podem apresentar alterações morfológicas intracitoplasmáticas e/ou alterações morfológicas extracitoplasmáticas, que serão abordadas na próxima secção.

4.2.4.4.1 Alterações Morfológicas Intracitoplasmáticas

Apesar de ser expectável que o ovócito possua um citoplasma homogéneo, é necessário ter em conta que um citoplasma heterogéneo pode apenas representar uma variabilidade ovocitária e não um dismorfismo (Alpha SiRM & ESHRE SIGE, 2011). Contudo, são várias as alterações passíveis de serem observadas.

- Granulosidade do citoplasma:

A granulosidade do citoplasma é uma alteração, frequentemente observada, e é caracterizada pela presença de uma massa escura com grânulos, frequentemente,

encontrada na zona central do ovócito (Figura 17, A). Apesar de não existir consenso, a granulidade central está associada a um potencial de implantação mais baixo e a um aumento das taxas de abortamento (Rienzi *et al.*, 2011; Saiz *et al.*, 2018).

- Vacúolos:

A formação de vacúolos de pequenas dimensões (5 a 10 μm) não está associada a nenhuma consequência negativa nos *outcomes* de desenvolvimento embrionário e clínico (Figura 17, B). Todavia, vacúolos de maiores dimensões (> 14 μm) estão relacionados a taxas de fertilização inferiores. Para além disso, ovócitos com vacuolização persistente, no período após singamia, pode interferir com os posteriores planos de divisão embrionária, resultando numa inferior taxa de blastocistos formados (Alpha SiRM & ESHRE SIGE, 2011; Saiz *et al.*, 2018).

- Agregados de retículo endoplasmático liso tubular (AREL):

Os agregados de retículo endoplasmático liso, são uma acumulação de bolsas de retículo endoplasmático liso, que tem uma forma circular ou elíptica, com aspeto liso rodeada por um aro (Figura 17, C). Está desaconselhada a utilização de ovócitos com AREL, uma vez que, esta alteração está associada a um desenvolvimento embrionário mais deficiente, uma baixa taxa de formação de blastocistos e ainda, a complicações obstétricas (Alpha SiRM & ESHRE SIGE, 2011; Saiz *et al.*, 2018). Contudo, já foram relatados nados vivos sem malformações resultantes de ovócitos com AREL, e por isso, alguns autores defendem que estes ovócitos podem ser microinjetados e se resultarem num embrião de boa qualidade, podem ser transferidos (Saiz *et al.*, 2018).

- Inclusões citoplasmáticas:

Relativamente, a inclusões citoplasmáticas, como corpos refratários, inclusões lipídicas, corpos necróticos, não existe um consenso na bibliografia sobre o seu impacto nas taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário (Figura 17, D) (Saiz *et al.*, 2018). Segundo Ebner *et al.* (2006), corpos refrateis parecem não ter impacto na taxa de fertilização, assim como na qualidade embrionária.

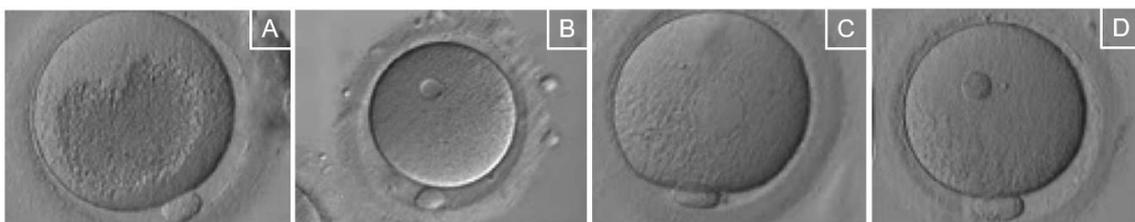


Figura 17. Exemplos de alterações morfológicas intracitoplasmáticas de ovócitos. A – Ovócito com centro granuloso; B – Ovócito com vacúolo; C – Ovócito com agregado de retículo endoplasmático liso; D – Ovócito com corpo necrótico. Adaptado de Rienzi *et al.* (2012).

4.2.4.4.2 Alterações Morfológicas Extracitoplasmáticas

- Zona Pelúcida:

Alterações da aparência da zona pelúcida (ZP), podem ser causadas por perturbações na secreção de glicoproteínas (Rienzi *et al.*, 2012). Uma ZP escura ou espessa (Figura 18, A), não tem sido correlacionada com nenhum resultado clínico, em ovócitos submetidos a ICSI. Um ovócito com ZP não regular (ovoide) pode interferir com a clivagem do embrião e provocar um desenvolvimento mais lento até à fase de blastocisto (Figura 18, B) (Rienzi *et al.*, 2012).

- Espaço Perivitelino:

O espaço entre a ZP e o oolema denomina-se de espaço perivitelino (EPV). Esta estrutura deve ser analisada, quanto à presença de detritos e quanto ao seu tamanho. Alguns estudos indicam que a presença de detritos no EPV, pode estar relacionada com uma administração excessiva de gonadotrofinas, durante o ciclo de estimulação ovárica, contudo são precisas evidências científicas mais sólidas para comprovar tal relação (Hassan-Ali *et al.*, 1998; Saiz *et al.*, 2018). A presença deste tipo de distorção parece não afetar as taxas de fertilização, clivagem, qualidade embrionária, assim como, os *outcomes* clínicos (Balaban & Urman, 2006). Um EPV aumentado (Figura 18, C) parece não afetar a qualidade embrionária, mas está associada a taxas de fertilização menores, assim como um mau desenvolvimento embrionário (Bormann, 2014; Saiz *et al.*, 2018).

- 1º Glóbulo polar:

Segundo o consenso de Istambul, não é aconselhável a injeção de ovócitos com o 1º GP aumentado, pois é indicativo de perturbações no fuso meiótico, com resultado numa má distribuição de cromossomas e consequentemente, poderá aumentar o risco de aneuploidia embrionária (Figura 18, D) (Alpha SiRM & ESHRE SIGE, 2011; Bormann, 2014; Saiz *et al.*, 2018). Relativamente, à fragmentação do 1º GP, não foi encontrada nenhuma relação significativa com as taxas de implantação e gravidez (Ciotti *et al.*, 2004; Bormann, 2014).

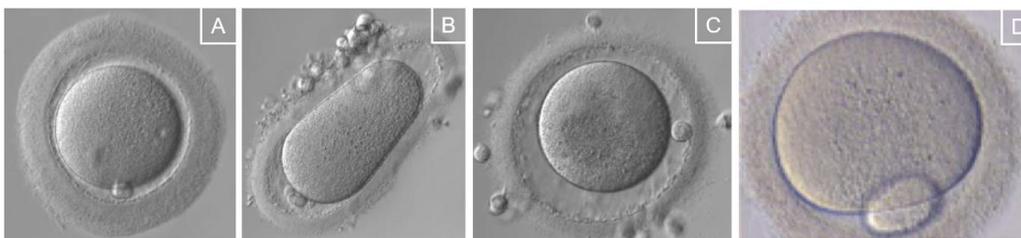


Figura 18. Exemplos de alterações morfológicas intracitoplasmáticas de ovócitos. A – Ovócito com zona pelúcida espessa; B – Ovócito com forma oval; C – Ovócito com espaço perivitelino aumentado; D – Ovócito com glóbulo polar aumentado. Adaptado de Rienzi *et al.* (2012).

4.2.4.5 Procedimento técnico da ICSI

A técnica de ICSI é realizada num microscópio ótico invertido, que deve ter na sua constituição objetivas $\times 10$, $\times 20$ e $\times 40$, com uma ótica de contraste *Hoffman*, que permite a visualização das células em placas de plástico (Dale & Elder, 2010d). Para além disso,

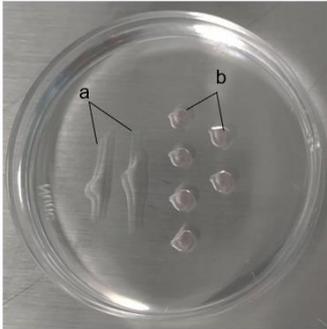


Figura 19. Placa para a realização da técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoide. Legenda: a – gotas alongadas de PVP; b – gotas de meio tamponado. Imagens propriedade da clínica Procriar – Centro de Obstetrícia e Medicina da Reprodução do Porto.

o microscópio deve estar equipado com uma platina termostaticada, calibrada para os 37°C e equipado com um sistema de micromanipulação, 2 micromanipuladores, que permitem o fino controlo tridimensional dos gâmetas e 2 microinjetores, associados às respetivas micropipetas de vidro, a de injeção e de sustentação (ou *holding*) (Mansour, 1998). A micropipeta de injeção permite aspiração de espermatozoides, imobilização e posterior microinjeção no ovócito. A micropipeta de sustentação permite segurar e imobilizar o ovócito (Dale & Elder, 2010d). As 2 micropipetas possuem na sua extremidade uma angulação de 30° ou 35° (de acordo, com as micropipetas utilizadas), que lhes permite ficarem paralelas à placa e facilitar a sua manipulação (Dale & Elder, 2010d).

Para realização da técnica propriamente dita, deve-se preparar uma placa com gotas de meio tamponado e 2 gotas alongadas de PVP (Polivinilpirrolidona) submersas, de imediato, numa camada de óleo mineral, como mostra a Figura 19. As gotas devem ocupar uma posição central, e evitar as faces laterais da placa, que impossibilita a manipulação das micropipetas. O PVP é um meio de elevada viscosidade, que tem como objetivo facilitar a manipulação dos espermatozoides, pois lentifica o seu movimento (Mansour, 1998). Devido ao potencial de toxicidade do PVP no oolema, é recomendável que se injete o espermatozoide com o menor volume possível de PVP. Para além disso, deve-se minimizar o tempo de exposição dos espermatozoides ao PVP, já que pode danificar a sua membrana citoplasmática (Dale & Elder, 2010d).

De seguida, colocam-se as pipetas de sustentação e de injeção e ajusta-se a posição e focagem das mesmas. Posteriormente, procede-se à transferência de uma alíquota da suspensão de espermatozoides, previamente, processada para a primeira gota de PVP. O volume retirado da suspensão espermática está dependente da concentração presente na amostra. Uma concentração muito elevada de espermatozoides pode dificultar a seleção e imobilização dos mesmos. Deve-se visualizar a gota de PVP ao

microscópio, para garantir a concentração suficiente de espermatozoides para a realização da técnica. De seguida, transfere-se os ovócitos para o meio tamponado. Ao microscópio, segue-se a seleção e imobilização de espermatozoides morfologicamente normais e de boa motilidade na gota de PVP, numa ampliação de 200x (Figura 20, A). Deve-se dar preferência aos espermatozoides encontrados na borda da gota. Os espermatozoides selecionados são aspirados através da pipeta de injeção e colocados na segunda gota de PVP, onde se procede à imobilização do espermatozoide. A imobilização é conseguida através da pressão mecânica da pipeta de ICSI, a formar um ângulo de 90° com a cauda do espermatozoide, contra a placa de ICSI (Figura 20 (B)). A quebra da cauda, irá destabilizar a membrana celular, e favorecer a libertação de fatores solúveis que induzem a ativação do ovócito (Yanagida *et al.*, 2001; Bormann, 2014). Os espermatozoides imobilizados são aspirados para a pipeta de injeção pela cauda. De seguida, posiciona-se a micropipeta de injeção sob a gota que contém os ovócitos. Quando visualizados os ovócitos, pode-se descer a pipeta de sustentação e posicioná-la perto do gâmeta feminino. Utilizando as duas pipetas, posiciona-se cuidadosamente, o ovócito com o GP às 11 ou 7 horas, e aspira-se, suavemente, o ovócito com a pipeta *holding* (Figura 20, C). A posição do GP é essencial para não danificar o fuso meiótico (Blake *et al.*, 2000; Anifandis *et al.*, 2010). De seguida, posiciona-se às 3 horas, no mesmo plano, a pipeta de injeção perto do ovócito. Move-se o espermatozoide para a ponta da pipeta de injeção, libertando o PVP para o meio. Injeta-se a micropipeta de injeção através da ZP (Figura 20, D). O ovócito pode criar alguma resistência à entrada da micropipeta. Deve-se garantir o rompimento da membrana do ovócito, através da aspiração da membrana, criando pressão negativa. O rompimento é visualizado pela subida súbita e repentina, de oolema para dentro da pipeta. De seguida, injeta-se, lentamente, o espermatozoide no oolema do ovócito e retira-se suavemente a pipeta. Deve-se observar a área de rutura, onde a membrana deve formar uma espécie de funil, para o interior (Figura 20, E). Este procedimento é repetido, até todos os ovócitos serem microinjetados. Uma vez concluída a técnica de ICSI, os ovócitos são lavados em meio de cultura e transferem-se para uma placa de *EmbryoScope* para cultura. A placa é colocada, imediatamente, na incubadora *EmbryoScope*, que possui uma atmosfera de 37°C, 6% de CO₂ e 5% de O₂.

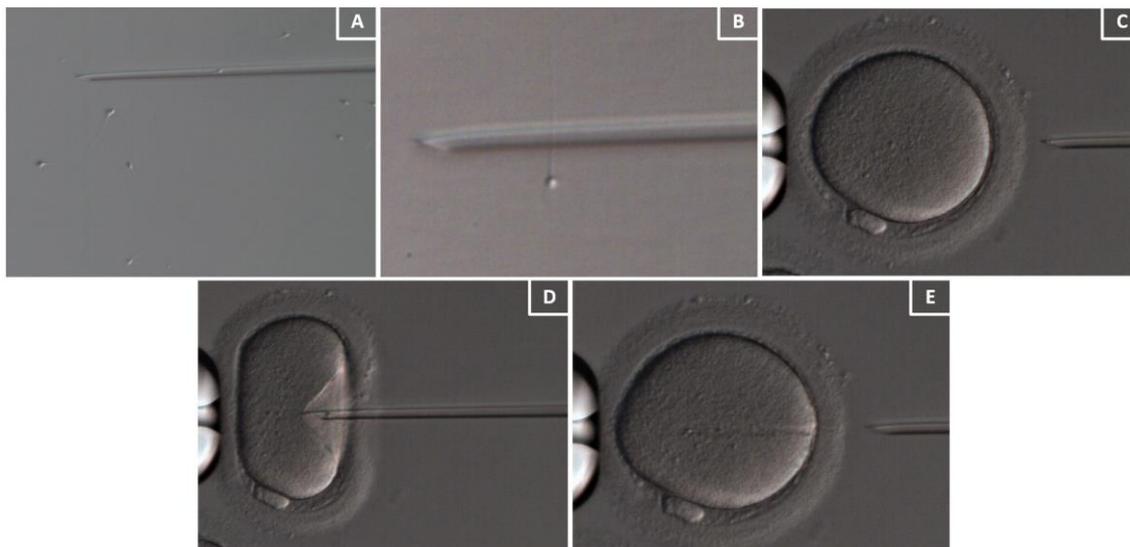


Figura 20. Passos implicados na realização da técnica de ICSI (Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide). A – Seleção do espermatozoide com melhor morfologia com o auxílio da micropipeta de injeção; B- Imobilização do espermatozoide; C – Posicionamento do glóbulo polar no ovócito às 7h; D – Microinjeção do espermatozoide no oolema do ovócito com a micropipeta de injeção posicionada às 3 h. E – Remoção da micropipeta, e formação de um pequeno funil no ovócito. Imagens propriedade da clínica Procriar – Centro de Obstetrícia e Medicina da Reprodução do Porto.

4.2.4.6 Avaliação do desenvolvimento embrionário

O consenso de Istambul definiu os tempos ideais para observação dos estados característicos de desenvolvimento embrionário (Alpha SiRM & ESHRE SIGE, 2011) (Tabela 6). A avaliação do desenvolvimento embrionário, com parâmetros morfocinéticos, pode ser acompanhada através da tecnologia *Timelapse*, integrado na incubadora *EmbryoScope* (Meseguer *et al.*, 2011). O uso desta tecnologia, devido à incorporação de uma câmara no interior da incubadora, permite uma monitorização contínua, através da captação de imagens dos embriões, num intervalo de tempo pré-definido (Kovacs, 2014). Com a recolha contínua de imagens dos embriões, é possível acompanhar o seu desenvolvimento, verificar a cinética de clivagem e visualizar a morfologia embrionária, ao longo do período de incubação, não sendo necessário retirar os embriões da incubadora, para serem observados ao microscópio ótico invertido (Meseguer *et al.*, 2011). Desta forma, evita-se a exposição à luz ambiente, variação de temperatura e osmolaridade. A cultura embrionária contínua é conseguida pela utilização de meios de cultura únicos (e não sequenciais). Os meios de cultura únicos fornecem todos os nutrientes necessários para as várias fases de desenvolvimento embrionário (Reed *et al.*, 2009).

Tabela 6. Tempos de observação esperados das várias fases de desenvolvimento, desde a fecundação até ao dia 5 de desenvolvimento embrionário. Legenda: hpi – horas pós-inseminação, ICSI – Injeção intracitoplasmática de espermatozoide, IVF – Fertilização *in vitro*. Tabela adaptada de Alpha SiRM and ESHRE SIGE (2011).

Tipo de observação	Tempo (hpi)	Estado expectável de desenvolvimento
Fecundação	17 ± 1	Pronúcleos
Singamia	23 ± 1	É expectável que 50% dos embriões se encontrem em singamia
Verificação de clivagem precoce	26 ± 1 após ICSI 28 ± 1 após FIV	Estado de clivagem com 2 células
Dia 2 de desenvolvimento	44 ± 1	Estado de clivagem com 4 células
Dia 3 de desenvolvimento	68 ± 1	Estado de clivagem com 8 células
Dia 4 de desenvolvimento	92 ± 2	Estado de mórula
Dia 5 de desenvolvimento	116 ± 2	Estado de blastocisto

4.2.4.6.1 Avaliação da fecundação

Após a realização de uma FIV ou ICSI, é necessário acompanhar o desenvolvimento de cada embrião. O sucesso da fertilização é observado entre 16-18 hpi, através da quantificação dos pronúcleos (PN), e dos glóbulos polares (GP). Idealmente, um ovócito fecundado possui 2 GP de tamanho semelhante, e 2 PN justapostos, de tamanhos semelhantes e bem definidos, com uma localização central. Ambos devem ter um número equivalente de corpos precursores de nucléolos (CPN) e, preferencialmente, os CPN devem estar na região de justaposição das membranas dos PN (Figura 21, A) (Alpha SiRM & ESHRE SIGE, 2011; Papale *et al.*, 2012). Quando os GP se encontram muito distantes, é sugestivo de um desenvolvimento embrionário mais fraco. A avaliação da posição, tamanho e número dos CPN, é sugestivo de bom desenvolvimento embrionário e implantação. Cada pronúcleo deve ter 5 a 7 CPN, de tamanho semelhante, alinhados na região de junção dos dois PN (Papale *et al.*, 2012). Quando ovócitos fecundados apresentam algum desvio ao padrão ideal, estão associados a embriões de baixa qualidade ao D3, menor taxa de formação de blastocisto e menores taxas de implantação (Scott, 2009). Para além disso, embriões com CPN polarizados estão relacionados com taxas de aneuploidia inferiores, quando comparados com CPN com uma distribuição anormal (Coskun *et al.*, 2003).

Em alguns casos é possível observar a formação de 3PN (Figura 21, C) ou mais. No caso da realização de uma FIV, pode ter ocorrido a penetração de 2 espermatozoides

no citoplasma do ovócito, devido a uma falha presente no bloqueio à polispermia. Em alguns casos a presença de múltiplos PN, pode resultar de falhas na citocinese ou pela penetração de um espermatozoide binucleado, em ciclos de ICSI. Apenas 1% dos ovócitos injetados são triploides (3PN), e são resultado da não extrusão do 2º glóbulo polar (Papale *et al.*, 2012). A presença de apenas 1 PN (Figura 21, B), pode ser indicativo de um erro durante a formação dos PNs ou durante a sua fusão, e apesar destes zigotos poderem ser diploides, estão associados a maiores taxas de aneuploidia. A combinação 1PN, com 2GP, está associada à ativação partenogénica (Papale *et al.*, 2012). Desta forma, sempre que se observa num zigoto uma combinação distinta de 2GP, com 2PN, o embrião deve ser eliminado, já que incorre numa maior probabilidade de obter um embrião aneuploide. Relativamente, ao posicionamento dos PN, caso estes se encontrem numa posição periférica, pode resultar numa má clivagem e paragem do desenvolvimento embrionário (Papale *et al.*, 2012).



Figura 21. Avaliação da fecundação, pela contagem de pronúcleos presentes no zigoto. A – Zigoto com 2 pronúcleos simétricos, com uma posição central e 2 glóbulos polares (16 hora após inseminação). B – Zigoto com 1 pronúcleo e 2 glóbulos polares (22 hora após inseminação); C – Zigoto com 3 pronúcleos (16.2 horas após inseminação). Todos os ovócitos foram inseminados pela técnica de ICSI. Imagens propriedade da clínica Procriar – Centro de Obstetrícia e Medicina da Reprodução do Porto.

A presença de um halo citoplasmático constitui um bom preditor do padrão de estado de clivagem, formação de blastocistos, e boas taxas de implantação (Ebner *et al.*, 2003; Ezoë *et al.*, 2020).

4.2.4.6.2 Avaliação do embrião em estado de clivagem

O estado de clivagem ocorre a partir do momento em que se verifica a primeira divisão mitótica (2 blastómeros) até à fase de início de compactação, com a formação de mórula (8 a 16 blastómeros). A clivagem precoce deve ser avaliada, e mostra-se como um importante preditor da formação de blastocistos e de implantação embrionária. Uma clivagem precoce caracteriza-se pela presença de 2 blastómeros às 26±1 hpi (Figura 22, A). Num estudo de Van Montfoort *et al.* (2004), onde foram comparados embriões

com clivagem precoce e embriões com clivagem tardia, verificaram-se taxas de gravidez, significativamente, superiores no grupo de clivagem precoce. Para além disso, as taxas de formação de blastocistos foram superiores e as de abortamento inferiores em comparação com grupo de clivagem tardia (Van Montfoort *et al.*, 2004). O número de blastómeros é o parâmetro mais importante, quando avaliado um embrião em estado de clivagem. Este deve ser avaliado às ± 44 hpi em D2 e às ± 66 hpi em D3. O número ideal de blastómeros nesta fase de desenvolvimento, é 4 células (Figura 22, B) e 8 células (Figura 22, C), a D2 e em D3, respetivamente (Saiz *et al.*, 2018). Um aspeto da morfocinética do embrião importante é o tempo de clivagem do embrião. Um embrião de boa qualidade deve apresentar divisões sincronizadas e apresentar a cinética de clivagem apropriada (Alpha SiRM & ESHRE SIGE, 2011; Prados *et al.*, 2012). Embriões com taxas de divisão muito lenta ou muito rápida, pode ser indicativo de defeitos metabólicos e/ou cromossómicos. Nestes casos, os embriões apresentam taxas de implantação inferiores e de aneuploidia superiores, quando comparados com embriões com taxa de divisão normal (Saiz *et al.*, 2018). A clivagem direta de 1 para 3 células também tem sido reportada como um fator de mau prognóstico, indicando uma pobre qualidade ovocitária, associada a uma baixa taxa de implantação (Rubio *et al.*, 2012).

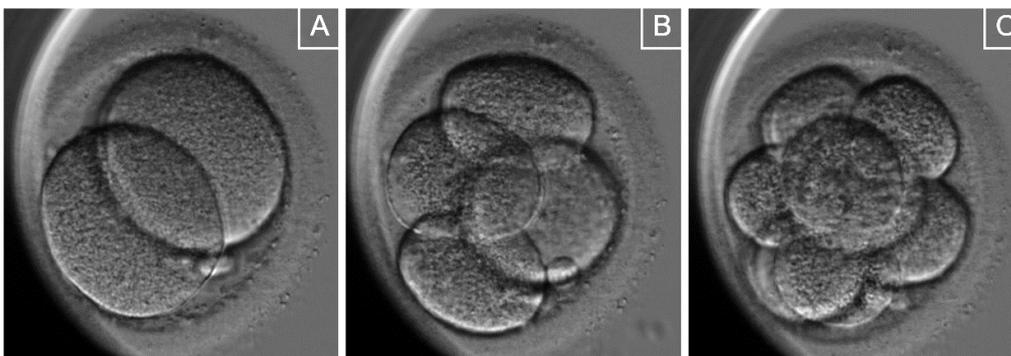


Figura 22. Embrião em fase de clivagem. A – Embrião com 2 células de tamanho semelhante; B – Embrião com 4 células com tamanho semelhante; C – Embrião com 8 células de tamanho semelhante. Imagens propriedade da clínica Procriar – Centro de Obstetrícia e Medicina da Reprodução do Porto.

Para além do número de blastómeros e da sua taxa de clivagem, outros parâmetros devem ser avaliados, nomeadamente, o tamanho e multinucleação dos blastómeros, a taxa de fragmentação, a presença de vacúolos, entre outros. Para avaliação do tamanho dos blastómeros formados, é usado o termo “estado-específico” para embriões em fase de clivagem, que possuam o tamanho adequado para o seu estado de desenvolvimento. Pelo contrário, o termo “estado não-específico” refere-se a um embrião com blastómeros de tamanho inadequado, para o número de blastómeros presentes. Embriões em “estado específico” são embriões que, possuem 2, 4, 8, 16 blastómeros com tamanho

semelhante (divisão sincronizada), ou embriões que se encontrem em estado intermédio (3, 5, 6, 7, 9, 10 células) com blastómeros de tamanhos distintos entre eles, já que não se verificou uma divisão sincronizada (Saiz *et al.*, 2018). A diferença entre “estado específico” e “estado não-específico” pode ser melhor compreendida analisando a Figura 23. Quando uma célula se divide em duas, com um diâmetro diferente, pode resultar numa anormal distribuição de moléculas citoplasmáticas, proteínas e mRNAs que pode estar relacionado com maiores taxas de multinucleação e aneuploidia (Prados *et al.*, 2012).

A multinucleação dos blastómeros entende-se pela presença de mais do que um núcleo por blastómero e é indicativo da presença de anomalias cromossómicas e, por isso, uma maior taxa de abortamento, não sendo aconselhável a sua transferência. Quando apenas é observado um núcleo por blastómero é considerado um bom prognóstico (Alpha SiRM & ESHRE SIGE, 2011; Prados *et al.*, 2012; Saiz *et al.*, 2018).

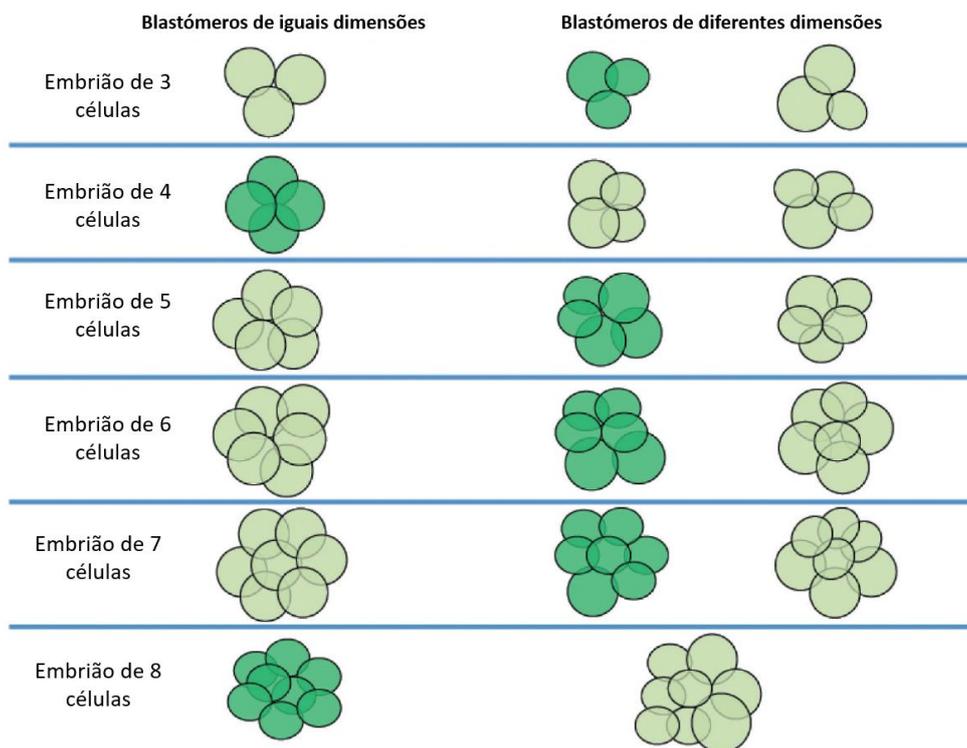


Figura 23. Modelo explicativo do significado de embrião em “estado específico”, e em “estado não-específico”. Os blastómeros (círculos) assinalados a verde-escuro são os embriões em “estado específico”, isto é, as células encontram-se com dimensões adequadas para o número de células presentes. Os blastómeros assinalados a verde-claro, formam um embrião em “estado não-específico”, isto é, as células não apresentam o tamanho adequado, dado ao número de blastómeros. Adaptado de Prados *et al.* (2012).

A fragmentação celular é entendida como um conjunto de estruturas sem núcleo formada por citoplasma de origem blastomérica, delimitadas por uma membrana celular.

A fragmentação celular é essencialmente distinguida dos blastómeros, pelas suas menores dimensões (Alpha SiRM & ESHRE SIGE, 2011; Saiz *et al.*, 2018). Segundo o consenso de Istambul (Alpha SiRM & ESHRE SIGE, 2011) podem ser distinguidas 3 categorias relativamente ao grau de fragmentação: <10% (fraca), 10-25% (moderada) e >25% (severa) (Alpha SiRM & ESHRE SIGE, 2011). Elevada fragmentação pode comprometer a formação de um blastocisto e interferir com a distribuição das células durante a diferenciação, o que compromete o normal desenvolvimento do embrião (Prados *et al.*, 2012). Quando a fragmentação do embrião é amplamente distribuída, o embrião incorre numa maior probabilidade de possuir anomalias cromossómicas, quando comparado com embriões com fragmentação localizada num determinado local (Saiz *et al.*, 2018). Embriões com uma taxa de fragmentação superior a 50%, não devem ser criopreservados ou transferidos, já que estão associados a baixas taxas de implantação (Saiz *et al.*, 2018).

Tabela 7. Classificação embrionária de embriões em estado de clivagem, segundo o ASEBIR. Legenda: Nº - Número; “→” – do dia 2 para o dia 3; SS – Estado específico; NSS – Estado não específico; bn – binucleação. Adaptado de Saiz *et al.* (2018).

Classificação	Dia	Nº células	% fragmentação	Simetria	Multinucleação	Outros
A	Dia 2	4	≤10%	SS	Sem	Normal
	Dia 3	8				
B	Dia 2	5	>10-25%	SS	Sem	≤50% pequenos vacúolos, ZP anormal
	Dia 3	5 → 7-10 4 → 7, 9, 10				
C	Dia 2	2, 3, 6	<25-25%	2, 4, 8 células NSS	1 célula bn	≤50% grandes vacúolos
	Dia 3	2, 3 → 6-9 6 → 8-10 6, 11, 12			1 ou 2 células bn	
D	Dia 2	3(NSS), >6	>35%	3 células NNS	Outos tipos de multinucleação	>50% vacúolos
	Dia 3	3-5, + 1 célula que no Dia 2				

O impacto da vacuolização embrionária está dependente do tamanho e número dos vacúolos. Enquanto que, pequenos vacúolos (<5 µm de diâmetro) não parecem provocar qualquer impacto negativo no desenvolvimento embrionário (Alpha SiRM &

ESHRE SIGE, 2011), uma vacuolização extensa pode ser prejudicial para o desenvolvimento embrionário (Prados *et al.*, 2012).

Tendo em conta os parâmetros anteriormente abordados, a ASEBIR (*Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción*) definiu uma tabela de classificação para embriões em estado de clivagem. Os embriões podem ser classificados em A, B, C e D, conforme o seu potencial de implantação, onde a classificação A é atribuída a embriões com maior probabilidade de implantação (Tabela 7). A classificação de D3 está dependente da classificação em D2.

4.2.4.6.3 Avaliação do embrião em estado de mórula

Em D4, cerca das 92 ± 2 hpi, é esperado que o embrião se encontre em estado de mórula, formada por uma massa compacta de células de 16 a 32 blastómeros (Alpha SiRM & ESHRE SIGE, 2011; Prados *et al.*, 2012). Os parâmetros essenciais para classificação de um embrião em estado de mórula é a adesão e a compactação celular. A adesão celular é o primeiro processo de compactação celular (Figura 24, A). Na fase de adesão é ainda possível distinguir a maioria dos blastómeros, mas as suas células possuem membranas adjacentes (Saiz *et al.*, 2018). A compactação deve-se a fortes junções entre os blastómeros, que impede que as células sejam diferenciadas (Figura 24, B). O início da compactação é sinal da ativação do genoma embrionário, as células deixam de ser totipotentes, para se poderem diferenciar em células especializadas (Prados *et al.*, 2012). O ideal é que a compactação inclua todos os blastómeros. Contudo, é possível que em determinados embriões, alguns blastómeros sejam excluídos do processo de compactação, o que é indicativo de uma menor taxa de implantação (Prados *et al.*, 2012). A classificação do estado de mórula, segundo o ASEBIR, está dependente da classificação do embrião a D3, do estado de adesão, compactação e cavitação (Saiz *et al.*, 2018), como é possível observar na Tabela 8.

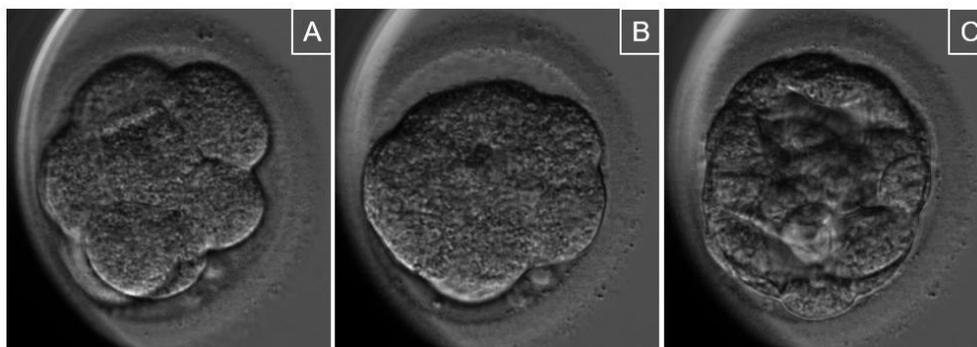


Figura 24. Fases do estado de mórula a D4. A – Embrião em estado de mórula, com adesão; B – Embrião em estado de mórula, totalmente compactado; C – Embrião em estado de mórula a iniciar o processo de cavitação. Imagens propriedade da clínica Procriar – Centro de Obstetrícia e Medicina da Reprodução do Porto.

Tabela 8. Classificação de embriões em estado de mórula, segundo o ASEBIR. Adaptado de Saiz *et al.* (2018).

Classificação D3	Aspetos morfológicos de D4	Classificação D4
A	Cavitação inicial Total compactação, > 8 células	A
	Compactação parcial (1-2 células excluídas)	B
	Compactação parcial (>2 células excluídas) Sem compactação	C
B	Cavitação inicial Total compactação, > 8 células Compactação parcial (1-2 células excluídas)	B
	Compactação parcial (>2 células excluídas) Sem compactação	C
C	Cavitação inicial Total compactação, > 8 células	C
	Compactação parcial Sem compactação (>8 células)	D
D	> 35% fragmentação Vacuolização difusa < 50% compactação	D

4.2.4.6.4 Avaliação do embrião em estado de blastocisto

O estado de blastocisto deve ser visualizado, idealmente, entre as 115 e 117 hpi em D5, ou quando o embrião tem um desenvolvimento mais tardio a D6, entre as 136 e 140 hpi. Segundo a literatura, apenas 40 a 60% dos ovócitos fecundados chegam a esta fase de desenvolvimento (Saiz *et al.*, 2018).

Ainda em fase de mórula o embrião inicia o processo de cavitação, com o aumento crescente de produção de líquido (Hardarson *et al.*, 2012). A observação de um blastocélio expandido, corresponde à maturação do trofoblasto e está relacionada com uma boa taxa de implantação (Saiz *et al.*, 2018). A zona pelúcida vai sofrendo um processo de afinamento, devido à constante expansão do blastocélio (Saiz *et al.*, 2018). À medida que o embrião expande, vai sendo possível a diferenciação da trofoectoderme e da massa celular interna (MCI). Idealmente, a trofoectoderme deve ser formada por um epitélio homogéneo, formado por células elípticas e de tamanho regular (Figura 25, A). A trofoectoderme é um elemento fundamental do blastocisto, já que, dará origem à placenta e às estruturas extraembrionárias. Uma trofoectoderme de boa qualidade está associada a elevadas taxas de implantação. A MCI deve ser uma massa celular compacta, de forma oval (Figura 25, A). Esta estrutura dará origem ao feto, propriamente dito (Hardarson *et al.*, 2012; Saiz *et al.*, 2018).

A ASEBIR propôs uma tabela de classificação de embriões em fase de blastocisto, baseada no grau de expansão, características morfológicas da trofoectoderme e MCI,

em D5 e D6, como é possível verificar na Tabela 9 e 10, respetivamente. A classificação final do embrião, incide sobretudo no aspeto da trofoectoderme (Saiz *et al.*, 2018). A MCI é classificada como: “A”, quando apresenta um volume adequado e totalmente compacta (Figura 25 (A)); “B”, quando tem o tamanho adequado, mas ligeiramente dispersa; “C”, quando possui um tamanho muito reduzido; “D”, quando está a degenerar. Em relação à trofoectoderme, esta é classificada como: “A”, quando possui muitas células, com uma forma elíptica, homogénea e coesiva ((Figura 25 (A)); “B”, quando é homogénea, mas possui poucas células; “C”, quando possui poucas células; “D”, quando está a passar por um processo de degeneração. Durante a expansão do blastocisto é comum que, por vezes este colapse. Quando tal acontece no momento da avaliação, deve-se aguardar 1 a 2 h, para nova avaliação e permitir reexpansão do blastocisto (Alpha SiRM & ESHRE SIGE, 2011). Os embriões podem ainda ser classificados por um sistema numérico de 1 a 6, relativamente, ao seu grau de expansão (Figura 25), conforme o indicado na Tabela 11.

Tabela 9. Classificação de embriões em estado de blastocisto ao Dia 5, segundo o ASEBIR. Legenda: MCI – Massa celular interna; TE – Trofoectoderme. Adaptado de Saiz *et al.* (2018).

Dia 4	Dia 5			
	Grau de expansão	MCI	TE	Classificação
Mórula Compacta	De expansão inicial até eclosão	A	A	A
			B	B
			C	C
			D	D
		B	A	A
			B	B
			C	C
			D	D
		C	A	A
			B	B
			C	C
			D	D
		D	A, B, C ou D	D
		Blastocisto inicial ou a cavitár		
Mórula não compacta	Mórula			D

Tabela 10. Classificação de embriões em estado de blastocisto ao Dia 6, segundo o ASEBIR. Legenda: MCI – Massa celular interna; TE – Trofoectoderme. Adaptado de Saiz *et al.* (2018).

Dia 5	Dia 6			
	Grau de expansão	MCI	TE	Classificação
Blastocisto inicial ou a cavitar	De expansão inicial até eclosão	A	A	B
			B	
			C	C
			D	D
		B	A	B
			B	
			C	C
			D	D
		C	A	B
			B	
			C	C
			D	D
	D	A, B, C ou D	D	
	Blastocisto inicial ou a cavitar			
Mórula não compacta	Mórula			Excluído

A classificação embrionária ao longo do seu desenvolvimento, mostra-se de extrema importância para auxiliar a decisão de qual embrião deve ser transferido ou que embriões devem ser vitrificados.

Tabela 11. Classificação do grau de expansão do blastocisto. Legenda: ZP – Zona pelúcida. Adaptado de Alpha SiRM and ESHRE SIGE (2011).

Grau 1	Blastocélio ocupa metade do volume total do embrião.
Grau 2	Blastocélio a ocupa metade do volume do embrião.
Grau 3	Blastocélio ocupa o volume total do embrião.
Grau 4	Blastocélio maior que o tamanho inicial do blastocisto, e ZP mais fina.
Grau 5	Blastocisto de grandes dimensões a eclodir por uma região da ZP.
Grau 6	Blastocisto completamente eclodido.



Figura 25. Embrião em fase de blastocisto, D5. A – Blastocisto 4 AA; B – Blastocisto 5 AB; C – Blastocisto a eclodir, libertando-se da zona pelúcida. Imagens propriedade da clínica Procriar – Centro de Obstetrícia e Medicina da Reprodução do Porto.

4.2.5 Caso 3 (B) – Transferência embrionária a fresco

Este caso clínico é a continuação do referido no ciclo ICSI (Caso 3 (A), Secção 4.2.4). Dadas as ótimas condições de recetividade uterina (endométrio com uma espessura de 9.3 mm), doseamento de progesterona de 0.60 ng, e formação de blastocistos, decidiu-se avançar para a transferência embrionária a fresco de 2 blastocistos (BL 3AB, BL 3BB), ao D5 de desenvolvimento embrionário.

4.2.5.1 Enquadramento teórico

A transferência embrionária (TE) é considerada um método simples, mas de extrema importância, já que constitui a última etapa de um tratamento de PMA. Esta técnica consiste no carregamento do embrião para um cateter de transferência, pelo embriologista, seguido da transferência do embrião para a cavidade uterina, pelo médico ginecologista. As taxas de implantação são influenciadas, principalmente, pela idade materna, protocolo de estimulação ovárica, a recetividade uterina, qualidade dos gâmetas e embriões e a eficácia da técnica de TE (Cetin *et al.*, 2010).

Vários são os fatores que afetam o sucesso da técnica de TE. Estes fatores podem ser divididos em fatores laboratoriais e clínicos. Relativamente, aos fatores laboratoriais, destacam-se os seguintes: (1) o intervalo de tempo entre o carregamento do embrião no cateter e a TE, parece ter um papel fulcral nas taxas de implantação e gravidez. Num estudo de Matorras *et al.* (2004), concluíram que tempos superiores a 120 s afetavam, negativamente, as taxas de implantação. O intervalo de tempo entre o carregamento e a TE deve ser o menor possível, para diminuir a exposição do embrião à mudança de temperatura, pH e incidência de luz (Matorras *et al.*, 2004); (2) a escolha do cateter

também influencia a eficácia do método. Foi demonstrado que cateteres mais suaves e flexíveis levam a taxas de gravidez superiores, do que a utilização de cateteres mais rígidos e firmes (Abou-Setta *et al.*, 2005; Buckett, 2006); (3) o volume e presença de bolhas de ar. Volumes superiores a 60 μL aumentam a probabilidade de expulsão do embrião da cavidade uterina. Volumes reduzidos ($<10\mu\text{L}$) em combinação com bolhas de ar, também estão associados a menores taxas de implantação, uma vez que, pode resultar numa insuficiente envolvência do embrião pelo meio (Ebner *et al.*, 2001); (4) condições de cultura embrionária subótimas, como variações de temperatura, pH, percentagem de O_2 na cultura, entre outros parâmetro físicos e químicos, possuem um papel fundamental no potencial de implantação (Wale & Gardner, 2016). As variações destes fatores podem afetar o normal metabolismo do embrião e perturbar a expressão e transcrição genética (Wale & Gardner, 2016).

Em relação aos fatores clínicos, destacam-se os seguintes: (1) é recomendável a realização da TE ecoguiada de forma a auxiliar a inserção do cateter na cavidade uterina, e verificar em que posição é colocado o embrião, evitando o contacto do cateter com o fundo uterino, já que pode provocar contrações uterinas (Mains & Van Voorhis, 2010); (2) a presença de contrações uterinas diminui as taxas de implantação e gravidez clínica (Fanchin *et al.*, 1998); (3) a facilidade com que a transferência embrionária ocorre também influencia as taxas de sucesso. Transferências embrionárias consideradas difíceis, isto é, que têm uma durabilidade superior à normal, que são desconfortáveis para a mulher, e que envolvem o uso de instrumentos adicionais, como pinça de pozzi ou histerómetro, podem comprometer o potencial de implantação (Mains & Van Voorhis, 2010). A dificuldade da transferência está, também, associada à presença de sangue no cateter, que quando presente está relacionado com taxas inferiores de gravidez (Goudas *et al.*, 1998); (4) a presença de muco no canal cervical pode obstruir a ponta do cateter impedindo a saída do embrião, ou no momento da extração do cateter o embrião aderir ao muco presente ao redor do cateter e não permanecer na cavidade uterina (Mains & Van Voorhis, 2010). Por esse motivo, é aconselhável remover o muco com o auxílio de uma gaze embebida em meio de transferência; (5) a profundidade a que o embrião é colocado na cavidade uterina. O embrião deve ser colocado entre 15 a 20 mm do fundo uterino (Coroleu *et al.*, 2002).

No que diz respeito, à fase de desenvolvimento a que o embrião deve ser transferido é um tema ainda em debate. Inicialmente, devido aos sistemas rudimentares de cultura embrionária, os embriões eram transferidos em fase de clivagem (D2/D3). Atualmente, com os sistemas de cultura otimizados, e a possibilidade de cultura até à fase de

blastocisto, ocorre uma grande dicotomia entre vários autores, e as opiniões dividem-se em transferência realizada em fase de clivagem (D2/D3) ou de blastocisto (D5/D6) (Kaser *et al.*, 2014). Alguns estudos demonstram que, as taxas de implantação e gravidez são semelhantes quando a transferência embrionária ocorre ao D3, ou ao D5 de desenvolvimento embrionário (Huisman *et al.*, 2000). Contudo, outros estudos demonstraram o contrário, defendendo que a cultura até à fase de blastocisto confere múltiplas vantagens, já que permite: (i) a identificação dos embriões que tiveram a capacidade de ativação genómica, que se verifica, normalmente, pelo D3 de desenvolvimento. Na ausência de ativação do genoma, a probabilidade da sobrevivência e implantação do embrião é baixa (Maheshwari *et al.*, 2016); (ii) melhor sincronização temporal entre a fase de desenvolvimento embrionário e a receptividade uterina no momento da transferência, já que, naturalmente, é em fase de blastocisto que o embrião chega à cavidade uterina (Kaser *et al.*, 2014; Maheshwari *et al.*, 2016); (iii) possibilidade de seleção de embriões com melhor capacidade de desenvolvimento e maior capacidade de implantação, dada a maior informação que estes embriões revelam (Huisman *et al.*, 2000; Reh *et al.*, 2010; Kaser *et al.*, 2014); (iv) por fim, devido à melhor capacidade de seleção, permite uma diminuição de embriões transferidos (Reh *et al.*, 2010), que por sua vez, (v) diminui as taxas de gravidez múltipla (Reh *et al.*, 2010). O dia da transferência embrionária vai depender do número de ovócitos fecundados, da morfologia embrionária e da idade da paciente. Caso a paciente possua um número reduzido de ovócitos fecundados (± 4) é ponderada a transferência a D3. Apesar das inúmeras vantagens da TE na fase de blastocisto, também existem algumas desvantagens, como a diminuição ou ausência de embriões para a realização da transferência, por paragem no desenvolvimento ou degeneração, o que aumenta o número de transferências canceladas, por ausência de embrião (Kaser *et al.*, 2014).

Em relação ao número de embriões transferidos, deve-se privilegiar a transferência de apenas 1 embrião, com vista a evitar a gravidez múltipla. Contudo, o número de embriões a serem transferidos, deve depender da qualidade e estado de desenvolvimento do embrião, idade materna e resposta ovocitária (Santos *et al.*, 2016). No caso de mulheres com idade inferior a 35 anos, e casos de embriões resultantes de uma doação de ovócitos, apenas 1 embrião deve ser transferido (CNPMA, 2021). Os embriões supranumerários podem ser criopreservados, doados, ou descartados conforme a qualidade embrionária e o desejo do casal/beneficiária expresso em sede de consentimento informado (Santos *et al.*, 2016).

Os critérios de seleção do(s) embrião(ões) são baseados tanto na morfologia, como na cinética de clivagem. O embrião com parâmetros ideais de cinética e morfologia (descritos na Secção 4.3.4), são eleitos para a transferência. Caso a clínica não esteja equipada com o sistema *Timelapse* o critério de seleção é baseado apenas na classificação estática do embrião.

4.2.5.2 Procedimento da transferência embrionária a fresco

No dia da transferência embrionária a fresco procede-se à avaliação do desenvolvimento dos embriões formados. O embrião com as melhores características morfocinéticas será selecionado para a transferência. O embrião selecionado é transferido da placa de cultura para uma placa com meio de transferência, submersa em óleo mineral. A placa é novamente incubada a 37°C, 6% de CO₂, e de 5% O₂, cerca de 15 min. Os embriões supranumerários podem ser vitrificados, descartados ou mantidos em cultura no máximo até ao D6.

A paciente é encaminhada para a sala de TE, e colocada em posição ginecológica e a médica procede à introdução do espéculo para exposição do colo uterino. De seguida, é realizada a lavagem do muco presente na cavidade, com uma compressa. Com o auxílio da ecografia abdominal, procede-se a introdução do cateter de transferência externo através do canal cervical. Assim que a médica informa que introduziu com sucesso o cateter externo, o embriologista pode avançar com o carregamento do embrião, ao estereomicroscópio. Inicialmente, o cateter é limpo em meio de cultura e 1 mL de ar é aspirado com a seringa acoplada ao cateter interno. Esta pequena faixa de ar vai permitir a expulsão de todo o líquido presente no cateter. De seguida, é aspirado uma pequena quantidade de meio de cultura, seguido da aspiração do embrião. O cateter é novamente lavado em meio de cultura, para limpar os vestígios de óleo, e entregue na sala de TE, de imediato. O médico ginecologista insere o cateter interno no interior do cateter externo, e descarrega cuidadosamente o conteúdo presente no cateter. Na imagem de ecografia é possível observar a saída do líquido. O cateter é removido, lenta e cuidadosamente. Após a transferência, propriamente dita, o cateter deve ser analisado ao estereomicroscópio, realizando sucessivas lavagens em meio de transferência, para verificação da presença ou ausência de embrião retido. Pode ocorrer a retenção do embrião no cateter de transferência, quando se verifica alguma dificuldade durante a técnica, ou quando o cateter fica com muco ou sangue. A paciente permanece em repouso por um período de 10 a 15 min. O teste de gravidez deve ser realizado 15 dias após a transferência.

4.2.6 Caso 3 (C) – Criopreservação de embriões e sua transferência

O embrião supranumerário resultante do ciclo de ICSI (Caso 3, secção 4.2.5) foi criopreservado, para futura transferência.

4.2.6.1 Enquadramento teórico

A primeira gravidez resultante de um embrião criopreservado foi datada em 1983 (Trounson & Mohr, 1983), sendo que o primeiro nado vivo reportada a 1984 (Zeilmaker *et al.*, 1984). Desde então, os protocolos de criopreservação têm vindo a ser otimizados e a criopreservação de embriões assume-se como uma técnica eficaz, e é amplamente, utilizada a nível mundial. A nível europeu a proporção de ciclos com transferência de embriões criopreservados tem vindo a aumentar em relação aos ciclos com embriões transferidos a fresco. Em 2014, a transferência de embriões criopreservados representava em relação à transferência a fresco, 37.8% dos casos, em 2015, e no último relatório, em 2016, representava 44.1% dos ciclos (Wyns *et al.*, 2020).

Inicialmente, o método de eleição para criopreservação de embriões era a congelação lenta, contudo apesar de amplamente utilizada em inúmeros centros de PMA, esta técnica foi paulatinamente abandonada dado não evitar totalmente a formação de cristais de gelo. Assim, surgiu a vitrificação, que previne a formação destes cristais de gelo, com uso de elevadas concentrações de crioprotetor, associadas a taxas de arrefecimento, também, muito elevadas (Rodriguez-Wallberg *et al.*, 2019), uma vez que, o crioprotetor contém propriedades tóxicas para as células vivas, e o volume e o tempo de exposição das células aos crioprotetores deve ser baixo (Rodriguez-Wallberg *et al.*, 2019). A vitrificação tem mostrado taxas de sucesso significativamente superiores, quando comparadas com a técnica de congelação lenta. Vários estudos apontam para taxas de sobrevivência embrionária após desvitrificação (Loutradi *et al.*, 2008; Kolibianakis *et al.*, 2009; M. Valojerdi *et al.*, 2009), implantação e gravidez clínica (M. Valojerdi *et al.*, 2009; AbdelHafez *et al.*, 2010), superiores, em embriões resultantes da técnica de vitrificação, relativamente, a embriões resultantes da técnica de congelação lenta.

A criopreservação de embriões tem como grande vantagem o armazenamento de embriões supranumerários de qualidade que resultam de ciclos de PMA. A possibilidade de armazenamento, por sua vez, possibilitou um leque de vantagens: a diminuição de embriões transferidos por ciclo, e conseqüentemente, uma diminuição das taxas de gravidez múltipla; redução da necessidade da repetição de ciclos de estimulação; e

aumento das taxas cumulativas de gravidez (Evans *et al.*, 2014; Argyle *et al.*, 2016). A criopreservação de embriões também permitiu a realização da biópsia embrionária em fase de blastocisto (Sciorio & Esteves, 2020).

A aplicação da metodologia “*freeze all*” tem vindo a sofrer um aumento gradual pelos vários laboratórios de PMA e consiste na criopreservação de todos os embriões resultantes de um ciclo de tratamento de FIV/ICSI, diferindo a realização da transferência. Tal conquista deve-se às técnicas de vitrificação cada vez mais otimizadas. Para além disso, o que se destaca nesta abordagem, é que as taxas de gravidez após transferência de embriões desvitrificados estão cada vez mais próximas, das taxas de ciclos a com TE a fresco, e em alguns estudos, as taxas chegam mesmo a ser superiores (Stormlund *et al.*, 2020). O aumento das taxas de gravidez em ciclos com embriões criopreservados deve-se, essencialmente, a uma preparação endometrial mais dirigida. Os protocolos de estimulação hormonal realizados em ciclos de PMA, parecem interferir na preparação endometrial e posterior implantação. Os níveis de estrogénios e de progesterona no decorrer de um tratamento de estimulação ovocitária, estão associados a um aceleração do desenvolvimento endometrial podendo ter como consequência uma diminuição da recetividade uterina, e desta forma a diminuição da taxa de implantação (Roque *et al.*, 2013; Stormlund *et al.*, 2020). Assim, é essencial dosear os níveis de progesterona, no momento da punção folicular, como auxílio à decisão de uma transferência a fresco ou diferida. O método *freeze all*, também, assume um papel importante na prevenção da síndrome de hiperestimulação ovárica (OHSS). O que parece impulsionar o desenvolvimento desta condição é a hCG administrada para desencadear a maturação ovocitária final. Caso, após transferência embrionária a fresco, resultasse uma gravidez, a hCG libertada pelas células do trofoblasto do embrião iriam prolongar e agravar os sintomas desta síndrome (Evans *et al.*, 2014).

Uma das consequências da técnica de criopreservação embrionária é um endurecimento da zona pelúcida, o que pode impedir o processo natural de eclosão. Este processo é essencial para o sucesso da implantação. Vários estudos indicam que a realização de uma abertura na zona pelúcida do embrião criopreservado, logo após a desvitrificação, facilita a eclosão do embrião e, por isso, aumenta as taxas de implantação e gravidez clínica (Gabrielsen *et al.*, 2004; Balaban *et al.*, 2006; M. R. Valojerdi *et al.*, 2008). Por vezes, 2 h após a realização da referida abertura, é possível observar o início do processo de eclosão, como mostra a Figura 26 (C). Desta forma, a técnica de “*assisted hatching*” (eclosão assistida) tornou-se uma técnica muito

importante quando manipulados embriões criopreservados que são depois transferidos (Figura 26).



Figura 26. Imagens de um embrião vitrificado para transferência embrionária. A – Embrião de qualidade 4AA, após desvitrificação; B – Embrião após eclosão assistida com a emissão e raios laser, logo após a desvitrificação. É possível observar que o embrião colapsou; C – Embrião momentos antes da transferência embrionária (2/3 horas após desvitrificação), é possível observar o início do processo de eclosão. Ampliação da imagem A, B e C de 200x. As imagens são propriedade da clínica Procriar – Centro de Obstetrícia e Medicina da Reprodução do Porto.

4.2.6.2 Procedimento da vitrificação embrionária

Para a vitrificação embrionária segue-se a metodologia proposta por *Kitazato*. Os meios utilizados, ES (solução de equilíbrio) e o VS (solução de vitrificação) são colocados a equilibrar à temperatura ambiente, durante 1 hora. Primeiramente, deve-se identificar as palhetas com o nome da paciente, código interno, número e qualidade dos embriões vitrificados e data da vitrificação. Os poços da placa de vitrificação são preenchidos com os meios ES e VS, como mostra a Figura 27, (1). De seguida, o embrião é transferido da placa de cultura, para o primeiro poço com ES, como ilustrado na Figura 27, (2), para equilíbrio. O passo final da vitrificação, consiste na transferência do embrião para o meio VS, com o menor volume de meio ES, onde são realizadas sucessivas pipetagens (como ilustrado na Figura 27, (2) para envolvimento total do embrião com o meio de vitrificação. Este processo não deverá ultrapassar 1 minuto. De seguida, o embrião é transferido com o mínimo de meio possível e colocado na palheta. Por último, a palheta é mergulhada e agitada vigorosamente, em azoto líquido. A palheta é armazenada num contentor de azoto líquido, a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

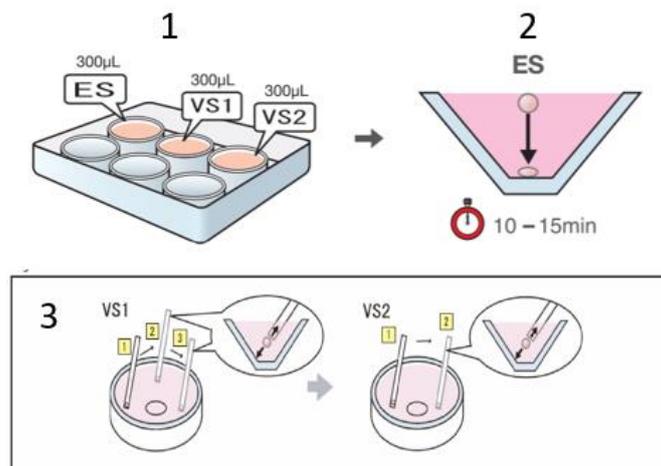


Figura 27. Esquema da metodologia de *Kitazato* para vitrificação embrionária. Adaptado de Kitazato (2019).

4.2.6.3 Procedimento de desvitrificação e transferência embrionária

Para a desvitrificação embrionária segue-se a metodologia de *Kitazato*. Primeiramente, é necessário colocar durante 1 hora o meio TS (meio de desvitrificação) a equilibrar numa incubadora a 37°C, e os restantes meios à temperatura ambiente. O embrião deve manter-se sempre mergulhado em azoto líquido. A metodologia seguida é ilustrada da Figura 28. No final, do procedimento de desvitrificação, propriamente dito, o embrião é visualizado ao microscópio ótico invertido, para verificação da sua viabilidade e de seguida é realizado uma abertura na zona pelúcida através da emissão de um feixe de raios *lasers*. Por fim, a placa é colocada a incubar a 37°C, 6% CO₂, 5% O₂, durante um período mínimo de 2 h e máximo de 4 h até à transferência, para permitir que o embrião recupere completamente e inicie o processo de expansão e eclosão. O carregamento do embrião e procedimento de transferência é realizado de igual modo à transferência embrionária a fresco, conforme o descrito na Secção 4.4.1.

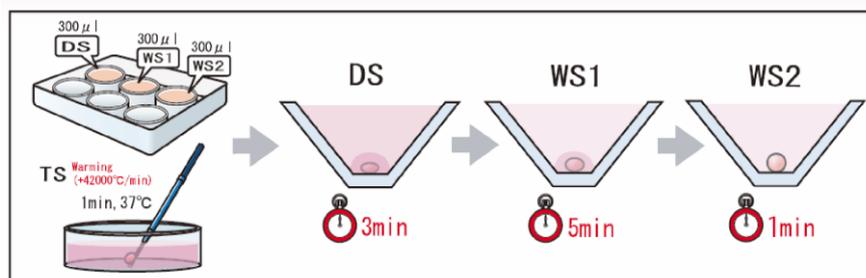


Figura 28. Esquema da metodologia de *Kitazato* para desvitrificação embrionária. TS – Solução de desvitrificação; DS – Solução de diluição; WS – Solução de lavagem. Adaptado de Kitazato (2019).

4.2.7 Caso 4 – Vitriificação e desvitrificação de ovócitos

Tabela 12. Informação clínica e laboratorial do casal do caso clínico 4, indicado para vitriificação ovocitária.

Mulher ♀
28 anos de idade Oncofertilidade (Tumorectomia mama por cancro da mama invasor) Necessidade de ciclos de quimioterapia Indicação para preservação da fertilidade Protocolo de estimulação: Curto com antagonista Dose total de estimulação: 2250 UI FSH Dias de estimulação: 10 Nº ovócitos recuperados: 15 Nº ovócitos maduros: 9 Nº ovócitos vitriificados: 9

4.2.7.1 Enquadramento teórico

A criopreservação de ovócitos foi considerada por largos anos, como uma técnica experimental, onde as taxas de sobrevivência se mostravam muito baixas o que não assegurava o uso na rotina diária de um laboratório de PMA. Nos últimos anos, foram desenvolvidos protocolos de criopreservação, suficientemente eficazes para a criopreservação de gâmetas femininos (Borini & Coticchio, 2008). O principal desafio da criopreservação de ovócitos, é assegurar a sua sobrevivência após a descongelação. O tamanho e a forma do ovócito, a sua fragilidade, no que respeita ao fuso miótico, são os dois dos grandes desafios ao sucesso da criopreservação (Kuwayama, 2008).

Os ovócitos podem ser criopreservados por congelação lenta ou vitriificação, embora esta última, é o método rotineiramente utilizado e o mais eficaz. Os protocolos de vitriificação são caracterizados pelas elevadas concentrações de crioprotetor, assim como, elevadas taxas de arrefecimento. Estas 2 características são fundamentais para evitar a formação de cristais de gelo, o grande problema que se depara aquando a congelação pelo método de criopreservação lenta (Vajta & Kuwayama, 2006). A formação de cristais de gelo é incompatível com a viabilidade celular, já que provoca danos físicos e estruturais irreversíveis no ovócito, muito relacionados com a qualidade do próprio ovócito (Borini & Coticchio, 2008). Na vitriificação a velocidade de arrefecimento é extremamente alta (taxa de arrefecimento $>2.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Chian *et al.*, 2014)), tornando as células num estado vítreo, evitando a formação de cristais de gelo. Comparativamente, à técnica de congelação lenta (taxa de arrefecimento de $0,3\text{-}2^{\circ}\text{C}/\text{min}$), a vitriificação é mais simples, e com taxas de eficácia muito superiores. Desta

forma, o método de criopreservação lenta, tem vindo a ser substituído pelo método de vitrificação, a nível global (Vajta & Kuwayama, 2006).

Num estudo, onde foram comparados os resultados de ciclos obtidos com ovócitos a fresco e vitrificados de dadoras do mesmo *coorte* de ovócitos, os autores não encontraram diferenças significativas entre os 2 grupos, relativamente, às taxas de fecundação, de qualidade embrionária, implantação e de nados vivos. Solé *et al.* (2013), concluíram que a vitrificação dos ovócitos não afeta a sua funcionalidade, nem a capacidade do ovócito fecundado desenvolver-se num embrião e resultar numa gravidez. Outros estudos corroboraram estes resultados (Cobo *et al.*, 2008; Trokoudes *et al.*, 2011).

A consolidação das taxas de sucesso resultantes da utilização de ovócitos vitrificados, permitiram, de forma segura, a utilização da vitrificação, para inúmeras utilizações, nomeadamente: (1) na preservação da fertilidade, em mulheres submetidas a quimioterapia, radioterapia, ou outros tratamentos gonadotóxicos (Noyes *et al.*, 2010; Cobo *et al.*, 2016); (2) na preservação da fertilidade, por motivos sociais, isto é, a mulher projeta o seu desejo de maternidade para uma idade mais tardia (Stoop *et al.*, 2011; Garcia-Velasco *et al.*, 2013); (3) pacientes que padeçam de outras doenças que possam comprometer a sua fertilidade, como a endometriose, o risco de falência ovárica precoce (Cobo *et al.*, 2016; Cobo *et al.*, 2020); (4) na criação de bancos de ovócitos (Trokoudes *et al.*, 2011); (5) para acumulação de ovócitos, em pacientes com baixa reserva ovárica (Chian *et al.*, 2014).

4.2.7.2 Procedimento da técnica de vitrificação ovocitária

A vitrificação de ovócitos, implica uma primeira fase de estimulação oocitária, com posterior punção folicular tal como descrito na Secção 4.2.1, 4.2.2. Após 2 h em cultura a 37°C, 6% CO₂, 5% O₂, os ovócitos devem ser desnudados, sendo que apenas os encontrados em estado de metáfase II são vitrificados de imediato. Para tal, segue-se a metodologia de *Kitazato*. Os meios utilizados devem ser equilibrados à temperatura ambiente durante 1 hora. Primeiramente, as palhetas de vitrificação são identificadas com o nome da paciente, código interno atribuído, data e número de ovócitos presentes na palheta. O procedimento de vitrificação ovocitária segue o descrito no protocolo de *Kitazato* (Figura 29). Inicialmente, os ovócitos são colocados em 20 µL de solução básica (BS), onde, posteriormente, são embebidos numa solução de equilíbrio (ES), faseadamente, como ilustrado na Figura 29, (1). Aos 9 min, os ovócitos são transferidos para o poço com VS, onde sofrem sucessivas pipetagens, como exemplificado na Figura

29, (2). Os ovócitos são carregados numa palheta de vitrificação, com o mínimo volume possível. No máximo são congelados 3 ovócitos por palheta. A palheta com os ovócitos, é de imediato submersa em azoto líquido, e armazenada em tanques de azoto (- 196°C).

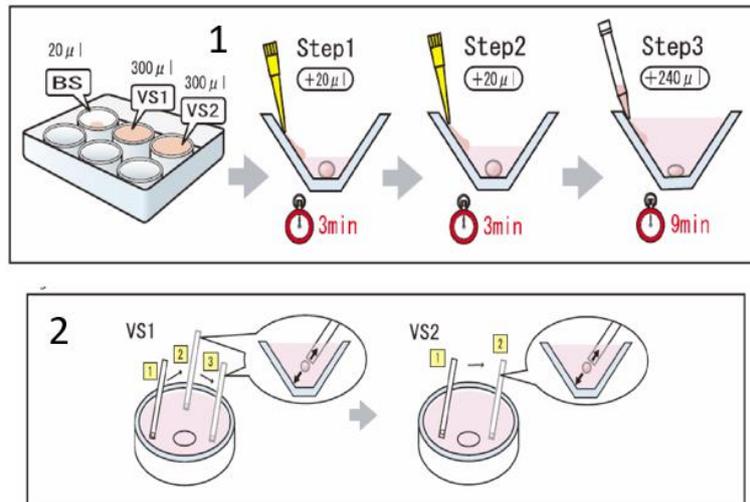


Figura 29. Esquema da metodologia de vitrificação ovocitária, segundo a *Kitazato*. Adaptado de Kitazato (2019).

4.2.7.3 Procedimento para desvitrificação de ovócitos

Para a desvitrificação dos ovócitos é seguido o protocolo de *Kitazato*, igual ao descrito para a desvitrificação de embriões, na secção 4.5.3. Após o processo de desvitrificação estar concluído, os ovócitos são transferidos para meio de cultura apropriado, onde são devidamente lavados, através de sucessivas pipetagens. De seguida, os ovócitos são incubados durante 2 horas, a 37°C, 6% CO₂, 5% O₂, até ao momento da ICSI, propriamente dita.

4.2.8 Caso 5 – Criopreservação espermática

Tabela 13. Informação clínica e laboratorial do casal do caso clínico 5, indicado para criopreservação espermática. Legenda: V – Volume; C – concentração; MP – móveis progressivos; MNP – móveis não progressivos; I – imóveis; FN – formas normais.

<p>Homem ♂</p> <p>44 anos de idade, camionista</p> <p>Espermograma: V=2.1 mL; pH=7.9; C=168.10⁶/mL; MP=82%; MNP=6%; I=12%; FN=5%</p> <p>Indicação para criopreservação de espermatozoides por ausência do país no dia da punção folicular</p>

4.2.8.1 Enquadramento teórico

Comparativamente à criopreservação de ovócitos e embriões, a criopreservação de espermatozoides é muito mais simples, devido à relativa abundância de amostra e ao tamanho reduzido da célula espermática (Bormann, 2014). Esta última característica é de extrema relevância, já que, células com uma menor dimensão são menos suscetíveis à criação de cristais de gelo, que provocam danos irreversíveis às células (Rodriguez-Wallberg *et al.*, 2019). De modo a evitar a formação de cristais de gelo, são adicionados à amostra crioprotetores. O crioprotetor mais frequentemente utilizado é à base de glicerol (Bormann, 2014). Os crioprotetores para além de diminuírem o *stress* osmótico, também, funcionam como fonte de energia, e evitam contaminações bacterianas pela inclusão de um antibiótico na solução (Anger *et al.*, 2003). Contudo, a criopreservação pode afetar a função celular dos espermatozoides, que inclui a integridade do acrossoma, alterações cromossómicas, função mitocondrial, perda da integridade da membrana citoplasmática, e pode resultar numa diminuição da viabilidade espermática, motilidade e capacidade fertilizante (O'Connell *et al.*, 2002; Nijs *et al.*, 2009). Normalmente, apenas cerca de 50% dos espermatozoides com motilidade progressiva sobrevive ao processo de descongelação (World Health Organization, 2010).

Num estudo comparativo de Borges *et al.* (2007), foram analisadas as taxas de fecundação, implantação e de gravidez em casais que recorreram a ICSI com uso de esperma de ejaculado a fresco, comparativamente, com o uso de esperma de ejaculado criopreservado e concluíram que, apesar das taxas de fecundação serem inferiores no grupo com esperma criopreservado, as taxas de implantação e gravidez eram equiparáveis (Borges *et al.*, 2007). Para além disso, o uso de esperma criopreservado oriundo de técnicas cirúrgicas de recolha espermática a partir dos testículos ou epidídimos também demonstram boas taxas de sucesso, quando aliado à técnica de ICSI (Nagy *et al.*, 1995). Desta forma, é possível concluir que o uso de esperma criopreservado é viável nos centros de PMA.

Assim, a criopreservação de sémen/espermatozoides possibilita: (i) a preservação da fertilidade de homens que enfrentam a possibilidade de infertilidade após procedimento (vasectomia) ou exposição a substâncias gonadotóxicas (decorrentes de tratamentos de quimioterapia/radioterapia); (ii) armazenamento de sémen/espermatozoides para utilização em tratamento de infertilidade, caso o homem seja incapaz da colheita espermática no dia da realização da técnica de PMA; (iii) evitar a realização de uma

segunda cirurgia de recolha espermática; (iv) a formação de bancos de dadores de gâmetas masculinos (World Health Organization, 2010; Martins *et al.*, 2019).

A formação de um banco de dadores tornou-se uma prática em alguns centros de PMA, para solucionar: casos de casais onde o homem apresenta um quadro de infertilidade grave; falhas recorrentes em ciclos de tratamento sem aparente causa ovocitária; a prevenção da transmissão de doenças hereditárias via paterna; mulheres sem parceiro masculino; e casais de mulheres (Koustas *et al.*, 2020). Os pré-requisitos para ser dador de esperma em Portugal incluem, idade compreendida entre os 18 e os 45 anos, ausência de doenças sexualmente transmissíveis, e não ser portador de doenças hereditárias (CNPMA, 2021). Preenchendo estes requisitos, um homem pode ser candidato a dador de esperma. Para tal, precisa de realizar um espermograma, para avaliação dos parâmetros espermáticos. Caso seja validado o resultado do espermograma, o candidato é encaminhado para uma consulta médica e psicológica e é sujeito a análises sanguíneas, marcadores virais e estudo genético. Caso o candidato seja aprovado para doação de esperma, inicia o ciclo de doações, e o esperma é criopreservado conforme o descrito na Secção 4.7.1. As palhetas de esperma passam, obrigatoriamente, por um período de quarentena de 6 meses (após a última colheita). No final deste período, o dador é novamente chamado, para realização de novas análises sanguíneas, para confirmação de negatividade de marcadores de doenças virais. Após o período de quarentena, pode ser iniciada a utilização das palhetas de esperma em ciclos de doação de PMA (CNPMA, 2021).

4.2.8.2 Procedimento de criopreservação de esperma

A amostra espermática deve ser recolhida via masturbação, no dia da realização da criopreservação espermática. Antes de se realizar a criopreservação da amostra, e após liquefação, é necessário realizar uma avaliação dos parâmetros espermáticos. De seguida, a amostra é processada. A técnica de gradientes descontínuos é, preferencialmente, utilizada para que apenas espermatozoides móveis e com a maior capacidade fertilizante sejam criopreservados (conforme o descrito na Secção 3.3.1). O volume de meio de cultura adicionado no final, está dependente da qualidade da amostra inicial, tendo em conta os parâmetros de concentração e motilidade, para permitir o carregamento do número de palhetas desejáveis (com ausência de grande diluição da amostra). Pode, igualmente, utilizar-se a técnica de *swim-up* para processamento de amostra, quando as características das mesmas são consideravelmente superiores aos valores de referência.

De acordo com o protocolo de criopreservação utilizado, deve ser adicionado crioprotetor numa proporção 1:1, isto é, ao volume da amostra deve ser adicionado igual volume de crioprotetor, com o auxílio de uma seringa graduada. Devido ao efeito potencialmente tóxico do crioprotetor e para evitar o *stress* osmótico, este deve ser adicionado gota-a-gota, com agitação, durante um período de 10 min, à temperatura ambiente, para permitir a envolvimento de toda amostra com o crioprotetor. Para o armazenamento da amostra são utilizadas palhetas de plástico de 0.5 mL. As palhetas devem estar identificadas com o nome do beneficiário (no caso de criopreservação de espermatozoides próprios) ou código atribuído (caso se trate de um dador de esperma) e data e metodologia de criopreservação. Após o período de agitação, as palhetas são carregadas com a solução de esperma, mais crioprotetor. As palhetas podem ser carregadas com o auxílio de um adaptador que encaixa na ponta da palheta e a amostra é aspirada com uma seringa. Depois de carregada, procede-se à selagem da palheta nas extremidades através de um sistema de calor. Depois de todas as palhetas carregadas, deve-se realizar uma inspeção da qualidade da amostra após processamento, e os parâmetros de motilidade e concentração devem ser registados. De seguida, as palhetas devem ser colocadas a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ durante cerca de 10 min, seguidos de 15 min em vapor de azoto. Após estes períodos, as palhetas são mergulhadas em azoto líquido e armazenadas em contentores de azoto a -196°C . O número de palhetas criopreservadas, assim como, o seu local de armazenamento, devem ser registados. É aconselhável carregar uma palheta adicional, com um pequeno volume de solução, para permitir a realização de uma prova de descongelação, para averiguar a resposta dos espermatozoides ao processo de criopreservação.

A descongelação espermática é um processo simples, e rápido. Apenas implica a manutenção da palheta à temperatura ambiente, durante 10 min. Após descongelação total da amostra, a mesma deve ser processada de acordo com a metodologia inicial de criopreservação. Antes da utilização da amostra espermática, deve-se realizar uma nova avaliação dos parâmetros espermáticos e proceder-se à remoção do crioprotetor com adição de meio de cultura e posterior centrifugação.

4.2.9 Caso 6 – Biopsia Embrionária

Tabela 14. Informação clínica e laboratorial do casal do caso clínico 6, indicado para biópsia embrionária. Legenda: V – Volume; C – concentração; MP – móveis progressivos; MNP – móveis não progressivos; I – imóveis; FN – formas normais. ng – nanogramas; UI – unidades internacionais; PN – Pronúcleos; D – Dia; BL – Blastocisto.

Mulher ♀	Homem ♂
41 anos, ciclos regulares AMH=1.8 ng Ovário direito com 7 folículos antrais e direito com 2	36 anos, saudável Espermograma: V= 1.8 mL; pH=7.8; C=66.10 ⁶ /mL; MP=55%; MNP=11%; I=44%; FN=5%
Infertilidade primária com 6 meses de evolução Indicação para ciclo ICSI com rastreio de aneuploidias por fator idade 1º protocolo de estimulação (acumulação de ovócitos) Protocolo de estimulação: Curto com antagonista Dose total de estimulação: 1700 UI rFSH + 3000 UI HMG Dias de estimulação: 11 Nº ovócitos recuperados: 4 Nº ovócitos maduros e vitrificados: 3 2º protocolo de estimulação (com utilização ovocitária a fresco) Protocolo de estimulação: Curto com agonista Dose total de estimulação: 4500 UI rFSH Dias de estimulação: 10 Nº ovócitos recuperados: 10 Nº ovócitos maduros: 6 Nº ovócitos injetados: 9 (3 ovócitos desvitrificados + 6 ovócitos recuperados a fresco) Nº ovócitos fecundados (2PN): 7 Nº embriões biopsiados a D5: 4 (2xBL 5AB, BL 5BB, BL 5BC) Nº embriões criopreservados ao D5: 4 Resultado de rastreio de aneuploidias: 1 embrião euploide	

4.2.9.1 Enquadramento teórico

Segundo a mais recente revisão “Glossário Internacional sobre Infertilidade e Cuidados de Fertilidade” (Zegers-Hochschild *et al.*, 2017) os termos, Diagnóstico Genético Pré-implantação (DGPI) e Rastreio Genético Pré-implantação foram substituídos pelo termo Teste Genético Pré-implantação (PGT). O PGT é definido como um teste realizado para analisar o material genético de ovócitos (glóbulos polares) ou embriões (em fase de clivagem ou blastocisto) para determinação de anomalias genéticas ou HLA-*typing*. O PGT inclui os seguintes exames: PGT-A, um PGT para despiste de aneuploidias; PGT-M, um PGT para rastreio de doenças monogénicas; e PGT-SR, para despiste de rearranjos estruturais cromossómicos, como também de anomalias cromossómicas

numéricas (Zegers-Hochschild *et al.*, 2017; ESHRE PGT Consortium *et al.*, 2020). O grande objetivo da realização de um teste genético, é a identificação do embrião, cromossoma/geneticamente normal para ser transferido (Bormann, 2014).

Em Portugal, o CNPMA reconhece várias situações que são passíveis da realização de PGT-A, devido ao risco associado de algum dos elementos do casal, ou ambos, apresentarem uma probabilidade elevada de transmissão à descendência de alguma anomalia genética, muitas vezes associada ao insucesso reprodutivo. A realização do diagnóstico genético é indicada: quando a mulher possui uma idade ≥ 39 anos; quando se verifica abortamentos clínicos recorrentes (≥ 2) de causa desconhecida; quando 3 ou mais transferências embrionárias culminam no insucesso da implantação embrionária após a realização de uma FIV ou ICSI; quando uma gestação anterior resultou num embrião com alguma anomalia cromossómica (CNPMA, 2019).

Para a concretização de PGT é necessária a realização de uma biópsia embrionária, por parte do laboratório de PMA. As células recolhidas da trofoectoderme durante a biópsia, são posteriormente enviadas para um laboratório de genética, onde serão analisadas.

A biópsia embrionária consiste em 2 etapas principais: a criação de uma abertura na zona pelúcida e remoção de glóbulos polares (no caso de ovócitos) ou de células embrionárias, que podem ser blastómeros ou células da trofoectoderme (ESHRE PGT Consortium *et al.*, 2020). A abertura da zona pelúcida é conseguida pela emissão de feixes de *laser* na zona pelúcida. Esta técnica permite uma elevada precisão e rapidez. O tamanho da abertura deverá ser de dimensões reduzidas, de modo a evitar a saída de células ou eclosão do blastocisto (ESHRE PGT Consortium *et al.*, 2020). Quando um ciclo é indicado para a realização de PGT, é mandatário recorrer à técnica de ICSI, já que, esta minimiza tanto o risco de contaminação materna, a partir de células residuais do cúmulo *oophorus*, como também o risco de contaminação paterna de espermatozoides excedentários ligados à ZP, resultado de uma FIV (ESHRE PGT Consortium *et al.*, 2020).

A **biópsia de um ou dois GP** é apenas realizada, quando se pretende investigar a presença de mutações genéticas de origem materna, ou quando a lei do país não permita a biópsia de embriões, ou por questões éticas do casal. Dado que, os GP são apenas sobreprodutos da meiose, que nada interferem com o desenvolvimento do embrião, a sua remoção não confere limitações para o desenvolvimento embrionário. Contudo, a adoção deste tipo de biópsia, confere várias desvantagens. O número de

ovócitos biopsiados pode ser elevado, quando comparado com o número de possíveis embriões que se irão desenvolver, o que pode implicar uma elevada carga de trabalho a nível laboratorial e custos para o casal. Por outro lado, o GP pode possuir fragmentação ou degenerar, o que leva a uma reduzida quantidade de material genético disponível para análise. A grande desvantagem, é que apenas obtemos informações da origem materna, não havendo qualquer informação sobre a parte paterna, ou outros erros que possam acontecer durante o desenvolvimento embrionário (Bormann, 2014; ESHRE PGT Consortium *et al.*, 2020).

A **biopsia em fase de clivagem** é realizada ao 3º dia de desenvolvimento embrionário. Esta consiste na remoção de apenas 1 blastómero. Nesta fase de desenvolvimento os blastómeros possuem uma entidade totipotente, portanto cada blastómero tem um potencial de contribuição tanto para a MCI, como para a trofoectoderme. Neste caso, como vantagem em relação à biópsia aos GPs, a biopsia em fase de clivagem permite a deteção de erros meióticos provenientes tanto via paterna, como via materna (ESHRE PGT Consortium *et al.*, 2020).

A **biopsia em fase de blastocisto** é o método de biopsia mais vantajoso e por isso, mais frequentemente, utilizado nos centros de PMA, onde a legislação do país a permite. A biopsia em fase de blastocisto tem como grande vantagem a possibilidade de recolha de múltiplas células da trofoectoderme, sem que se danifique as células da massa celular interna, importantes para o desenvolvimento fetal. Desta forma, é também possível a recolha de um maior conteúdo de material genético, o que facilita a leitura e torna os resultados mais fiáveis (Bormann, 2014; ESHRE PGT Consortium *et al.*, 2020). O maior número de células em fase de blastocisto está associado a um nível de mosaicismo inferior nas células, o que torna os resultados mais fiáveis. A biopsia embrionária em D5/D6 está associada a vários potenciais desafios. A biópsia para ser realizada em fase de blastocisto, implica uma cultura prolongada. Segundo a literatura, apenas cerca de metade dos ovócitos fecundados culmina no estado de blastocisto. O que reduz o número de embriões a serem biopsiados (ESHRE PGT Consortium *et al.*, 2020).

Os resultados da biopsia apenas estarão disponíveis alguns dias/semanas após a realização da técnica, o que implica, obrigatoriamente, a criopreservação dos embriões biopsiados. Devido aos avanços observados na área de criopreservação embrionária, associada a elevadas taxas de gravidez, a criopreservação de embriões não é considerada um aspeto limitativo da técnica (Bormann, 2014; ESHRE PGT Consortium *et al.*, 2020).

4.2.9.2 Procedimento de biópsia embrionária em fase de blastocisto

A biópsia embrionária pode ser realizada ao D5 ou D6, dependendo do estado de desenvolvimento do embrião. Para a realização da técnica o embrião deve estar em fase de blastocisto, com a MCI visível e bem definida, trofoectoderme definida e homogénea, com células elípticas, e o embrião deve estar expandido e, preferencialmente, semi-eclodido. A biópsia embrionária, para além de, ser realizada em blastocistos a fresco, também pode ser realizada em embriões previamente criopreservados. Neste caso, a biópsia deve ser realizada no momento de reexpansão do blastocisto (ESHRE PGT Consortium *et al.*, 2020).

Para que ocorra a semi-eclosão é necessário que ao D3, se realize uma pequena abertura na ZP, com o auxílio de feixes de *laser*. Ao D5 os embriões são avaliados, e caso tenham as características anteriormente referidas, são transferidos para uma placa de biópsia. Caso contrário, ficam em meio de cultura até ao D6. O microscópio ótico invertido é, previamente, preparado com uma pipeta sustentação e uma pipeta de biópsia. Como demonstrado na Figura 30, o embrião em fase de blastocisto é fixado na pipeta *holding*, com a zona de eclosão posicionada às 3h (Bormann, 2014). Se possível a massa celular interna deve estar posicionada entre as 7 e as 11 horas, para que esteja totalmente visível, de modo a evitar a aspiração da mesma (ESHRE PGT Consortium *et al.*, 2020). Com o auxílio da pipeta de biópsia, as células que se encontram na zona de eclosão são suavemente aspiradas. Deve-se esticar as células da trofoectoderme, através de uma força mecânica, enquanto, simultaneamente, se aplicam pulsos de *laser* (o menor número possível) para auxiliar na desagregação das junções celulares. O *laser* deve ser aplicado nos pontos de junção entre as células (Figura 30, A). As células biopsiadas são transferidas para um pequeno tubo com meio cedido pelo laboratório de genética (técnica designada de “*tubbing*”), que será posteriormente enviado para o laboratório de genética. É recomendável a preparação de um tubo de controlo negativo, devidamente identificado. No tubo do controlo negativo é usado para lavar a pipeta, depois de colocado o fragmento no primeiro tubo (Bormann, 2014; ESHRE PGT Consortium *et al.*, 2020).

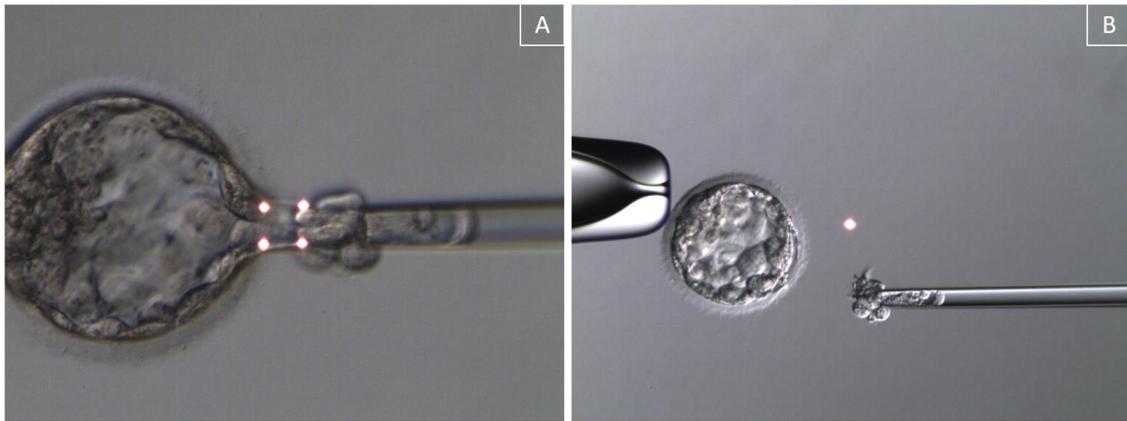


Figura 30. Biópsia embrionária em estado de blastocisto (D5). A – Blastocisto posicionado com a região de células expandidas às 3 horas, e massa celular interna afastada da região de biópsia. As células proeminentes da trofoectoderme são suavemente removidas do blastocisto, com o auxílio da pipeta de biópsia e emissão de pulsos de *laser* (pontos vermelhos). É possível observar as junções intracelulares a serem esticadas pela pipeta de biópsia, onde é aplicado o *laser*, para rompimento das mesmas. Ampliação a 200x. B – Embrião biopsiado e fragmento de células da trofoectoderme extraído do embrião. Ampliação da imagem a 100x. Imagens propriedade da clínica Procriar – Centro de Obstetrícia e Medicina da Reprodução do Porto.

Devem ser biopsiadas um total de 5 a 7 células da trofoectoderme. Por vezes os blastocistos encontram-se totalmente eclodidos, o que não inviabiliza a realização da biópsia. Nestes casos, para a excisão das células da trofoectoderme é aconselhável o uso simultâneo da emissão de pulsos de *laser* e movimentos “*flicking*” (ESHRE PGT Consortium *et al.*, 2020). De modo a evitar o risco de contaminação cruzada entre embriões, na mudança de blastocisto biopsiado, deve ser sempre trocada a pipeta de biópsia, a *holding* pode ser mantida (ESHRE PGT Consortium *et al.*, 2020).

Os blastocistos biopsiados deverão ser imediatamente criopreservados e devidamente identificados após a realização da biópsia, seguindo os protocolos estipulados para a criopreservação de embriões (Secção 4.5.2). Por vezes, o resultado do teste genético é inconclusivo e pode ser necessária a repetição da biópsia. A mesma só deve ser realizada em detrimento do estado e morfologia do blastocisto. É recomendável o uso da abertura original da ZP (ESHRE PGT Consortium *et al.*, 2020).

4.2.10 Caso 7 – Biópsia Testicular

Tabela 15. Informação clínica e laboratorial do casal do caso clínico 7, indicado para biópsia testicular. Legenda: V – Volume; C – concentração; MP – móveis progressivos; MNP – móveis não progressivos; I – imóveis; FN – formas normais; ng – nanogramas; UI – unidades internacionais; PN – Pronúcleos; D – Dia; BL – Blastocisto.

Mulher ♀	Homem ♂
38 anos Ciclos irregulares por SOP AMH=4.42 ng	53 anos Diagnóstico de azoospermia secretora
Infertilidade primária com 5 anos de evolução 3 ciclos de ICSI com biopsia testicular, em hospital público sem gravidez Indicação para ciclo ICSI com biopsia testicular a fresco Protocolo de estimulação: Curto com antagonista Dose total de estimulação: 2475 UI FSH Dias de estimulação: 11 Nº ovócitos recuperados: 23 Nº ovócitos maduros: 21 Nº ovócitos fecundados (2PN): 17 Nº embriões criopreservados a D5: 7 (3x BL 4AA; 4xBL 4AB) Nº embriões criopreservados a D6: 2 (2x BL BC) Ciclo de <i>freeze all</i> por risco de OHSS.	

4.2.10.1 Enquadramento teórico

Em quadros clínicos de azoospermia, não significa que não possam ser recolhidos espermatozoides no testículo ou epidídimos. Existem 2 condições clínicas explicativas da azoospermia baseadas na sua etologia, a azoospermia obstrutiva e a não obstrutiva. No caso da azoospermia obstrutiva a espermatogénese ocorre normalmente, mas ao longo do sistema de ductos ocorre alguma obstrução adquirida ou congénita. A azoospermia obstrutiva adquirida, pode ser explicada pela realização de uma vasectomia, infeções, procedimentos cirúrgicos na região pélvica, abdominal e inguinal. As causas de azoospermia obstrutiva congénita incluem a ausência do canal deferente ou fibrose cística (Esteves & Verza, 2012; Shin & Turek, 2013). Como numa azoospermia obstrutiva, a espermatogénese ocorre normalmente, pode-se recuperar os espermatozoides diretamente a partir dos testículos ou epidídimos. No caso da azoospermia não obstrutiva, o sistema de ductos está funcional e desobstruído, contudo a ausência de espermatozoides deve-se a uma falha testicular, levando a uma anormal espermatogénese. Esta pode ser causada por microdeleções no cromossoma Y, anomalias do cariótipo, quimioterapia, criptorquidismo ou infeções. Nestas condições a

recuperação de espermatozoides se possível, está limitada ao testículo (Esteves & Verza, 2012; Shin & Turek, 2013). No caso de um desequilíbrio hormonal, que não suporte a espermatogénese, como o hipogonadismo hipogonadotrófico, é recomendável o tratamento com administração de hormonas, e verificar se ocorre uma recuperação da espermatogénese (Tournaye & Donoso, 2008).

Espermatozoides recolhidos de biópsia testicular podem ser utilizados em tratamentos de fertilização recorrendo à ICSI de forma bem-sucedida. A utilização da ICSI possibilita taxas de fecundação, clivagem e gravidez clínica aceitáveis, com espermatozoides recolhidos de biópsia, tanto a fresco, como criopreservados (Nagy *et al.*, 1995; Ohlander *et al.*, 2014). Um estudo de Vernaev *et al.* (2003), conclui que a taxas de fecundação e de gravidez clínica de casos de azoospermia obstrutiva são significativamente superiores, comparativamente, às taxas de casos de homens com azoospermia não obstrutiva. Tal facto, pode ser devido a utilização de espermatozoides para realização de ICSI num estado de maturação inferior, como resultado de uma deficiente meiose e por isso com anomalias cromossómicas.

Durante a biópsia testicular, podem ser realizadas até 3 incisões testiculares e retirados 3 fragmentos de polpa testicular. Está demonstrado que a espermatogénese ocorre de modo desigual ao longo dos diferentes túbulos (Tournaye & Donoso, 2008). A realização de TESE com múltiplos locais de incisão, resulta numa maior probabilidade de encontrar espermatozoides móveis (Hauser *et al.*, 1998).

Um homem que é proposto à realização de uma biópsia testicular, necessita de ser informado das limitações que esta técnica possui: pode não haver hipótese de recuperação de espermatozoides e os resultados consequentes após a realização da ICSI, apesar de bem-sucedidos, podem não ser equivalentes aos resultados da utilização de ejaculado a fresco (Tournaye & Donoso, 2008). Normalmente, sempre que se realiza uma biópsia testicular, e se a concentração espermática encontrada for suficiente, procede-se à criopreservação espermática, com a finalidade de evitar a realização de uma segunda biópsia.

4.2.10.2 Procedimento da biópsia testicular

O médico especialista inicia o procedimento, anestesiando o testículo, prosseguindo para uma incisão da parede escrotal até exposição do testículo. É realizada, posteriormente, uma incisão da albugínea e exposição da polpa testicular com colheita de pequenos fragmentos para uma placa de *Petri*, que contém meio de cultura próprio.

No laboratório, procede-se a maceração do conteúdo em meio de cultura de espermatozoides, com o auxílio de 2 agulhas. Realizam-se movimentos rápidos, para libertação do conteúdo dos túbulos seminíferos para o exterior. É importante hidratar os tecidos com meio de cultura, ao longo da maceração. De seguida, uma alíquota do sobreproduto obtido da maceração é colocado sobre lâmina e lamela e observado ao microscópio ótico invertido, a uma ampliação de 400x. Durante a visualização ao microscópio podem ser observadas células de *Sertoli*, hemácias e espermatozoides (Figura 31). A amostra é avaliada quanto ao número de espermatozoides presentes e sua motilidade, e dependendo da sua concentração, o médico andrologista é informado se há necessidade de realizar alguma outra incisão, noutra região do testículo, para obtenção de um maior número de espermatozoides. Se for necessário o procedimento repete-se, até ao embriologista entender que tem o número suficiente de espermatozoides para a realização do ciclo, e caso o andrologista decida que deve ou não continuar. O conteúdo resultante da maceração é aspirado e colocado num tubo com meio de cultura, seguido da sua centrifugação por 10 min, a 1500 rpm. O sobrenadante é aspirado e eliminado, e adiciona-se algumas gotas de meio de cultura. De seguida, é retirada uma pequena alíquota, para avaliação da amostra espermática. Procede-se a incubação da amostra a 37°C, até ao momento da realização da ICSI. A técnica de ICSI é realizada de igual forma, ao descrito na Secção 4.3.3, com a diferença na preparação da placa. Apenas é realizada uma gota alongada de PVP, e são realizadas 3 ou mais gotas alongadas de amostra espermática e as gotas de meio tamponado, conforme o demonstrado na Figura 32.

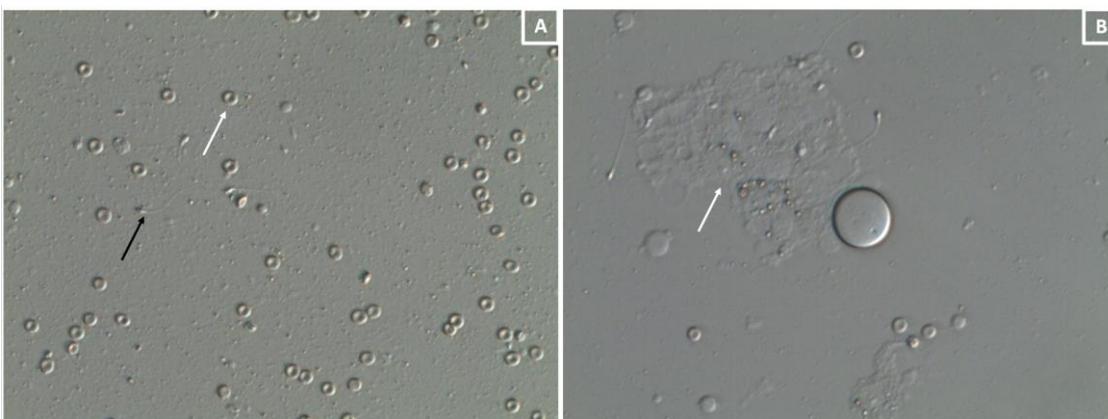


Figura 31. Observação ao microscópio ótico invertido do conteúdo resultante da maceração de fragmentos de túbulos seminíferos recolhidos em biópsia testicular. Na figura A é possível observar hemácias (assinaladas com seta branca) e espermatozoides (assinalados com seta preta). Na figura B está representada uma célula de *Sertoli* (seta branca). Ampliação de 200x. Imagens propriedade da clínica Procriar – Centro de Obstetrícia e Medicina da Reprodução do Porto.

A técnica de ICSI com produto de biópsia testicular pode ser mais demorada, devido à necessidade de uma procura exaustiva de espermatozoides, e por isso, deve-se iniciar com a seleção e imobilização dos espermatozoides. De seguida, coloca-se a placa a incubar durante cerca de 15 min para equilibrar a 37°C. Só, após incubação, são colocados os ovócitos na placa, para evitar flutuações de temperatura.

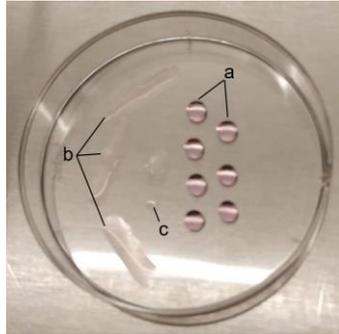


Figura 32. Placa de ICSI com espermatozoides de biópsia testicular. a – gotas de meio tamponado; b – bandas alongadas amostra espermática processada; c – gota alongada de PVP. A esta placa é adicionado óleo mineral até cobrir toda a placa, garantindo que todas as gotas estão totalmente submersas. Imagens propriedade da clínica Procriar – Centro de Obstetrícia e Medicina da Reprodução do Porto.

5. Impacto de sucessivos ciclos de doação de ovócitos em parâmetros clínicos e laboratoriais

5.1 Introdução

5.1.1 A utilização de gâmetas femininos doados

No passado, ser infértil significava que, o sonho de parentalidade tinha terminado. Agora os avanços da tecnologia de PMA, mudaram essa realidade. Todavia, alguns diagnósticos de infertilidade não são passíveis de ser ultrapassados utilizando gâmetas próprios, sendo necessário recorrer a um banco de gâmetas de doadores. Em 1984, foi reportada a primeira FIV com doação de ovócitos que resultou numa gravidez (Lutjen *et al.*, 1984). A mulher padecia de falência ovárica e recorreu a ovócitos de uma doadora com 25 anos, obtendo-se um nado vivo. Desde então, os sucessivos avanços teóricos e técnicos, contribuíram para o melhor conhecimento da fisiologia e fisiopatologia da reprodução humana, a otimização dos protocolos de estimulação, o desenvolvimento da vitrificação ovocitária, permitindo que, passados quase 40 anos, os ciclos com doação de ovócitos fossem cada vez mais frequentes (Christianson & Bellver, 2018; Melnick & Rosenwaks, 2018). Em 1997 em 10 países europeus, realizaram-se 3487 ciclos recorrendo a doação de gâmetas femininos (Nygren & Andersen, 2001). Já em 2016, o número cresceu, exponencialmente, para 73 927 casos, em 40 países (Wyns *et al.*, 2020). O crescimento exponencial ao longo dos anos de ciclos com doação de ovócitos é notável no gráfico da Figura 33.

Várias são as patologias indicadas para um ciclo com doação de gâmetas. O CNPMA define como indicação os seguintes quadros: (1) quando existe um estado de falência ovárica precoce; (2) em situações de ausência ou insuficiência congénita dos ovários; (3) no caso de pacientes com ciclos repetitivos de PMA sem sucesso, com má qualidade de gâmetas ou embriões; (4) no caso de idade materna avançada (>38 anos) (CNPMA). Para além disso, ciclos com baixa resposta à estimulação ovárica, pobre qualidade ovocitária, abortamentos de repetição e doenças genéticas hereditárias maternas são outros motivos justificativos da utilização de gâmetas femininos doados (Caligara *et al.*, 2001).

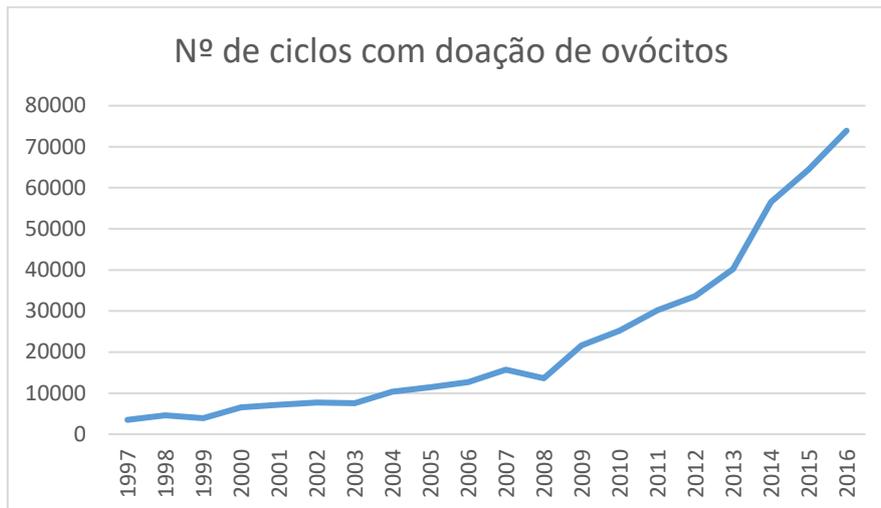


Figura 33. Número de ciclos com doação de ovócitos na Europa, desde 1997 até 2016, segundo os registos anuais do grupo EIM, desde 1997 a 2016.

5.1.2 Doação de gâmetas em Portugal

Segundo a Lei Portuguesa, a doação de ovócitos é um processo voluntário, de carácter benévolo. Contudo, no final do processo de doação, a dadora recebe uma compensação financeira, que segundo os termos fixados pelo CNPMA (nº3 do Despacho 3192/2017, publicado no Diário da República n.º 75, 2.ª Série, de 17 de abril de 2017), atualmente, está estipulada num valor máximo de 877.62€. Este valor monetário não está dependente da quantidade ou qualidade ovocitária, mas sim, uma compensação pelo tempo gasto e pelos eventuais prejuízos resultantes da doação.

Relativamente, ao regime de anonimato dos dadores de gâmetas, vários direitos são colocados em causa: o direito de autonomia e privacidade dos pais beneficiários, o direito da privacidade do dador e o direito da criança conhecer as suas origens genéticas. Todavia, estes direitos não conseguem ser, simultaneamente, respeitados (ESHRE Task Force on Ethics and Law, 2002). Em Portugal, a doação de gâmetas foi já realizada em regime de anonimato. Todavia, na sequência do Acórdão do Tribunal Constitucional n.º 225/2018, de 24 de abril de 2018, o regime de anonimato foi considerado inconstitucional. Quando, anteriormente, a autonomia e privacidade dos dadores e beneficiários era prioridade, agora salienta-se o direito do indivíduo fruto de doação de gâmetas, em conhecer as suas origens genéticas, essencial para usufruir do seu direito à identidade pessoal. O Acórdão n.º 225/2018 defende que, no regime de anonimato verificava-se uma limitação ao acesso a informações importantes para o desenvolvimento da personalidade, e da construção de identidade pessoal. Esta lei é aplicada tanto às doações femininas, como às masculinas. Deste modo, aos 18 anos de

idade, o jovem fruto do processo de doação, pode junto do CNPMA, solicitar a identificação do dador em causa.

Por deliberação do CNPMA, em Portugal, cada dadora pode efetuar no máximo 4 dádivas ao longo da sua vida, com um intervalo superior a 3 meses entre as dádivas (CNPMA, 2021). É importante a limitação de dádivas para evitar a consanguinidade e possíveis efeitos nocivos para a saúde da dadora.

5.1.3 Processo de seleção e avaliação das candidatas a dadoras

Segundo o CNPMA, as dadoras de gâmetas necessitam, obrigatoriamente, de corresponder aos seguintes critérios: idade compreendida entre os 18 e 34 anos, não serem portadora de doenças sexualmente transmissíveis, nem de doenças hereditárias (CNPMA, 2021). A seleção e avaliação das dadoras é um processo moroso, trabalhoso e dispendioso, e de extrema importância, para assegurar, tanto a saúde das dadoras, como das beneficiárias e futuras crianças resultantes do processo de doação. Inicialmente, a candidata, é submetida a uma avaliação ginecológica e psicológica.

Na primeira consulta realizada por um médico ginecologista deve ser abordado o historial de doenças pessoais e familiares hereditárias e o historial de doenças infecciosas (CNPMA, 2021). A candidata é também questionada sobre seu estilo de vida, que inclui, os hábitos tabágicos, consumo de drogas, de cafeína e álcool. É realizado um exame físico, através da determinação do peso e da altura, para cálculo do IMC. O IMC é um importante indicador na seleção das dadoras, já que um $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ (sobrepeso) está associado a um maior número de dias de estimulação (Rittenberg *et al.*, 2011), a uma maior dose de gonadotrofinas (Dechaud *et al.*, 2006) e estão associados a uma menor qualidade ovocitária, já que, à medida que o IMC aumenta, a taxa de gravidez diminui nas recetoras (E.R. Cardozo *et al.*, 2015). Durante a consulta é realizado um exame ginecológico e uma ecografia transvaginal, para a exclusão de patologias pélvicas. Para além destes exames, são solicitados exames analíticos ao sangue, que inclui a avaliação do grupo sanguíneo, fator Rh, AMH, doseamento da TSH, T3 livre e T4 livre, para despiste de doenças ao nível da tiroide. Para além disso, são prescritas análises de marcadores biológicos de infeção ((VIH (Vírus da imunodeficiência humana), hepatite C, hepatite B, sífilis e pesquisa de anticorpos anti-HTLV I/II, caso a candidata ou parceiro sexual ou pais, sejam provenientes de zonas endémicas) (CNPMA, 2021).

O estudo da AMH é um indicador importante para a avaliação da reserva ovárica. As células da granulosa de folículos em crescimento (pré-antral a antral) produzem esta hormona. Ao nascimento, os níveis de AMH são, praticamente, indetetáveis e próximo do momento da menopausa, os níveis de AMH vão diminuindo, como sinal do esgotamento da reserva ovárica (La Marca *et al.*, 2006). Para além do poder preditor da reserva ovárica, a AMH, também, pode ajudar a prever a resposta ovárica à estimulação gonodotrófica, assim como, ajudar a tomada de decisão em relação ao protocolo de estimulação mais adequado (La Marca *et al.*, 2006). O estudo de Riggs *et al.* (2011), demonstrou que a concentração de AMH constitui um bom preditor da alta ou baixa resposta a um tratamento de hiperestimulação controlada dos ovários. Deste modo, ao ser doseada a AMH das candidatas a dadora, é possível prever a sua potencial resposta (Riggs *et al.*, 2011). Riggs *et al.* (2011) definiram que o limiar mínimo aceitável da concentração de AMH é de 1.5 ng/mL e valores superiores a 3.0 ng/mL, são um bom indicador de que, a dadora terá mais que 16 folículos no *trigger*. Uma grande vantagem do uso do doseamento da AMH em relação a outros marcadores de resposta ovárica à estimulação, é que esta pode ser determinada em qualquer altura do ciclo menstrual, já que, a produção da AMH parece não estar dependente da secreção de gonadotrofinas e por isso, não ocorrem flutuações significativas ao longo de todo o ciclo menstrual, mesmo com a administração exógena de FSH (La Marca *et al.*, 2006; Bukulmez *et al.*, 2010; Strauss & Williams, 2014).

As candidatas são submetidas a rastreios genéticos, que inclui o estudo do cariótipo e estudo de genes de doenças que têm uma maior prevalência no local de origem da candidata, como também, de genes associados ao risco de transmissão de uma doença hereditária presente na família (CNPMA, 2021).

Caso algum resultado seja superior ou inferior ao intervalo de valores de referência, a candidata é imediatamente excluída do programa de doação de gâmetas. Caso seja encontrada alguma condição médica, as candidatas tem o direito de serem informadas e encaminhadas para uma consulta de aconselhamento especializado (Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2019). Caso contrário, a candidata pode avançar com o processo de doação de gâmetas femininos. As candidatas são informadas sobre todas as implicações e riscos que a doação de ovócitos pode trazer, devido ao tratamento induzido de estimulação ovárica, e devido à realização da punção folicular. É necessário assegurar que as dadoras recebem todas as informações sobre o processo de doação, para poderem tomar a decisão de um modo consciente, ponderado e informado. Deste modo, antes de ser iniciado o processo

de doação de gâmetas, todas as candidatas assinam um consentimento informado, emitido pelo CNPMA.

A consulta de psicologia tem como objetivos a percepção de quais são as motivações para a doação de gâmetas, assim como detetar alguma psicopatologia. Deve-se dar especial atenção às implicações do processo de doação de gâmetas a curto e a longo prazo, como as complicações médicas que podem decorrer, o impacto na sua vida pessoal, aspetos emocionais e psicológicos e implicações sociais, éticas e legais associados à doação de gâmetas.

5.1.4 Processo de doação de gâmetas femininos

A indicação do protocolo de estimulação, assim como, a dose de gonadotrofinas diárias está dependente da contagem do número de folículos antrais e do valor da AMH. Contudo o protocolo de estimulação indicado para as dadoras, recai, preferencialmente, na estimulação ovárica com ciclo curto com antagonista (Christianson & Bellver, 2018). Vários estudos defendem a utilização deste protocolo, em comparação com o protocolo longo agonista, já que, previne o risco do desenvolvimento de OHSS e é mais “*patient friendly*” para as dadoras, já que é necessário um menor número de injeções, o período de estimulação é menor, exigindo uma menor dose de gonadotrofinas administrada, que conseqüentemente, leva a uma redução dos efeitos secundários (D. Bodri *et al.*, 2006). Estudo comparativos, entre protocolos longos de agonista com protocolos curtos de antagonista, não encontraram diferenças significativas no número de ovócitos recuperados, taxas de implantação ou gravidez clínica (D. Bodri *et al.*, 2006; Daniel Bodri *et al.*, 2011), o que intensifica a utilização deste tipo de protocolo em ciclos de doação de ovócitos.

Após estimulação ovárica, as dadoras são submetidas a uma punção folicular, para recuperação de folículos. Os ovócitos obtidos podem ser doados a fresco ou criopreservados. As taxas de sucesso (taxa de fertilização, qualidade embrionária, taxa de blastocisto, implantação e gravidez clínica) referentes a ciclos de doação de ovócitos a fresco ou criopreservados são semelhantes (Cobo *et al.*, 2010; Solé *et al.*, 2013).

5.1.5 Limitações da doação de gâmetas femininos

Apesar da utilização crescente de ciclos com doação de ovócitos, muitos são os problemas associados à doação de gâmetas femininos, como a saúde das dadoras, a exploração de mulheres com baixo poder económico e a materialização do corpo humano, motivos pelos quais, em alguns países europeus (como por exemplo,

Alemanha, Áustria e Itália) não seja permitida a doação de gâmetas femininos (Pennings *et al.*, 2014). Para além disso, outros problemas surgem, como a possibilidade de diminuição da reserva ovárica, desenvolvimento de OHSS, devido aos protocolos de hiperestimulação controlada dos ovários ou problemas associados à anestesia e punção folicular, como infeções, ou torção ovárica, principalmente quando associados a ciclos repetitivos de doação de gâmetas femininos. Contudo, face aos protocolos de estimulação “*patient friendly*” (curto com antagonista), o risco de ocorrência de alguma complicação é baixa, mesmo em ciclos sucessivos de doação (Practice Committee of the ASRM & SART, 2014). A nível biológico, a hiperestimulação ovárica não poderá ser associada a uma diminuição da reserva ovárica, se aceitarmos a premissa de que, o início do desenvolvimento folicular até à formação do folículo antral inicial, são fases independentes da atuação das gonadotrofinas. A FSH tem como principal função estimular o folículo pré-antral a desenvolver-se e formar o folículo de *Graff*. Caso a libertação de FSH e sua manutenção, não ocorra no momento apropriado, o *pool* de folículos estimulados sofre atresia e apenas um único folículo amadurece. Desta forma, quando o *pool* é selecionado, na fase independente de gonadotrofinas, a quantidade de FSH administrada só irá afetar o desenvolvimento dos mesmos, caso não ocorresse estimulação apenas haveria a seleção de um único folículo dominante. O aumento da FSH não afeta o número de folículos selecionados, apenas permite o desenvolvimento de vários folículos até à fase madura, ao em vez de apenas 1 ou 2 folículos (Luk & Arici, 2010). Num estudo de Bukulmez *et al.* (2010), analisaram se os níveis de AMH diminuam ao longo de ciclos de doação, para identificarem, se ocorria diminuição da reserva ovárica. Os autores não verificaram uma diminuição dos níveis de AMH ao longo de 6 ciclos subsequentes de doação, os níveis mantiveram-se constantes, o que é indicativo que repetitivos ciclos de doação (pelo menos até 6), não estão associados a uma diminuição da reserva ovárica (Bukulmez *et al.*, 2010).

A literatura existente sobre o efeito de repetidos ciclos de doação, reporta que sucessivos ciclos de hiperestimulação controlada dos ovários não têm um impacto negativo na resposta ovocitária às gonadotrofinas, nos dias de estimulação, nos folículos no dia antes do desencadeamento, no número de ovócitos recuperados e no número de ovócitos maduros (MII) (Caligara *et al.*, 2001; Jain *et al.*, 2005). Contudo, existem escassos estudos que abordem este tema, e os que existem são de um período antecedente a 2010. Desta forma, torna-se importante perceber se ciclos repetitivos de doação de gâmetas femininos têm alguma implicação na dose total de gonadotrofinas administrada, no número de dias de estimulação e em parâmetros laboratoriais, como

o número de ovócitos recuperados, maduros e imaturos, e na qualidade ovocitária. Assim, um dos principais objetivos deste estudo, é a avaliação do potencial efeito de doações subseqüentes na dose de gonadotrofinas necessárias no ciclo de estimulação, número de dias de estimulação, número de folículos no dia do *trigger*, número de ovócitos recuperados, número de ovócitos maduros e imaturos e respetiva qualidade ovocitária.

Para além disso, é, também, essencial perceber se parâmetros como a idade, o IMC, a AMH, importantes para o processo de seleção das dadoras, têm algum impacto nos parâmetros ovocitários, como o número de folículos no dia do *trigger*, número de ovócitos recuperados, maduros e imaturos. Outra situação a estudar é o possível impacto do IMC na dose total de gonadotrofinas, assim como no número de dias de estimulação.

5.2 Material e Métodos

O presente estudo foi realizado na clínica Procriar – Centro de Obstetrícia e Medicina da Reprodução do Porto, entre 1 de março de 2019 a 30 de junho de 2021. Envolveu um de total 121 ciclos de estimulação controlada dos ovários em dadoras de ovócitos, das quais 51 foram submetidas a 2 ciclos de estimulação e 19 a 3 ciclos de estimulação.

5.2.1 Avaliação das dadoras

Todas as candidatas a dadoras foram submetidas a uma avaliação médica, ginecológica e psicológica. As dadoras tinham uma idade compreendida entre 18 e 34 anos. Nos termos da legislação em vigor, foi feito o despiste de infeção pelos vírus VHB, VIH, VHC, HTLV I/II e ainda da sífilis. Realizou-se igualmente o rastreio de doenças genéticas (cariótipo e bateria de testes genéticos para doenças autossómicas recessivas), sendo aprovadas apenas candidatas com resultados normais. Todas as mulheres foram informadas dos riscos inerentes ao processo de doação e assinaram o consentimento informado emitido pelo CNPMA.

5.2.2 Hiperestimulação controlada dos ovários

Para a hiperestimulação controlada dos ovários das dadoras utilizou-se um protocolo curto com antagonista da GnRH. Este consistiu na administração de doses diárias de gonadotrofinas a partir do 2/3º dia do ciclo menstrual. Ao 5/6º dia de estimulação foi realizada uma ecografia de monitorização para avaliação do tamanho dos folículos. Foi administrado um antagonista da GnRH quando pelo menos dois folículos atingiram um diâmetro médio igual ou superior a 13 mm, de modo a frear os ovários, através do

bloqueio da hipófise. Foi realizada nova monitorização, de acordo com a resposta folicular. Quando mais de 2 folículos atingiram um diâmetro igual ou superior a 18 mm, foi administrado agonista da GnRH, para impulsionar a maturação folicular final e desencadear a ovulação. A punção folicular foi agendada para 35-36h após a administração do hCG.

5.2.3 Punção folicular e procedimento laboratorial

A punção folicular foi realizada sob anestesia e de forma ecoguiada. Os tubos de líquido folicular recolhido foram analisados ao estereomicroscópio para pesquisa e recolha dos ovócitos. Os ovócitos isolados foram incubados a 37°C, 6% CO₂ e 5% O₂ e, posteriormente, desnudados para avaliação da maturação nuclear. Apenas os ovócitos maduros (MII) foram criopreservados ou usados no ciclo a fresco.

5.2.4 Análise de dados e análise estatística

Foram registados os valores da idade da dadora, dose hormonal administrada, número de dias de estimulação, número de folículos antes do desencadeamento, número de ovócitos recuperados, número de ovócitos maduros (MII) e imaturos (VG/MI) e qualidade ovocitária em cada ciclo de doação. Foram também registados os valores de IMC, AMH e número de dadoras com hábitos tabágicos e maternidade prévia para caracterização da população. O teste de *Shapiro-Wilk* foi aplicado para avaliar a normalidade das distribuições. As variáveis em estudo não apresentam uma distribuição normal, com a exceção da idade. Como tal, foram utilizados testes não-paramétricos, nomeadamente, o teste de *Wilcoxon* para amostras emparelhadas e o teste de *Friedman* para análise de variância. Para a variável idade (distribuição normal) foi utilizado um teste T. A intensidade da relação entre duas variáveis foi calculada utilizando o coeficiente de correlação de *Spearman*. O nível de significância foi estabelecido em $p\text{-value} < 0,05$. A análise estatística foi realizada com o *software Stata13, StataCorp.*

5.3 Resultados e discussão

O presente estudo teve como principal objetivo perceber o potencial impacto, numa população de dadoras de ovócitos, que ciclos sucessivos de hiperestimulação controlada dos ovários têm nos parâmetros clínicos e laboratoriais obtidos.

A idade mínima registada nos ciclos de doação foi de 19 anos e máxima de 32 anos; a maioria das dadoras eram caucasianas, correspondendo a 84.3% da amostragem total; 11.8% tinham origem étnica mista; as restantes eram orientais ou africanas; a

amostragem tinha como principais nacionalidades a portuguesa e a brasileira, correspondendo a 55.0% e 43.1% da amostra, respetivamente; relativamente ao estado civil, 15.7% das dadoras eram casadas; 78.4% das dadoras eram nuligestas; 31.4% eram fumadoras; em relação à motivação primordial da mulher para participar num programa de doação, as dadoras foram divididas em 4 grupos: altruísmo (31.4%), compensação económica (60.8%), conhecimento de pessoas com problemas de fertilidade (3.9%) e outros motivos (3.9%).

Tabela 16. Análise descritiva dos dados para dadoras submetidas a 2 ciclos de estimulação ovárica (n=51), assim como a significância das diferenças para cada uma das variáveis entre os grupos (ciclo 1 vs ciclo 2). Dados apresentados como média ± desvio padrão para variáveis contínuas ou percentagem (frequência) para variáveis categóricas. NS, não significativo; NA, não aplicável; Teste de *Wilcoxon* para amostras emparelhadas.

Parâmetros	Ciclo 1 (n=51)	Ciclo 2 (n=51)	P-value
Idade (anos)	25.0 ± 3.7	25.6 ± 3.6	<0.001
IMC (kg/m ²)	23.8 ± 3.5	-	NA
AMH (ng/mL)	4.6 ± 3.5	-	NA
Dose total de estimulação (UI)	1901.0 ± 501.6	2339.9 ± 733.3	<0.001
Dias de estimulação (dias)	10.0 ± 1.7	10.6 ± 2.0	0.026
Folículos no <i>trigger</i> (n)	20.4 ± 9.1	20.0 ± 7.9	NS
Ovócitos recuperados (n)	19.4 ± 8.5	19.6 ± 9.2	NS
Ovócitos MII (n)	15.5 ± 8.1	14.3 ± 7.3	NS
Ovócitos imaturos (n)	3.5 ± 2.7	3.7 ± 2.8	NS
Qualidade ovocitária normal [% (n)]	52.9 (27)	64.7 (33)	NS

A amostra incluiu mulheres que, voluntariamente, aderiram ao programa de doação de ovócitos e que após estudo clínico, genético e psicológico foram consideradas elegíveis para avançarem até ao momento de estimulação ovárica, com posterior punção folicular. Foram apenas incluídas no estudo dadoras que realizaram até 3 ciclos consecutivos de doação. Assim, excluíram-se do estudo 171 dadoras que no período analisado realizaram apenas 1 ciclo de doação.

Os resultados apresentados na Tabela 16 dizem respeito a 2 ciclos consecutivos de doação de ovócitos (n=51), nos quais a idade média das dadoras no primeiro ciclo foi de 25.0 ± 3.7 anos (idade compreendida entre os 19 anos e os 32 anos) e no segundo ciclo de doação 25.6 ± 3.6 anos (idade compreendida entre os 19 anos e os 33 anos). Apesar de, em termos matemáticos, terem sido encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as idades das dadoras em cada grupo (o que era inevitável),

considera-se que em termos biológicos este resultado não tem qualquer relevância, pois a idade média do segundo grupo é ainda bastante jovem.

Clinicamente, a dose prescrita para o primeiro ciclo de doação está diretamente relacionada com os valores de AMH e o número de folículos antrais. Tendo como base os resultados do primeiro ciclo relativamente à resposta folicular, número de ovócitos recuperados e maduros, houve uma necessidade de aumentar a dose num segundo ciclo de estimulação, com vista a otimizar o ciclo de doação. Esta tomada de decisão foi evidente, quando analisada a dose total/ dias de estimulação, no 2º ciclo de estimulação (Tabela 16). Nos restantes parâmetros (número de folículos no *trigger*, número de ovócitos recuperados, números de ovócitos maduros e de ovócitos imaturos), os valores mantiveram-se semelhantes ao longo dos 2 ciclos de doação (Tabela 16). O mesmo foi observado noutros estudos de ciclos consecutivos de doação de ovócitos (Caligara *et al.*, 2001; Jain *et al.*, 2005; Serna & García-Velasco, 2005), assim como em ciclos com ovócitos próprios, quando excluía a idade feminina (Hoveyda *et al.*, 2002; Kolibianakis *et al.*, 2002; de Boer *et al.*, 2004). Tais resultados permitem inferir que, apesar de existir um aumento na dose total de gonadotrofinas e dias de estimulação, não ocorre uma depleção da reserva ovárica ao longo dos ciclos de estimulação, já que não se verificou uma diminuição do número de ovócitos recuperados.

Tabela 17. Análise descritiva dos dados para dadoras submetidas a 3 ciclos de estimulação ovárica (n=19), assim como a significância das diferenças para cada uma das variáveis entre os grupos (ciclo 1 vs ciclo 2 vs ciclo 3). Dados apresentados como média ± desvio padrão para variáveis contínuas ou percentagem (frequência) para variáveis categóricas. NA, não aplicável; NS, não significativo. Teste de *Friedman* para análise de variância.

Parâmetros	Ciclo 1 (n=19)	Ciclo 2 (n=19)	Ciclo 3 (n=19)	P-value
Idade (anos)	25.3 ± 4.2	25.7 ± 4.1	26.2 ± 4.1	<0.001
Dose Total de estimulação (UI)	1901.3 ± 548.3	2202.6 ± 741.1	2219.7 ± 551.0	0.005
Dias de estimulação (dias)	10.1 ± 1.8	10.8 ± 2.1	9.9 ± 1.5	0.032
Folículos no trigger (n)	21.3 ± 8.5	22.4 ± 7.0	20.8 ± 6.6	0.043
Ovócitos recuperados (n)	17.9 ± 6.5	19.3 ± 6.7	21.2 ± 10.3	0.034
Ovócitos MII (n)	15.1 ± 6.4	14.7 ± 6.6	17.1 ± 10.2	0.042
Ovócitos imaturos (n)	2.8 ± 2.3	3.8 ± 2.2	2.9 ± 2.1	NS
Qualidade ovocitária normal [% (n)]	68.4 (13)	63.2 (12)	73.7 (14)	NS

Quando analisados os resultados clínicos e laboratoriais obtidos dos 3 ciclos sucessivos de doação, pode-se verificar a existência de uma diferença estatisticamente significativa

das idades ao longo do ciclo de doação (25.3 ± 4.2 – ciclo 1 vs 25.7 ± 4.1 – ciclo 2 vs 26.2 ± 4.1 – ciclo 3). Tal como referido anteriormente, considera-se que as diferenças encontradas são inevitáveis e não têm significado biológico, dado que esta população é constituída apenas por mulheres saudáveis e que se encontram no seu pico de fertilidade.

Analisando os dados relativamente à dose total de gonadotrofinas e número de dias de estimulação, verificou-se haver diferenças estatisticamente significativas com um aumento de dose de estimulação, que traduz as diferenças significativas em relação aos parâmetros laboratoriais, com ênfase no aumento do número de ovócitos recuperados e maduros, sem comprometer a qualidade ovocitária obtida. Os dados remetem-nos para a existência de uma curva de aprendizagem para inferir a resposta à estimulação de uma dadora, de acordo com o estudo base realizado e com os resultados obtidos nas primeiras dádivas. Mesmo conscientes que o aumento da dose de gonadotrofinas poderia ter como consequência efeitos secundários adversos (obrigatoriamente registados às entidades componentes), no período em estudo não houve registo de efeitos adversos à hiperestimulação controlada dos ovários, nomeadamente a OHSS.

É de sublinhar que o aumento da dose aplicada nos 3 ciclos de doação não aumentou exageradamente o número de ovócitos maduros obtidos. Pelo contrário, o número médio de ovócitos obtidos foi ao encontro do descrito na literatura, onde o número ideal de ovócitos se centrou entre 12 e 18 ovócitos, com vista a obter bons resultados nos *outcomes* de ciclos de PMA (Law *et al.*, 2021).

Tabela 18. Correlações (*Spearman*) entre os diferentes parâmetros. Dados apresentados como Rho (*p-value*).

Parâmetros	Folículos no <i>trigger</i> (n)	Ovócitos recuperados (n)	Ovócitos MII (n)	Ovócitos imaturos (n)
Idade (anos)	-0.327 (0.019)	-0.290 (0.039)	-0.299 (0.033)	-0.220 (0.121)
IMC (kg/m²)	-0.124 (0.387)	0.082 (0.567)	0.026 (0.859)	0.043 (0.762)
AMH (ng/ml)	0.448 (<0.001)	0.444 (0.001)	0.429 (0.002)	0.060 (0.676)

Tabela 19. Correlações (*Spearman*) entre o IMC e Dias de estimulação e Dose total. Dados apresentados como Rho (*p-value*).

Rho (<i>p-value</i>)	Dose Total (UI)	Dias de estimulação (dias)
IMC (kg/m²)	0.183 (0.198)	0.001 (0.992)

Quando estudadas as correlações entre os diferentes parâmetros evidenciados na Tabela 18, é possível verificar uma correlação negativa fraca entre a idade e o número

de folículos no dia do *trigger* (sem significado biológico). O parâmetro da AMH correlaciona-se positivamente (correlação moderada) com o número de folículos no *trigger*, número de ovócitos recuperados e com o número de ovócitos maduros obtidos. Relativamente ao IMC, não foi encontrada qualquer correlação com os parâmetros ovocitários (Tabela 18), nem com os parâmetros de estimulação ovocitária, dose e dias de estimulação (Tabela 19).

A AMH é uma hormona produzida pelas células da granulosa de folículos pré-antrais (Visser *et al.*, 2006) e tem-se revelado um bom preditor da reserva ovária. Num estudo de Polyzos *et al.* (2012), com uma população de dadoras submetidas a um protocolo de estimulação curto com antagonista, verificou-se que os valores de AMH estavam correlacionados (correlação moderada) com a resposta ovária. Tal achado significa que o aumento dos níveis de AMH doseados está positivamente relacionado com o número de ovócitos recuperados após punção folicular. Os resultados obtidos no nosso estudo estão alinhados com os de outros estudos publicados (La Marca *et al.*, 2006; Riggs *et al.*, 2011; Hipp *et al.*, 2020). Tais evidências intensificam a pertinência do doseamento da AMH como marcador da reserva ovária, permitindo a extrapolação da resposta ovocitária da dadora em ciclo.

No período a que se refere este estudo não foi encontrada uma correlação entre o IMC e os parâmetros ovocitários (Tabela 18), assim como entre a dose e número de dias de estimulação ovária (Tabela 19). Tal achado pode ser devido ao facto de 73% da nossa população de dadoras apresentarem um IMC normal, isto é, entre 18.5 kg/m² e 29.9 kg/m² e apenas 27% possuírem um IMC superior a 25 kg/m² (sobrepeso) (Tabela 18 e 19). A literatura que aborda esta temática não é consensual. Num estudo que avaliou o impacto do IMC das dadoras em ciclos de doação não foi encontrada uma correlação entre o aumento do IMC e a dose de gonadotrofinas administrada (E. R. Cardozo *et al.*, 2016). No entanto, no estudo publicado por Wittemer *et al.* (2000) concluiu-se que, nos casos em que o IMC era >25 kg/m² ou <20 kg/m², quando prescrito um protocolo de estimulação curto com antagonista, as dadoras necessitavam de uma maior dose de estimulação para o desenvolvimento folicular. Apesar de, mesmo assim, se recuperarem menos ovócitos quando comparado com dadoras com IMC normal.

5.4 Conclusão

A doação de ovócitos é uma prática de extrema importância, já que permite a resolução de problemas de infertilidade na ausência/má qualidade de gâmetas próprios.

A aquisição de conhecimento da resposta das dadoras à estimulação ao longo dos 3 ciclos de doação, permitiu aumentar a dose de gonadotrofinas administradas contribuindo de forma positiva no número de ovócitos recuperados sem comprometer a qualidade dos gâmetas.

Efeitos secundários decorrentes da hiperestimulação controlada dos ovários, nomeadamente quadros de OHSS, manteve-se a zero ao longo dos ciclos, mesmo com o aumento da dose de gonadotrofinas, o que nos permite inferir que o processo de doação de gâmetas é seguro e não compromete o estado de saúde geral da dadora.

No futuro, é importante aumentar o número de ciclos incluídos na amostra com vista a aumentar a robustez dos resultados obtidos, de forma a corroborar (ou não) os achados do presente estudo. Para além disso, seria interessante cruzar os ciclos das dadoras com os ciclos das respetivas recetoras, isto é, analisar os resultados das sucessivas doações nos desfechos dos ciclos das recetoras (taxa de fecundação, taxa de blastocisto, taxa de implantação e de gravidez).

6. Considerações finais

Os grandes avanços na prática clínica e laboratorial ao nível da Procriação Medicamente Assistida revolucionaram a medicina no âmbito da infertilidade, e possibilitaram o diagnóstico e tratamento de inúmeras causas de infertilidade, que outrora eram irreversíveis. Ao longo dos anos foram otimizados os diferentes protocolos de estimulação ovárica, assim como, protocolos de processamento espermático, metodologia cirúrgica de recolha espermática, técnicas laboratoriais, como a IIU, FIV a ICSI, a possibilidade de criopreservação de gâmetas e até mesmo de embriões. Todos estes tratamentos têm como grande finalidade a concretização do sonho de conceber um bebé. No mundo da PMA, todos os dias existe uma nova descoberta, uma nova aprendizagem é feita, um novo ciclo é iniciado e outro terminado. A realização deste estágio permitiu uma maior certeza sobre o meu futuro profissional, ser Embriologista e fazer parte da realização do sonho de alguém.

Durante o período de estágio foi-me possível o desenvolvimento de competências laboratoriais essenciais para a prática das técnicas inerentes à Procriação Medicamente Assistida. Inicialmente, o estágio consistiu na observação cuidada e meticulosa das práticas laboratoriais realizadas pelos embriologistas residentes. De um modo gradual, foi-me concedida a prática de algumas técnicas laboratoriais. Tive a oportunidade de realizar de forma autónoma, mas com supervisão, as seguintes técnicas laboratoriais: preparação de meios, espermogramas, procura de espermatozoides recolhidos via biópsia testicular, processamento de amostras espermáticas para uso em ciclos de IIU, FIV ou ICSI e criopreservação espermática; no que respeita aos gâmetas femininos, tive oportunidade de realizar autonomamente a pesquisa de ovócitos no seio do líquido folicular, desnudação ovocitária, avaliação da maturidade e morfologia ovocitária, e a sua vitrificação; foi-me possibilitado o treino da técnica de ICSI com ovócitos imaturos, e no período final tive a oportunidade de realizar a técnica em ovócitos maduros; fui capaz de avaliar a fecundação e acompanhar e avaliar o desenvolvimento embrionário, e colaborar na decisão sobre qual o melhor embrião a ser transferido e/ou criopreservado, assim como, fui capaz de realizar a vitrificação embrionária; pude, também, realizar a técnica de transferência embrionária. A Tabela 20, apresenta o meu *logbook*, com a estimativa do número de procedimentos e técnicas laboratoriais realizadas, ao longo do estágio.

Uma parte essencial de um laboratório de PMA, é também o controlo de qualidade, no qual também colaborei, nomeadamente na determinação da temperatura das

superfícies das câmaras de fluxo laminar, assim como, da estação do microscópio ótico invertido; verificar o nível de azoto nos tanques de armazenamento de gâmetas e embriões e sempre que necessário proceder ao enchimento dos mesmos; determinação de pH dos meios; manutenção de incubadoras e câmaras de fluxo laminar com mudança de água e filtros, respetivamente; e por fim, na manutenção de stocks de meios e consumíveis.

Tabela 20. Logbook durante o período de estágio na clínica Procriar- Centro de Obstetrícia e Medicina da Reprodução do Porto (28 de setembro de 2020 a 29 de setembro de 2021).

Técnicas laboratoriais	N
Espermograma	>70
Processamento de amostra espermática para uso em ciclo	>50
Criopreservação de gâmetas masculinos (próprios/dadores)	>65
Isolamento de espermatozoides de biópsia testicular	2
Pesquisa, recolha e processamento de ovócitos pós-punção	>20
ICSI	21 ovócitos maduros microinjetados
Avaliação da fecundação	>20
Classificação morfocinética do desenvolvimento embrionário	>20
Transferência embrionária	3
Vitrificação ovocitária	2 ovócitos
Vitrificação embrionária	>20
Desvitrificação ovocitária	2 ovócitos
Desvitrificação embrionária	>15
Biópsia embrionária	0

7. Referências Bibliográficas

- AbdelHafez, F., Desai, N., Abou-Setta, A., Falcone, T., & Goldfarb, J. (2010). Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis. *Reproductive BioMedicine Online*, 20(2), 209-222. doi:10.1016/j.rbmo.2009.11.013
- Abou-Setta, A. M., Al-Inany, H. G., Mansour, R. T., Serour, G. I., & Aboulghar, M. A. (2005). Soft versus firm embryo transfer catheters for assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*, 20(11), 3114-3121. doi:10.1093/humrep/dei198
- Alper, M. (2012). Treatment Options: III. In Vitro Fertilization. In S. Bayer, M. Alper, & A. Penzias (Eds.), *The Boston IVF Handbook of Infertility* (3 ed., pp. 69-82): CRC Press.
- Alpha SiRM, & ESHRE SIGE. (2011). The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction*, 26(6), 1270-1283. doi:10.1093/humrep/der037
- Anger, J., Gilbert, B., & Goldstein, M. (2003). Cryopreservation of Sperm: Indications, Methods and Results. *The Journal of Urology*, 170(4, Part 1), 1079-1084. doi:10.1097/01.ju.0000084820.98430.b8
- Anifandis, G., Dafopoulos, K., Messini, C. I., Chalvatzas, N., & Messinis, I. E. (2010). Effect of the Position of the Polar Body During ICSI on Fertilization Rate and Embryo Development. *Reproductive Sciences*, 17(9), 849-853. doi:10.1177/1933719110372421
- Argyle, C. E., Harper, J. C., & Davies, M. C. (2016). Oocyte cryopreservation: where are we now? *Human Reproduction Update*, 22(4), 440-449. doi:10.1093/humupd/dmw007
- Asero, P., Calogero, A. E., Condorelli, R. A., Mongioi, L., Vicari, E., Lanzafame, F., Crisci, R., & La Vignera, S. (2014). Relevance of genetic investigation in male infertility. *Journal of Endocrinological Investigation*, 37(5), 415-427. doi:10.1007/s40618-014-0053-1
- Aust, T. R., & Lewis-Jones, D. I. (2004). Retrograde ejaculation and male infertility. *Hospital Medicine*, 65(6), 361-364. doi:10.12968/hosp.2004.65.6.13762
- Azziz, R., Carmina, E., Chen, Z., Dunaif, A., Laven, J. S. E., Legro, R., Lizneva, D., Natterson-Horowitz, B., Teede, H. J., & Yildiz, B. O. (2016). Polycystic ovary syndrome. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1), 16057. doi:10.1038/nrdp.2016.57

- Balaban, B., & Urman, B. (2006). Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reproductive BioMedicine Online*, 12(5), 608-615. doi:10.1016/s1472-6483(10)61187-x
- Balaban, B., Urman, B., Yakin, K., & Isiklar, A. (2006). Laser-assisted hatching increases pregnancy and implantation rates in cryopreserved embryos that were allowed to cleave in vitro after thawing: a prospective randomized study. *Human Reproduction*, 21(8), 2136-2140. doi:10.1093/humrep/del097
- Balakier, H., Bouman, D., Sojecki, A., Librach, C., & Squire, J. A. (2002). Morphological and cytogenetic analysis of human giant oocytes and giant embryos. *Human Reproduction*, 17(9), 2394-2401. doi:10.1093/humrep/17.9.2394
- Balakier, H., Sojecki, A., Motamedi, G., & Librach, C. (2004). Time-dependent capability of human oocytes for activation and pronuclear formation during metaphase II arrest. *Human Reproduction*, 19(4), 982-987. doi:10.1093/humrep/deh158
- Balasz, J., & Gratacós, E. (2012). Delayed childbearing: effects on fertility and the outcome of pregnancy. *Current opinion in obstetrics & gynecology*, 24(1473-656X (Electronic)), 187-193. doi:10.1097/GCO.0b013e3283517908
- Baramki, T. A. (2005). Hysterosalpingography. *Fertility and Sterility*, 83(6), 1595-1606. doi:10.1016/j.fertnstert.2004.12.050
- Barbieri, R. L. (2014). Female Infertility. In J. F. Strauss & R. L. Barbieri (Eds.), *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology* (7 ed., pp. 512-537.e517). Philadelphia: W.B. Saunders.
- Baskaran, S., Finelli, R., Agarwal, A., & Henkel, R. (2021). Diagnostic value of routine semen analysis in clinical andrology. *Andrologia*, 53(2), e13614. doi:10.1111/and.13614
- Bayer, S. (2007). Factors affecting fertility. In T. A. Mahmood (Ed.), *The Boston IVF Handbook of Infertility* (Vol. 27, pp. 11-18). Journal of Obstetrics and Gynaecology: Taylor & Francis.
- Bayer, s., & Alper, M. (2007). The infertility workup. In T. A. Mahmood (Ed.), *The Boston IVF Handbook of Infertility* (2 ed., Vol. 27): Taylor & Francis.
- Bayer, S., Alper, M., & Penzias, A. (2007). Treatment options II. Intrauterine inseminations. In *The Boston IVF Handbook of Infertility: A Practical Guide for Practitioners Who Care for Infertile Couples* (2 ed., Vol. 27, pp. 65-68).
- Ben-Ami, I., Raziell, A., Friedler, S., Gidoni, Y., Ron-EI, R., & Fauser, B. (2012). Indications for IVF treatment: From diagnosis to prognosis. In D. Gardner, C. Howles, Z. Shoham, & A. Weissman (Eds.), *Textbook of Assisted Reproductive Techniques* (4 ed., Vol. 2, pp. 18-30): CRC Press.

- Blake, M., Garrisi, J., Tomkin, G., & Cohen, J. (2000). Sperm deposition site during ICSI affects fertilization and development. *Fertility and Sterility*, 73(1), 31-37. doi:10.1016/s0015-0282(99)00465-3
- Bodri, D., Sunkara, S. K., & Coomarasamy, A. (2011). Gonadotropin-releasing hormone agonists versus antagonists for controlled ovarian hyperstimulation in oocyte donors: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 95(1), 164-169. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.06.068
- Bodri, D., Vernaev, V., Guillén, J. J., Vidal, R., Figueras, F., & Coll, O. (2006). Comparison between a GnRH antagonist and a GnRH agonist flare-up protocol in oocyte donors: a randomized clinical trial. *Human Reproduction*, 21(9), 2246-2251. doi:10.1093/humrep/del152
- Boivin, J., Bunting, L., Collins, J. A., & Nygren, K. G. (2007). International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human Reproduction*, 22(6), 1506-1512. doi:10.1093/humrep/dem046
- Borges, E., Rossi, L. M., Locambo de Freitas, C. V., Guilherme, P., Bonetti, T. C. S., Iaconelli, A., & Pasqualotto, F. F. (2007). Fertilization and pregnancy outcome after intracytoplasmic injection with fresh or cryopreserved ejaculated spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 87(2), 316-320. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.06.032
- Borini, A., & Coticchio, G. (2008). The human oocyte: controlled rate cooling. In C. Howles, D. Gardner, A. Weissman, & Z. Shoham (Eds.), *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Laboratory and Clinical Perspectives* (3 ed., pp. 255-266): Informa Health Care.
- Bormann, C. L. (2014). Gamete and Embryo Manipulation. In J. F. Strauss & R. L. Barbieri (Eds.), *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology* (7 ed., pp. 774-790.e779). Philadelphia: W.B. Saunders.
- Bourne, H., Archer, J., Edgar, D., & Baker, H. G. (2009). Sperm preparation techniques. In D. Gardner, A. Weissman, C. Howles, & Z. Shoham (Eds.), *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Laboratory and Clinical Perspectives* (3 ed., pp. 53-66): Informa Health Care.
- Brito, L., Althouse, G., Aurich, C., Chenoweth, P., Eilts, B., Love, C., Luvoni, G., Mitchell, J., Peter, A., Pugh, D., & Waberski, D. (2016). Andrology laboratory review: Evaluation of sperm concentration. *Theriogenology*, 85(9), 1507-1527. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.01.002

- Brugh, V. M., & Lipshultz, L. I. (2004). Male factor infertility: evaluation and management. *Medical Clinics of North America*, *88*(2), 367-385. doi:10.1016/s0025-7125(03)00150-0
- Buckett, W. M. (2006). A review and meta-analysis of prospective trials comparing different catheters used for embryo transfer. *Fertility and Sterility*, *85*(3), 728-734. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.08.031
- Bukulmez, O., Li, Q., Carr, B., Leader, B., Doody, K., & Doody, K. (2010). Repetitive oocyte donation does not decrease serum anti-Müllerian hormone levels. *Fertility and Sterility*, *94*(3), 905-912. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.05.017
- Bulletti, C., Coccia, M., Battistoni, S., & Borini, A. (2010). Endometriosis and infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *27*(8), 441-447. doi:10.1007/s10815-010-9436-1
- Caligara, C., Navarro, J., Vargas, G., Simón, C., Pellicer, A., & Remohí, J. (2001). The effect of repeated controlled ovarian stimulation in donors. *Human Reproduction*, *16*(11), 2320-2323. doi:10.1093/humrep/16.11.2320
- Cardozo, E. R., Karmon, A. E., Gold, J., Petrozza, J. C., & Styer, A. K. (2015). Reproductive outcomes in oocyte donation cycles are associated with donor BMI. *Human Reproduction*, *31*(2), 385-392. doi:10.1093/humrep/dev298
- Cardozo, E. R., Karmon, A. E., Gold, J., Petrozza, J. C., & Styer, A. K. (2016). Reproductive outcomes in oocyte donation cycles are associated with donor BMI. *Human Reproduction*, *31*(2), 385-392. doi:10.1093/humrep/dev298
- Cendron, M., Keating, M. A., Huff, D. S., Koop, C. E., Snyder, H. M., 3rd, & Duckett, J. W. (1989). Cryptorchidism, orchiopexy and infertility: a critical long-term retrospective analysis. *Journal of Urology*, *142*(2 Pt 2), 559-562; discussion 572. doi:10.1016/s0022-5347(17)38815-8
- Cetin, M. T., Kumtepe, Y., Kiran, H., & Seydaoglu, G. (2010). Factors affecting pregnancy in IVF: age and duration of embryo transfer. *Reproductive BioMedicine Online*, *20*(3), 380-386. doi:10.1016/j.rbmo.2009.12.008
- Chian, R.-C., Wang, Y., & Li, Y.-R. (2014). Oocyte vitrification: advances, progress and future goals. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *31*(4), 411-420. doi:10.1007/s10815-014-0180-9
- Christianson, M. S., & Bellver, J. (2018). Innovations in assisted reproductive technologies: impact on contemporary donor egg practice and future advances. *Fertility and Sterility*, *110*(6), 994-1002. doi:10.1016/j.fertnstert.2018.09.020
- Ciotti, P. M., Notarangelo, L., Morselli-Labate, A. M., Felletti, V., Porcu, E., & Venturoli, S. (2004). First polar body morphology before ICSI is not related to embryo

quality or pregnancy rate. *Human Reproduction*, 19(10), 2334-2339. doi:10.1093/humrep/deh433

CNPMA. Doação de ovócitos. Retrieved from <https://www.cnpma.org.pt/cidadaos/Paginas/doacao-de-ovocitos.aspx>

CNPMA. (2019). Testes genéticos de diagnóstico. Retrieved from <https://www.cnpma.org.pt/cidadaos/Paginas/Testes-geneticos-de-diagnostico.aspx>

CNPMA. (2021). Requisitos e Parâmetros de Funcionamento dos Centros de PMA. Retrieved from https://www.cnpma.org.pt/profissionais/Documents/Requisitos_CentrosPMA_2021.pdf

Cobo, A., García-Velasco, J., Coello, A., Domingo, J., Pellicer, A., & Remohí, J. (2016). Oocyte vitrification as an efficient option for elective fertility preservation. *Fertility and Sterility*, 105(3), 755-764.e758. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.11.027

Cobo, A., Giles, J., Paoletti, S., Pellicer, A., Remohí, J., & García-Velasco, J. A. (2020). Oocyte vitrification for fertility preservation in women with endometriosis: an observational study. *Fertility and Sterility*, 113(4), 836-844. doi:10.1016/j.fertnstert.2019.11.017

Cobo, A., Kuwayama, M., Pérez, S., Ruiz, A., Pellicer, A., & Remohí, J. (2008). Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertility and Sterility*, 89(6), 1657-1664. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.05.050

Cobo, A., Meseguer, M., Remohí, J., & Pellicer, A. (2010). Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Human Reproduction*, 25(9), 2239-2246. doi:10.1093/humrep/deq146

Cohlen, B., Bijkerk, A., Van der Poel, S., & Ombelet, W. (2018). IUI: review and systematic assessment of the evidence that supports global recommendations. *Human Reproduction Update*, 24(3), 300-319. doi:10.1093/humupd/dmx041

Committee on Gynecologic Practice, & ASRM. (2019). Infertility Workup for the Women's Health Specialist. *Obstetrics and Gynecology*, 133(6), e377-e384. doi:10.1097/aog.0000000000003271

Committee on Gynecologic Practice of American College of Obstetricians and Gynecologists, & Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. (2008). Age-related fertility decline: a committee opinion. *Fertility and Sterility*, 90(3), 486-487. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.08.006

- Coroleu, B., Barri, P. N., Carreras, O., Martínez, F., Parriego, M., Hereter, L., Parera, N., Veiga, A., & Balasch, J. (2002). The influence of the depth of embryo replacement into the uterine cavity on implantation rates after IVF: a controlled, ultrasound-guided study. *Human Reproduction*, 17(2), 341-346. doi:10.1093/humrep/17.2.341
- Coskun, S., Hellani, A., Jaroudi, K., Al-Mayman, H., Al-Kabra, M., & Qeba, M. (2003). Nucleolar precursor body distribution in pronuclei is correlated to chromosomal abnormalities in embryos. *Reproductive BioMedicine Online*, 7(1), 86-90. doi:10.1016/S1472-6483(10)61734-8
- Dale, B., & Elder, K. (2010a). First stages of development. In B. Dale & K. Elder (Eds.), *In-Vitro Fertilization* (3 ed., pp. 64-81). Cambridge: Cambridge University Press.
- Dale, B., & Elder, K. (2010b). Gametes and gametogenesis. In B. Dale & K. Elder (Eds.), *In-Vitro Fertilization* (3 ed., pp. 28-49). Cambridge: Cambridge University Press.
- Dale, B., & Elder, K. (2010c). Implantation and early stages of fetal development. In B. Dale & K. Elder (Eds.), *In-Vitro Fertilization* (3 ed., pp. 82-92). Cambridge: Cambridge University Press.
- Dale, B., & Elder, K. (2010d). Micromanipulation techniques. In B. Dale & K. Elder (Eds.), *In-Vitro Fertilization* (3 ed., pp. 216-237). Cambridge: Cambridge University Press.
- Dale, B., & Elder, K. (2010e). Sperm–oocyte interaction. In B. Dale & K. Elder (Eds.), *In-Vitro Fertilization* (3 ed., pp. 50-63). Cambridge: Cambridge University Press.
- Danis, R. B., & Samplaski, M. K. (2019). Sperm Morphology: History, Challenges, and Impact on Natural and Assisted Fertility. *Current Urology Reports*, 20(8), 43. doi:10.1007/s11934-019-0911-7
- Datta, J., Palmer, M. J., Tanton, C., Gibson, L. J., Jones, K. G., Macdowall, W., Glasier, A., Sonnenberg, P., Field, N., Mercer, C. H., Johnson, A. M., & Wellings, K. (2016). Prevalence of infertility and help seeking among 15 000 women and men. *Human Reproduction*, 31(9), 2108-2118. doi:10.1093/humrep/dew123
- de Boer, E. J., Den Tonkelaar, I., Burger, C. W., Looman, C. W., van Leeuwen, F. E., & te Velde, E. R. (2004). The number of retrieved oocytes does not decrease during consecutive gonadotrophin-stimulated IVF cycles. *Human Reproduction*, 19(4), 899-904. doi:10.1093/humrep/deh178
- Dechaud, H., Anahory, T., Reyftmann, L., Loup, V., Hamamah, S., & Hedon, B. (2006). Obesity does not adversely affect results in patients who are undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 127(1), 88-93. doi:10.1016/j.ejogrb.2005.12.009

- Demir, B., Dilbaz, B., Cinar, O., Karadag, B., Tasci, Y., Kocak, M., Dilbaz, S., & Goktolga, U. (2011). Factors affecting pregnancy outcome of intrauterine insemination cycles in couples with favourable female characteristics. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 31(5), 420-423. doi:10.3109/01443615.2011.569780
- Dondorp, W., de Wert, G., Pennings, G., Shenfield, F., Devroey, P., Tarlatzis, B., & Barri, P. (2010). Lifestyle-related factors and access to medically assisted reproduction. *Human Reproduction*, 25(3), 578-583. doi:10.1093/humrep/dep458
- Dubey, A., Dayal, M. B., Frankfurter, D., Balazy, P., Peak, D., & Gindoff, P. R. (2008). The influence of sperm morphology on preimplantation genetic diagnosis cycles outcome. *Fertility and Sterility*, 89(6), 1665-1669. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.06.052
- Dun, E. C., & Nezhat, C. H. (2012). Tubal factor infertility: diagnosis and management in the era of assisted reproductive technology. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*, 39(4), 551-566. doi:10.1016/j.ogc.2012.09.006
- Duran, H., Morshedi, M., Kruger, T., & Oehninger, S. (2002). Intrauterine insemination: a systematic review on determinants of success. *Human Reproduction Update*, 8(4), 373-384. doi:10.1093/humupd/8.4.373
- Ebner, T., Moser, M., Shebl, O., Sommergruber, M., Yaman, C., & Tews, G. (2008). Blood clots in the cumulus-oocyte complex predict poor oocyte quality and post-fertilization development. *Reproductive BioMedicine Online*, 16(6), 801-807. doi:10.1016/s1472-6483(10)60145-9
- Ebner, T., Moser, M., Sommergruber, M., Gaiswinkler, U., Wiesinger, R., Puchner, M., & Tews, G. (2003). Presence, but not type or degree of extension, of a cytoplasmic halo has a significant influence on preimplantation development and implantation behaviour. *Human Reproduction*, 18(11), 2406-2412. doi:10.1093/humrep/deg452
- Ebner, T., Moser, M., & Tews, G. (2006). Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI? *Reproductive BioMedicine Online*, 12(4), 507-512. doi:10.1016/S1472-6483(10)62006-8
- Ebner, T., Yaman, C., Moser, M., Sommergruber, M., Pölz, W., & Tews, G. (2001). The ineffective loading process of the embryo transfer catheter alters implantation and pregnancy rates. *Fertility and Sterility*, 76(3), 630-632. doi:10.1016/s0015-0282(01)01980-x
- Eisenberg, M. L., & Meldrum, D. (2017). Effects of age on fertility and sexual function. *Fertility and Sterility*, 107(2), 301-304. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.12.018

- Elder, K., & Dale, B. (2011). Oocyte retrieval and embryo culture. In *In-Vitro Fertilization* (3 ed., pp. 157-190). Cambridge: Cambridge University Press.
- Emanuel, M. H. (2013). New developments in hysteroscopy. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 27(3), 421-429. doi:10.1016/j.bpobgyn.2012.11.005
- ESHRE Capri Workshop Group. (2009). Intrauterine insemination. *Human Reproduction Update*, 15(3), 265-277. doi:10.1093/humupd/dmp003
- ESHRE Capri Workshop Group. (2017). A prognosis-based approach to infertility: understanding the role of time. *Human Reproduction*, 32(8), 1556-1559. doi:10.1093/humrep/dex214
- ESHRE PGT Consortium, SIG-Embryology Biopsy Working Group, Kokkali, G., Coticchio, G., Bronet, F., Celebi, C., Cimadomo, D., Goossens, V., Liss, J., Nunes, S., Sfontouris, I., Vermeulen, N., Zakharova, E., & De Rycke, M. (2020). ESHRE PGT Consortium and SIG Embryology good practice recommendations for polar body and embryo biopsy for PGT. *Human Reproduction Open*, 2020(3). doi:10.1093/hropen/hoaa020
- ESHRE Task Force on Ethics and Law. (2002). Gamete and embryo donation. *Human Reproduction*, 17(5), 1407-1408. doi:10.1093/humrep/17.5.1407
- Esteves, S., & Verza, S. (2012). PESA/TESA/TESE Sperm Processing. In Z. P. Nagy, A. C. Varghese, & A. Agarwal (Eds.), *Practical Manual of In Vitro Fertilization: Advanced Methods and Novel Devices* (pp. 207-220). New York, NY: Springer New York.
- Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine. (2019). Interests, obligations, and rights in gamete and embryo donation: an Ethics Committee opinion. *Fertility and Sterility*, 111(4), 664-670. doi:10.1016/j.fertnstert.2019.01.018
- Evans, J., Hannan, N. J., Edgell, T. A., Vollenhoven, B. J., Lutjen, P. J., Osianlis, T., Salamonsen, L. A., & Rombauts, L. J. F. (2014). Fresh versus frozen embryo transfer: backing clinical decisions with scientific and clinical evidence. *Human Reproduction Update*, 20(6), 808-821. doi:10.1093/humupd/dmu027
- Ezoe, K., Hickman, C., Miki, T., Okimura, T., Uchiyama, K., Yabuuchi, A., Kobayashi, T., Coticchio, G., & Kato, K. (2020). Cytoplasmic halo characteristics during fertilization and their implications for human preimplantation embryo development and pregnancy outcome. *Reproductive BioMedicine Online*, 41(2), 191-202. doi:10.1016/j.rbmo.2020.02.017

- Fanchin, R., Righini, C., Olivennes, F., Taylor, S., de Ziegler, D., & Frydman, R. (1998). Uterine contractions at the time of embryo transfer alter pregnancy rates after in-vitro fertilization. *Human Reproduction*, 13(7), 1968-1974. doi:10.1093/humrep/13.7.1968
- Fatemi, H. M., Blockeel, C., & Devroey, P. (2012). Ovarian Stimulation: Today and Tomorrow. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(3), 392-397. doi:10.2174/138920112799362007
- Fauser, B. C., & Van Heusden, A. M. (1997). Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocrine Reviews*, 18(1), 71-106. doi:10.1210/edrv.18.1.0290
- Fauser, M. (2014). Medical Approaches to Ovarian Stimulation for Infertility. In J. F. Strauss & R. L. Barbieri (Eds.), *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology* (7 ed., pp. 701-733.e708). Philadelphia: W.B. Saunders.
- Fox, S. I. (2011). Reproduction. In *Human Physiology* (12th ed., pp. 695-742): McGraw-Hill Companies.
- Franken, D. R., Barendsen, R., & Kruger, T. F. (2000). A continuous quality control program for strict sperm morphology. *Fertility and Sterility*, 74(4), 721-724. doi:10.1016/s0015-0282(00)01498-9
- French, D. B., Sabanegh, E. S., Goldfarb, J., & Desai, N. (2010). Does severe teratozoospermia affect blastocyst formation, live birth rate, and other clinical outcome parameters in ICSI cycles? *Fertility and Sterility*, 93(4), 1097-1103. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.10.051
- Gabrielsen, A., Agerholm, I., Toft, B., Hald, F., Petersen, K., Aagaard, J., Feldinger, B., Lindenberg, S., & Fedder, J. (2004). Assisted hatching improves implantation rates on cryopreserved-thawed embryos. A randomized prospective study. *Human Reproduction*, 19(10), 2258-2262. doi:10.1093/humrep/deh434
- Garcia-Velasco, J. A., Domingo, J., Cobo, A., Martínez, M., Carmona, L., & Pellicer, A. (2013). Five years' experience using oocyte vitrification to preserve fertility for medical and nonmedical indications. *Fertility and Sterility*, 99(7), 1994-1999. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.02.004
- Giudice, L. C. (2010). Endometriosis. *New England Journal of Medicine*, 362(25), 2389-2398. doi:10.1056/NEJMcp1000274
- Goudas, V. T., Hammitt, D. G., Damario, M. A., Session, D. R., Singh, A. P., & Dumesic, D. A. (1998). Blood on the embryo transfer catheter is associated with decreased rates of embryo implantation and clinical pregnancy with the use of in vitro

- fertilization-embryo transfer. *Fertility and Sterility*, 70(5), 878-882. doi:10.1016/s0015-0282(98)00315-x
- Granot, I., & Dekel, N. (2008). Preparation and evaluation of oocytes for ICSI. In C. Howles, D. Gardner, A. Weissman, & Z. Shoham (Eds.), *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Laboratory and Clinical Perspectives* (3 ed., pp. 103-110): Informa Health Care.
- Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2011a). Female Physiology Before Pregnancy and Female Hormones. In *Textbook of Medical Physiology* (pp. 987-1000): Elsevier Saunders.
- Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2011b). Pregnancy and Lactation. In *Textbook of Medical Physiology* (12th ed., pp. 1003-1014): Elsevier Saunders.
- Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2011c). Reproductive and Hormonal Functions of the Male. In *Textbook of Medical Physiology* (12th ed., pp. 973-986): Elsevier Saunders.
- Hamilton-Fairley, D., & Taylor, A. (2003). Anovulation. *British Medical Journal*, 327(7414), 546-549. doi:10.1136/bmj.327.7414.546
- Hardarson, T., Van Landuyt, L., & Jones, G. (2012). The blastocyst. *Human Reproduction*, 27(suppl_1), i72-i91. doi:10.1093/humrep/des230
- Hassan-Ali, H., Hisham-Saleh, A., El-Gezeiry, D., Baghdady, I., Ismaeil, I., & Mandelbaum, J. (1998). Perivitelline space granularity: a sign of human menopausal gonadotrophin overdose in intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*, 13(12), 3425-3430. doi:10.1093/humrep/13.12.3425
- Hatasaka, H. (2011). Clinical Management of the Uterine Factor in Infertility. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 54(4), 696-709. doi:10.1097/GRF.0b013e3182353d68
- Hauser, R., Botchan, A., Amit, A., Ben Yosef, D., Gamzu, R., Paz, G., Lessing, J. B., Yogev, L., & Yavetz, H. (1998). Multiple testicular sampling in non-obstructive azoospermia--is it necessary? *Human Reproduction*, 13(11), 3081-3085. doi:10.1093/humrep/13.11.3081
- Hebles, M., Dorado, M., Gallardo, M., González-Martínez, M., & Sánchez-Martín, P. (2015). Seminal quality in the first fraction of ejaculate. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 61(2), 113-116. doi:10.3109/19396368.2014.999390
- Hipp, H. S., Gaskins, A. J., Nagy, Z. P., Capelouto, S. M., Shapiro, D. B., & Spencer, J. B. (2020). Effect of oocyte donor stimulation on recipient outcomes: data from a US national donor oocyte bank. *Human Reproduction*, 35(4), 847-858. doi:10.1093/humrep/deaa003

- Hoveyda, F., Engmann, L., Steele, J., Lopez Bernal, A., & Barlow, D. H. (2002). Ovarian response in three consecutive in vitro fertilization cycles. *Fertility and Sterility*, 77(4), 706-710. doi:10.1016/s0015-0282(01)03237-x
- Huisman, G. J., Fauser, B. C., Eijkemans, M. J., & Pieters, M. H. (2000). Implantation rates after in vitro fertilization and transfer of a maximum of two embryos that have undergone three to five days of culture. *Fertility and Sterility*, 73(1), 117-122. doi:10.1016/s0015-0282(99)00458-6
- Hur, C., Rehmer, J., Flyckt, R., & Falcone, T. (2019). Uterine Factor Infertility: A Clinical Review. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 62(2), 257-270. doi:10.1097/grf.0000000000000448
- Hwang, K., Alukal, J., Lamb, D., & Lipshultz, L. (2012). Processing and cryopreservation of testicular sperm. In D. Gardner, C. Howles, Z. Shoham, & A. Weissman (Eds.), (4 ed., Vol. 2, pp. 258-262): CRC Press.
- Jain, A., Robins, J. C., Williams, D. B., & Thomas, M. A. (2005). The effect of multiple cycles in oocyte donors. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 192(5), 1382-1384. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2004.12.038>
- Jarow, J. P. (2001). Effects of varicocele on male fertility. *Human Reproduction Update*, 7(1), 59-64. doi:10.1093/humupd/7.1.59
- Jefferys, A., Siassakos, D., & Wardle, P. (2012). The management of retrograde ejaculation: a systematic review and update. *Fertility and Sterility*, 97(2), 306-312. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.11.019
- Jensen, C. F. S., Østergren, P., Dupree, J. M., Ohl, D. A., Sønksen, J., & Fode, M. (2017). Varicocele and male infertility. *Nature Reviews Urology*, 14(9), 523-533. doi:10.1038/nrurol.2017.98
- Jones, R. E., & Lopez, K. H. (2006a). Endocrinology, Brain and Pituitary Gland. In R. E. Jones & K. H. Lopez (Eds.), *Human Reproductive Biology* (3th ed., pp. 3-29). San Diego: Academic Press.
- Jones, R. E., & Lopez, K. H. (2006b). The Female Reproductive System. In R. E. Jones & K. H. Lopez (Eds.), *Human Reproductive Biology* (3th ed., pp. 31-72). San Diego: Academic Press.
- Jones, R. E., & Lopez, K. H. (2006c). Gamete Transport and Fertilization. In R. E. Jones & K. H. Lopez (Eds.), *Human Reproductive Biology* (3th ed., pp. 231-252). San Diego: Academic Press.
- Jones, R. E., & Lopez, K. H. (2006d). The Male Reproductive System. In R. E. Jones & K. H. Lopez (Eds.), *Human Reproductive Biology (Third Edition)* (pp. 97-123). San Diego: Academic Press.

- Jones, R. E., & Lopez, K. H. (2014). The Male Reproductive System. In R. E. Jones & K. H. Lopez (Eds.), *Human Reproductive Biology* (pp. 67-83). San Diego: Academic Press.
- Kandavel, V., & Cheong, Y. (2018). Does intra-uterine insemination have a place in modern ART practice? *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, *53*, 3-10. doi:10.1016/j.bpobgyn.2018.08.003
- Kaser, D., Ginsburg, E. S., Carrell, D., & Racowsky, C. (2014). Assisted Reproduction. In J. F. Strauss & R. L. Barbieri (Eds.), *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology* (7 ed., pp. 734-773.e712). Philadelphia: W.B. Saunders.
- Kaupp, U. B., Kashikar, N. D., & Weyand, I. (2008). Mechanisms of sperm chemotaxis. *Annu Rev Physiol*, *70*, 93-117. doi:10.1146/annurev.physiol.70.113006.100654
- Kitazato. (2019). CRYOTOP SAFETY KIT Vitrification Protocol for Cryotop® Method. Retrieved from https://www.kitazato-dibimed.com/wp-content/uploads/CRYOTOP_SAFETYKIT_A5_2019_LOW.pdf
- Kodaman, P. H., Arici, A., & Seli, E. (2004). Evidence-based diagnosis and management of tubal factor infertility. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, *16*(3), 221-229. doi:10.1097/00001703-200406000-00004
- Kolibianakis, E., Osmanagaoglu, K., Camus, M., Tournaye, H., Van Steirteghem, A., & Devroey, P. (2002). Effect of repeated assisted reproductive technology cycles on ovarian response. *Fertility and Sterility*, *77*(5), 967-970. doi:10.1016/s0015-0282(02)02975-8
- Kolibianakis, E., Venetis, C., & Tarlatzis, B. (2009). Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: which one is better? *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, *21*(3), 270-274. doi:10.1097/GCO.0b013e3283297dd6
- Kousta, G., Larsen, P., Burke, C., & Madsen, L. B. (2020). Sperm Donation. In G. N. Allahbadia, B. Ata, S. R. Lindheim, B. J. Woodward, & B. Bhagavath (Eds.), *Textbook of Assisted Reproduction* (pp. 465-471). Singapore: Springer Singapore.
- Kovacs, P. (2014). Embryo selection: the role of time-lapse monitoring. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *12*(1), 124. doi:10.1186/1477-7827-12-124
- Krausz, C. (2011). Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Practice and Research in Clinical Endocrinology and Metabolism*, *25*(2), 271-285. doi:10.1016/j.beem.2010.08.006
- Kretser, D. M., Loveland, K. L., Meinhardt, A., Simorangkir, D., & Wreford, N. (1998). Spermatogenesis. *Human Reproduction*, *13*(suppl_1), 1-8. doi:10.1093/humrep/13.suppl_1.1

- Kühnert, B., & Nieschlag, E. (2004). Reproductive functions of the ageing male. *Human Reproduction Update*, 10(4), 327-339. doi:10.1093/humupd/dmh030
- Kuwayama, M. (2008). The human oocyte: vitrification. In C. Howles, D. Gardner, A. Weissman, & Z. Shoham (Eds.), *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Laboratory and Clinical Perspectives* (3 ed., pp. 267-273): Informa Health Care.
- La Marca, A., Giulini, S., Tirelli, A., Bertucci, E., Marsella, T., Xella, S., & Volpe, A. (2006). Anti-Müllerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts ovarian response in assisted reproductive technology. *Human Reproduction*, 22(3), 766-771. doi:10.1093/humrep/del421
- Lambalk, C. B., Banga, F. R., Huirne, J. A., Toftager, M., Pinborg, A., Homburg, R., van der Veen, F., & van Wely, M. (2017). GnRH antagonist versus long agonist protocols in IVF: a systematic review and meta-analysis accounting for patient type. *Human Reproduction Update*, 23(5), 560-579. doi:10.1093/humupd/dmx017
- Lamirande, E., Leclerc, P., & Gagnon, C. (1997). Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Molecular Human Reproduction*, 3(3), 94-175. doi:10.1093/molehr/3.3.175
- Law, Y. J., Zhang, N., Kolibianakis, E. M., Costello, M. F., Keller, E., Chambers, G. M., & Venetis, C. A. (2021). Is there an optimal number of oocytes retrieved at which live birth rates or cumulative live birth rates per aspiration are maximized after ART? A systematic review. *Reproductive BioMedicine Online*, 42(1), 83-104. doi:10.1016/j.rbmo.2020.10.008
- Loutradi, K., Kolibianakis, E., Venetis, C., Papanikolaou, E., Pados, G., Bontis, I., & Tarlatzis, B. (2008). Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 90(1), 186-193. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.06.010
- Luk, J., & Arici, A. (2010). Does the ovarian reserve decrease from repeated ovulation stimulations? *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 22(3), 177-182. doi:10.1097/GCO.0b013e328338c165
- Lutjen, P., Trounson, A., Leeton, J., Findlay, J., Wood, C., & Renou, P. (1984). The establishment and maintenance of pregnancy using in vitro fertilization and embryo donation in a patient with primary ovarian failure. *Nature*, 307(5947), 174-175. doi:10.1038/307174a0

- Maheshwari, A., Hamilton, M., & Bhattacharya, S. (2016). Should we be promoting embryo transfer at blastocyst stage? *Reproductive BioMedicine Online*, 32(2), 142-146. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.09.016>
- Maheux-Lacroix, S., Boutin, A., Moore, L., Bergeron, M. E., Bujold, E., Laberge, P., Lemyre, M., & Dodin, S. (2014). Hysterosalpingosonography for diagnosing tubal occlusion in subfertile women: a systematic review with meta-analysis. *Human Reproduction*, 29(5), 953-963. doi:10.1093/humrep/deu024
- Mains, L., & Van Voorhis, B. J. (2010). Optimizing the technique of embryo transfer. *Fertility and Sterility*, 94(3), 785-790. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.03.030
- Majzoub, A., Agarwal, A., Cho, C., & Esteves, S. (2020). Best Practice Guidelines for Sperm DNA Fragmentation Testing. In S. Parekattil, S. Esteves, & A. Agarwal (Eds.), *Male Infertility: Contemporary Clinical Approaches, Andrology, ART and Antioxidants* (pp. 793-803). Cham: Springer International Publishing.
- Mansour, R. (1998). Intracytoplasmic sperm injection: a state of the art technique. *Human Reproduction Update*, 4(1), 43-56. doi:10.1093/humupd/4.1.43
- Martins, A. D., Agarwal, A., & Henkel, R. (2019). Sperm Cryopreservation. In *In Vitro Fertilization* (pp. 625-642): Springer International Publishing.
- Matorras, R., Mendoza, R., Expósito, A., & Rodriguez-Escudero, F. J. (2004). Influence of the time interval between embryo catheter loading and discharging on the success of IVF. *Human Reproduction*, 19(9), 2027-2030. doi:10.1093/humrep/deh366
- McLaren, J. F. (2012). Infertility evaluation. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*, 39(4), 453-463. doi:10.1016/j.ogc.2012.09.001
- Melnick, A. P., & Rosenwaks, Z. (2018). Oocyte donation: insights gleaned and future challenges. *Fertility and Sterility*, 110(6), 988-993. doi:10.1016/j.fertnstert.2018.09.021
- Menkveld, R., Stander, F. S., Kotze, T. J., Kruger, T. F., & van Zyl, J. A. (1990). The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Human Reproduction*, 5(5), 586-592. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a137150
- Merviel, P., Heraud, M. H., Grenier, N., Lourdel, E., Sanguinet, P., & Copin, H. (2010). Predictive factors for pregnancy after intrauterine insemination (IUI): an analysis of 1038 cycles and a review of the literature. *Fertility and Sterility*, 93(1), 79-88. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.09.058

- Meseguer, M., Herrero, J., Tejera, A., Hilligsøe, K. M., Ramsing, N. B., & Remohí, J. (2011). The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Human Reproduction*, 26(10), 2658-2671. doi:10.1093/humrep/der256
- Meyer, C. G. A. (2020). Conventional IVF. In G. N. Allahbadia, B. Ata, S. R. Lindheim, B. J. Woodward, & B. Bhagavath (Eds.), *Textbook of Assisted Reproduction* (pp. 779-786). Singapore: Springer Singapore.
- Miller, D. C., Hollenbeck, B. K., Smith, G. D., Randolph, J. F., Christman, G. M., Smith, Y. R., Lebovic, D. I., & Ohl, D. A. (2002). Processed total motile sperm count correlates with pregnancy outcome after intrauterine insemination. *Urology*, 60(3), 497-501. doi:10.1016/s0090-4295(02)01773-9
- Moskovtsev, S. I., Jarvi, K., Mullen, J. B., Cadesky, K. I., Hannam, T., & Lo, K. C. (2010). Testicular spermatozoa have statistically significantly lower DNA damage compared with ejaculated spermatozoa in patients with unsuccessful oral antioxidant treatment. *Fertility and Sterility*, 93(4), 1142-1146. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.11.005
- Nagy, Z., Liu, J., Cecile, J., Silber, S., Devroey, P., & Van Steirteghem, A. (1995). Using ejaculated, fresh, and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection**Supported by grants by the Belgian Fund for Medical Research, Brussels, Belgium. *Fertility and Sterility*, 63(4), 808-815. doi:10.1016/S0015-0282(16)57486-X
- Nallella, K., Sharma, R., Aziz, N., & Agarwal, A. (2006). Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertility and Sterility*, 85(3), 629-634. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.08.024
- Natali, I., Muratori, M., Sarli, V., Vannuccini, M., Cipriani, S., Niccoli, L., & Giachini, C. (2013). Scoring human sperm morphology using Testsimplets and Diff-Quik slides. *Fertility and Sterility*, 99(5), 1227-1232.e1222. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.11.047
- Nelson, S. M., & Lawlor, D. A. (2011). Predicting live birth, preterm delivery, and low birth weight in infants born from in vitro fertilisation: a prospective study of 144,018 treatment cycles. *PLoS Medicine*, 8(1), e1000386. doi:10.1371/journal.pmed.1000386
- Neto, F. T., Bach, P. V., Najari, B. B., Li, P. S., & Goldstein, M. (2016). Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 59, 10-26. doi:10.1016/j.semcd.2016.04.009

- Nguyen, R. H., Wilcox, A. J., Skjaerven, R., & Baird, D. D. (2007). Men's body mass index and infertility. *Human Reproduction*, 22(9), 2488-2493. doi:10.1093/humrep/dem139
- Nijs, M., Creemers, E., Cox, A., Janssen, M., Vanheusden, E., Castro-Sanchez, Y., Thijs, H., & Ombelet, W. (2009). Influence of freeze-thawing on hyaluronic acid binding of human spermatozoa. *Reproductive BioMedicine Online*, 19(2), 202-206. doi:10.1016/S1472-6483(10)60073-9
- Noyes, N., Labella, P. A., Grifo, J., & Knopman, J. M. (2010). Oocyte cryopreservation: a feasible fertility preservation option for reproductive age cancer survivors. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 27(8), 495-499. doi:10.1007/s10815-010-9434-3
- Nygren, K. G., & Andersen, A. N. (2001). Assisted reproductive technology in Europe, 1997. Results generated from European registers by ESHRE. European IVF-Monitoring Programme (EIM), for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). *Human Reproduction*, 16(2), 384-391. doi:10.1093/humrep/16.2.384
- O'Connell, M., McClure, N., & Lewis, S. E. M. (2002). The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction*, 17(3), 704-709. doi:10.1093/humrep/17.3.704
- Ohlander, S., Hotaling, J., Kirshenbaum, E., Niederberger, C., & Eisenberg, M. L. (2014). Impact of fresh versus cryopreserved testicular sperm upon intracytoplasmic sperm injection pregnancy outcomes in men with azoospermia due to spermatogenic dysfunction: a meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 101(2), 344-349. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.10.012
- Palermo, G., Neri, Q., Takeuchi, T., Hong, S., & Rosenwaks, Z. (2009). Intracytoplasmic sperm injection: technical aspects. In C. Howles, D. Gardner, A. Weissman, & Z. Shoham (Eds.), *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Laboratory and Clinical Perspectives* (3 ed., pp. 171-180): Informa Health Care.
- Palermo, G. D., Cohen, J., Alikani, M., Adler, A., & Rosenwaks, Z. (1995). Intracytoplasmic sperm injection: a novel treatment for all forms of male factor infertility. *Fertility and Sterility*, 63(6), 1231-1240. doi:10.1016/s0015-0282(16)57603-1
- Paoli, D., Lombardo, F., & Lenzi, A. (2020). *Atlas of Human Semen Examination*. Springer, Cham: Trends in Andrology and Sexual Medicine.
- Papale, L., Fiorentino, A., Montag, M., & Tomasi, G. (2012). The zygote. *Human Reproduction*, 27 Suppl 1, i22-49. doi:10.1093/humrep/des205

- Payne, K. S., Mazur, D. J., Hotaling, J. M., & Pastuszak, A. W. (2019). Cannabis and Male Fertility: A Systematic Review. *Journal of Urology*, 202(4), 674-681. doi:10.1097/ju.0000000000000248
- Pennings, G., de Mouzon, J., Shenfield, F., Ferraretti, A. P., Mardesic, T., Ruiz, A., & Goossens, V. (2014). Socio-demographic and fertility-related characteristics and motivations of oocyte donors in eleven European countries. *Human Reproduction*, 29(5), 1076-1089. doi:10.1093/humrep/deu048
- Plessis, S. S., Agarwal, A., & Syriac, A. (2015). Marijuana, phytocannabinoids, the endocannabinoid system, and male fertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32(11), 1575-1588. doi:10.1007/s10815-015-0553-8
- Polyzos, N. P., Stoop, D., Blockeel, C., Adriaensen, P., Platteau, P., Anckaert, E., Smitz, J., & Devroey, P. (2012). Anti-Müllerian hormone for the assessment of ovarian response in GnRH-antagonist-treated oocyte donors. *Reproductive BioMedicine Online*, 24(5), 532-539. doi:10.1016/j.rbmo.2012.01.024
- Practice Committee of the ASRM. (2018). Smoking and infertility: a committee opinion. *Fertility Sterility*, 110(4), 611-618. doi:10.1016/j.fertnstert.2018.06.016
- Practice Committee of the ASRM, & SART, P. C. o. t. (2014). Repetitive oocyte donation: a committee opinion. *Fertility and Sterility*, 102(4), 964-966. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.06.035>
- Prados, F. J., Debrock, S., Lemmen, J. G., & Agerholm, I. (2012). The cleavage stage embryo. *Human Reproduction*, 27 Suppl 1, i50-71. doi:10.1093/humrep/des224
- Pujol, A., García, D., Obradors, A., Rodríguez, A., & Vassena, R. (2018). Is there a relation between the time to ICSI and the reproductive outcomes? *Human Reproduction*, 33(5), 797-806. doi:10.1093/humrep/dey067
- Ray, A., Shah, A., Gudi, A., & Homburg, R. (2012). Unexplained infertility: an update and review of practice. *Reproductive BioMedicine Online*, 24(6), 591-602. doi:10.1016/j.rbmo.2012.02.021
- Rebar, R. W. (2009). Premature Ovarian Failure. *Obstetrics & Gynecology*, 113(6). doi:10.1097/AOG.0b013e3181a66843
- Reed, M. L., Hamic, A., Thompson, D. J., & Caperton, C. L. (2009). Continuous uninterrupted single medium culture without medium renewal versus sequential media culture: a sibling embryo study. *Fertility and Sterility*, 92(5), 1783-1786. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.05.008
- Reh, A., Fino, E., Krey, L., Berkeley, A., Noyes, N., & Grifo, J. (2010). Optimizing embryo selection with day 5 transfer. *Fertility and Sterility*, 93(2), 609-615. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.02.070

- Ricci, E., Viganò, P., Cipriani, S., Somigliana, E., Chiaffarino, F., Bulfoni, A., & Parazzini, F. (2017). Coffee and caffeine intake and male infertility: a systematic review. *Journal of Nutrition*, 16(1), 37. doi:10.1186/s12937-017-0257-2
- Rienzi, L., Balaban, B., Ebner, T., & Mandelbaum, J. (2012). The oocyte. In *Atlas of Human Embryology: From Oocytes To Preimplantation Embryos* (Vol. 27, pp. i2-i21). Human Reproduction.
- Rienzi, L., Vajta, G., & Ubaldi, F. (2011). Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature. *Human Reproduction Update*, 17(1), 34-45. doi:10.1093/humupd/dmq029
- Riggs, R., Kimble, T., Oehninger, S., Bocca, S., Zhao, Y., Leader, B., & Stadtmauer, L. (2011). Anti-Müllerian hormone serum levels predict response to controlled ovarian hyperstimulation but not embryo quality or pregnancy outcome in oocyte donation. *Fertility and Sterility*, 95(1), 410-412. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.07.1042
- Rittenberg, V., Sobaleva, S., Ahmad, A., Oteng-Ntim, E., Bolton, V., Khalaf, Y., Braude, P., & El-Toukhy, T. (2011). Influence of BMI on risk of miscarriage after single blastocyst transfer. *Human Reproduction*, 26(10), 2642-2650. doi:10.1093/humrep/der254
- Rodriguez-Wallberg, K. A., Waterstone, M., & Anastácio, A. (2019). Ice age: Cryopreservation in assisted reproduction - An update. *Reproductive Biology*, 19(2), 119-126. doi:10.1016/j.repbio.2019.04.002
- Roque, M., Lattes, K., Serra, S., Solà, I., Geber, S., Carreras, R., & Checa, M. A. (2013). Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 99(1), 156-162. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.09.003
- Roux, I., Tulandi, T., Chan, P., & Holzer, H. (2012). Initial investigation of the infertile couple. In D. Gardner, A. Weissman, C. Howles, & Z. Shoham (Eds.), *Textbook of Assisted Reproductive Techniques: Volume 2: Clinical Perspectives* (Vol. 2, pp. 31-40): CRC Press.
- Rubino, P., Viganò, P., Luddi, A., & Piomboni, P. (2015). The ICSI procedure from past to future: a systematic review of the more controversial aspects. *Human Reproduction Update*, 22(2), 194-227. doi:10.1093/humupd/dmv050
- Rubio, I., Kuhlmann, R., Agerholm, I., Kirk, J., Herrero, J., Escribá, M. J., Bellver, J., & Meseguer, M. (2012). Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study. *Fertility and Sterility*, 98(6), 1458-1463. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.07.1135

- Sabatini, L., Zosmer, A., Hennessy, E. M., Tozer, A., & Al-Shawaf, T. (2008). Relevance of basal serum FSH to IVF outcome varies with patient age. *Reproductive BioMedicine Online*, 17(1), 10-19. doi:10.1016/S1472-6483(10)60287-8
- Saiz, I., Gatell, M., Vargas, M., Mendive, A., Enedáguila, N., Solanes, M., Canal, B., López, J., Bonet, A., & Acosta, M. (2018). The Embryology Interest Group: updating ASEBIR's morphological scoring system for early embryos, morulae and blastocysts. *Medicina Reproductiva y Embriología Clínica*, 5(1), 42-54. doi:10.1016/j.medre.2017.11.002
- Sakkas, D., & Alvarez, J. G. (2010). Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility and Sterility*, 93(4), 1027-1036. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.10.046
- Sansone, A., Di Dato, C., de Angelis, C., Menafrà, D., Pozza, C., Pivonello, R., Isidori, A., & Gianfrilli, D. (2018). Smoke, alcohol and drug addiction and male fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1), 3. doi:10.1186/s12958-018-0320-7
- Santos, M. J., Apter, S., Coticchio, G., Debrock, S., Lundin, K., Plancha, C. E., Prados, F., Rienzi, L., Verheyen, G., Woodward, B., & Vermeulen, N. (2016). Revised guidelines for good practice in IVF laboratories (2015). *Human Reproduction*, 31(4). doi:10.1093/humrep/dew016
- Schlegel, P. N., & Katzovitz, M. A. (2020). Male Reproductive Physiology. In C. R. Chapple, W. D. Steers, & C. P. Evans (Eds.), *Urologic Principles and Practice* (pp. 41-62). Cham: Springer International Publishing.
- Sciorio, R., & Esteves, S. (2020). Clinical utility of freeze-all approach in ART treatment: A mini-review. *Cryobiology*, 92, 9-14. doi:10.1016/j.cryobiol.2019.11.041
- Scott, L. (2009). Analysis of fertilization. In C. Howles, D. Gardner, A. Weissman, & Z. Shoham (Eds.), *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Laboratory and Clinical Perspectives* (3 ed., pp. 207-217): Informa Health Care.
- Seeley, R. R., Stephens, T. D., & Tate, P. (2016). Reproduction System. In *Essentials of anatomy and physiology* (9 ed., pp. 529-559): The McGraw-Hills Companies.
- Serna, J., & García-Velasco, J. A. (2005). Effect of repeated assisted reproduction techniques on the ovarian response. *Current opinion in obstetrics & gynecology*, 17(3), 233-236. doi:10.1097/01.gco.0000169098.90966.50
- Sharlip, I., Jarow, J., Belker, A., Lipshultz, L., Sigman, M., Thomas, A., Schlegel, P., Howards, S., Nehra, A., Damewood, M., Overstreet, J., & Sadovsky, R. (2002). Best practice policies for male infertility. *Fertility and Sterility*, 77(5), 873-882. doi:10.1016/S0015-0282(02)03105-9

- Sharma, R., Biedenharn, K. R., Fedor, J. M., & Agarwal, A. (2013). Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 11(1), 66. doi:10.1186/1477-7827-11-66
- Sherwood, L. (2016). The Reproductive System. In *Human physiology : from cells to systems* (9 ed., pp. 715-770): Cengage Learning.
- Shin, D. H., & Turek, P. J. (2013). Sperm retrieval techniques. *Nature Reviews Urology*, 10(12), 723-730. doi:10.1038/nrurol.2013.262
- Silverberg, K., & Turner, T. (2009). Evaluation of sperm. In D. Gardner, A. Weissman, C. Howles, & Z. Showham (Eds.), *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Laboratory and Clinical Perspectives* (3 ed., pp. 39-52): Informa Health Care.
- Soares, S., Troncoso, C., Bosch, E., Serra, V., Simón, C., Remohí, J., & Pellicer, A. (2005). Age and Uterine Receptiveness: Predicting the Outcome of Oocyte Donation Cycles. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(7), 4399-4404. doi:10.1210/jc.2004-2252
- Solé, M., Santaló, J., Boada, M., Clua, E., Rodríguez, I., Martínez, F., Coroleu, B., Barri, P. N., & Veiga, A. (2013). How does vitrification affect oocyte viability in oocyte donation cycles? A prospective study to compare outcomes achieved with fresh versus vitrified sibling oocytes. *Human Reproduction*, 28(8), 2087-2092. doi:10.1093/humrep/det242
- Stanford, J. B., White, G. L., & Hatasaka, H. (2002). Timing intercourse to achieve pregnancy: Current evidence. *Obstetrics & Gynecology*, 100(6), 1333-1341. doi:10.1016/S0029-7844(02)02382-7
- Stoop, D., Nekkebroeck, J., & Devroey, P. (2011). A survey on the intentions and attitudes towards oocyte cryopreservation for non-medical reasons among women of reproductive age. *Human Reproduction*, 26(3), 655-661. doi:10.1093/humrep/deq367
- Stormlund, S., Sopa, N., Zedeler, A., Bogstad, J., Prætorius, L., Nielsen, H. S., Kitlinski, M. L., Skouby, S. O., Mikkelsen, A. L., Spangmose, A. L., Jeppesen, J. V., Khatibi, A., la Cour Freiesleben, N., Ziebe, S., Polyzos, N. P., Bergh, C., Humaidan, P., Andersen, A. N., Løssl, K., & Pinborg, A. (2020). Freeze-all versus fresh blastocyst transfer strategy during in vitro fertilisation in women with regular menstrual cycles: multicentre randomised controlled trial. *BMJ (Clinical research ed.)*, 370. doi:10.1136/bmj.m2519
- Strassburger, D., Goldstein, A., Friedler, S., Raziel, A., Kasterstein, E., Mashevich, M., Schachter, M., Ron-El, R., & Reish, O. (2010). The cytogenetic constitution of embryos derived from immature (metaphase I) oocytes obtained after ovarian

- hyperstimulation. *Fertility and Sterility*, 94(3), 971-978. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.04.035
- Strauss, J. F., & Williams, C. J. (2014). The Ovarian Life Cycle In J. F. Strauss & R. L. Barbieri (Eds.), *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology* (7 ed., pp. 157-191.e158). Philadelphia: W.B. Saunders.
- Štšepetova, J., Baranova, J., Simm, J., Parm, Ü., Rööp, T., Sokmann, S., Korrovits, P., Jaagura, M., Rosenstein, K., Salumets, A., & Mändar, R. (2020). The complex microbiome from native semen to embryo culture environment in human in vitro fertilization procedure. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 18(1), 3-3. doi:10.1186/s12958-019-0562-z
- Sun, H., Gong, T. T., Jiang, Y. T., Zhang, S., Zhao, Y. H., & Wu, Q. J. (2019). Global, regional, and national prevalence and disability-adjusted life-years for infertility in 195 countries and territories, 1990-2017: results from a global burden of disease study, 2017. *Aging (Albany NY)*, 11(23), 10952-10991. doi:10.18632/aging.102497
- Talmor, A., & Dunphy, B. (2015). Female obesity and infertility. *Best Practice and Research in Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 29(4), 498-506. doi:10.1016/j.bpobgyn.2014.10.014
- Taylor, H. S., Pal, L., & Seli, E. (2019). Conception - Sperm and Egg Transport, Fertilization, Implantation and Early Embryogenesis. In M. A. Fritz & L. Speroff (Eds.), *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility* (9 ed., pp. 174-195): Lippincott Williams & Wilkins.
- The ESHRE Capri Workshop Group. (2008). Genetic aspects of female reproduction. *Human Reproduction Update*, 14(4), 293-307. doi:10.1093/humupd/dmn009
- Tournaye, H., & Donoso, P. (2008). Sperm-recovery techniques: clinical aspects. In C. Howles, D. Gardner, A. Weissman, & Z. Shoham (Eds.), *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Laboratory and Clinical Perspectives* (3 ed., pp. 657-672): Informa Health Care.
- Trokoudes, K. M., Pavlides, C., & Zhang, X. (2011). Comparison outcome of fresh and vitrified donor oocytes in an egg-sharing donation program. *Fertility and Sterility*, 95(6), 1996-2000. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.02.035
- Trounson, A., & Mohr, L. (1983). Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature*, 305(5936), 707-709. doi:10.1038/305707a0

- Unuane, D., Tournaye, H., Velkeniers, B., & Poppe, K. (2011). Endocrine disorders & female infertility. *Best Practice and Research in Clinical Endocrinology and Metabolism*, 25(6), 861-873. doi:10.1016/j.beem.2011.08.001
- Vajta, G., & Kuwayama, M. (2006). Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, 65(1), 236-244. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.09.026
- Valojerdi, M., Eftekhari-Yazdi, P., Karimian, L., Hassani, F., & Movaghar, B. (2009). Vitrification versus slow freezing gives excellent survival, post warming embryo morphology and pregnancy outcomes for human cleaved embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 26(6), 347-354. doi:10.1007/s10815-009-9318-6
- Valojerdi, M. R., Eftekhari-Yazdi, P., Karimian, L., & Ashtiani, S. K. (2008). Effect of laser zona pellucida opening on clinical outcome of assisted reproduction technology in patients with advanced female age, recurrent implantation failure, or frozen-thawed embryos. *Fertility and Sterility*, 90(1), 84-91. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.06.005
- van Loendersloot, L., van Wely, M., Limpens, J., Bossuyt, P., Repping, S., & van der Veen, F. (2010). Predictive factors in in vitro fertilization (IVF): a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 16(6), 577-589. doi:10.1093/humupd/dmq015
- Van Montfoort, A. P., Dumoulin, J. C., Kester, A. D., & Evers, J. L. (2004). Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. *Hum Reprod*, 19(9), 2103-2108. doi:10.1093/humrep/deh385
- Vaughan, D. A., Leung, A., Resetkova, N., Ruthazer, R., Penzias, A. S., Sakkas, D., & Alper, M. M. (2017). How many oocytes are optimal to achieve multiple live births with one stimulation cycle? The one-and-done approach. *Fertility and Sterility*, 107(2), 397-404.e393. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.10.037
- Vernaev, V., Tournaye, H., Osmanagaoglu, K., Verheyen, G., Van Steirteghem, A., & Devroey, P. (2003). Intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa is less successful in men with nonobstructive azoospermia than in men with obstructive azoospermia. *Fertility and Sterility*, 79(3), 529-533. doi:10.1016/s0015-0282(02)04809-4
- Visser, J. A., de Jong, F. H., Laven, J. S., & Themmen, A. P. (2006). Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction*, 131(1), 1-9. doi:10.1530/rep.1.00529

- Volpes, A., Sammartano, F., Rizzari, S., Gullo, S., Marino, A., & Allegra, A. (2016). The pellet swim-up is the best technique for sperm preparation during in vitro fertilization procedures. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 33(6), 765-770. doi:10.1007/s10815-016-0696-2
- Wale, P. L., & Gardner, D. K. (2016). The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction. *Human Reproduction Update*, 22(1), 2-22. doi:10.1093/humupd/dmv034
- Wittemer, C., Ohl, J., Bailly, M., Bettahar-Lebugle, K., & Nisand, I. (2000). Does body mass index of infertile women have an impact on IVF procedure and outcome? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 17(10), 547-552. doi:10.1023/a:1026477628723
- World Health Organization. (2010). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. In (5th ed ed.). Geneva: World Health Organization.
- Wyns, C., Bergh, C., Calhaz-Jorge, C., De Geyter, C., Kupka, M. S., Motrenko, T., Rugescu, I., Smeenk, J., Tandler-Schneider, A., Vidakovic, S., & Goossens, V. (2020). ART in Europe, 2016: results generated from European registries by ESHRE. *Human Reproduction Open*, 2020(3). doi:10.1093/hropen/hoaa032
- Yanagida, K., Katayose, H., Hirata, S., Yazawa, H., Hayashi, S., & Sato, A. (2001). Influence of sperm immobilization on onset of Ca²⁺ oscillations after ICSI. *Human Reproduction*, 16(1), 148-152. doi:10.1093/humrep/16.1.148
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., Dyer, S., Racowsky, C., de Mouzon, J., Sokol, R., Rienzi, L., Sunde, A., Schmidt, L., Cooke, I. D., Simpson, J. L., & van der Poel, S. (2017). The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertility and Sterility*, 108(3), 393-406. doi:10.1016/j.fertnstert.2017.06.005
- Zeilmaker, G. H., Alberda, A. T., van Gent, I., Rijkmans, C. M., & Drogendijk, A. C. (1984). Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertility and Sterility*, 42(2), 293-296. doi:10.1016/s0015-0282(16)48029-5
- Zorrilla, M., & Yatsenko, A. N. (2013). The Genetics of Infertility: Current Status of the Field. *Current Genetic Medicine Reports*, 1(4), 247-260. doi:10.1007/s40142-013-0027-1