

# REPRODUÇÃO ASSISTIDA/ INDICAÇÕES E TRATAMENTOS

*Artur Dzik*

*Dirceu Henrique Mendes Pereira*

*Gilberto Costa Freitas*

*Mario Cavagna*

*Waldemar Naves do Amaral*

## CONCEITOS GERAIS

O estabelecimento de uma família é considerado como um direito humano fundamental. Apesar dos esforços internacionais para a prevenção e o seu tratamento apropriado, a infertilidade está se tornando cada vez mais comum no mundo desenvolvido. O declínio da saúde geral da população poderia, pelo menos em parte, ajudar a explicar o aumento da infertilidade, tais como o aumento na prevalência de obesidade, associada à anovulação e à síndrome dos ovários policísticos, e a crescente incidência de doença sexualmente transmissível, que afeta os órgãos reprodutivos (ex.: clamídia). Além disso, postergar a maternidade é algo que está aumentando e se tornando muito comum nas sociedades desenvolvidas. Cada vez mais, as pessoas estão retardando o início de uma família. Consequentemente, esta demora em ter filhos resulta em um envelhecimento ovariano, associado à infertilidade. Recentemente, o Parlamento da União Europeia reconheceu que a infertilidade é uma das causas do declínio demográfico em toda a Europa. Juntas, essas considerações médicas e sociais indicam que o número de casos de infertilidade está crescendo, resultando em um aumento progressivo na necessidade do uso das tecnologias de reprodução assistida (TRA).

O Comitê Internacional de Monitoramento das Tecnologias de Reprodução Assistida define a infertilidade como

a falha em engravidar após pelo menos um ano de relações desprotegidas e de reprodução assistida (RA), assim como após tratamento ou procedimento que inclua a manipulação *in vitro* de oócito humano, espermatozoides ou embriões, com o propósito de estabelecer uma gravidez. Esta definição, sob a perspectiva dos pacientes, fornece uma solução médica para pessoas com infertilidade, permitindo-lhes a chance de iniciar sua própria família.

A RA possui implicações para a sociedade como um todo, pois a definição clínica da infertilidade não leva em conta a “infertilidade social” encontrada em um número crescente de pessoas que, em razão de seu estilo de vida ou carreira, irão procurar a RA para engravidar quando sua fertilidade natural diminuir.

Há quem considere o controle do processo ovulatório para determinar o momento ideal do coito, procedimento conhecido como coito programado, como uma técnica de fertilização assistida de baixa complexidade; preferimos, porém, não incluir tal modalidade terapêutica dentro das técnicas de fertilização assistida, considerando-a um tratamento convencional da infertilidade conjugal. A reprodução assistida pode ser de baixa complexidade, quando a fecundação ocorre no aparelho reprodutivo feminino, ou de alta complexidade, quando a fecundação ocorre no laboratório e os embriões resultantes são colocados no útero materno.

Entre as técnicas de baixa complexidade, destacam-se a inseminação intrauterina e a inseminação intraperitoneal. Já entre as de alta complexidade, está a fertilização *in vitro* (FIV), com suas técnicas de inseminação, convencional ou por meio de injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI).

## INSEMINAÇÃO INTRAUTERINA

A inseminação intrauterina (IIU) é definida como a deposição intrauterina de espermatozoides processados em laboratório. Suas etapas compreendem a estimulação farmacológica do desenvolvimento folicular, visando à obtenção de dois ou três folículos; o processamento seminal, realizado no dia da inseminação; e a inseminação propriamente dita, por meio da qual os espermatozoides, em meio de cultura, são introduzidos diretamente na cavidade uterina por um cateter apropriado. Na inseminação intraperitoneal, uma variação da IIU, os espermatozoides são introduzidos diretamente na cavidade peritoneal, por meio de punção do fundo de saco de Douglas. As indicações para ambos os procedimentos são equiparáveis, sendo a técnica intrauterina a mais usada.

### Indicações

Fator cervical, infertilidade de causa inexplicada, endometriose mínima e leve e fator masculino leve. Outras indicações são a incapacidade de se manterem relações sexuais e a utilização de sêmen de doador (inclusive em mulheres homossexuais). A condição essencial para que a IIU seja indicada é que haja pelo menos uma tuba pèrvia e funcional. Além disso, a concentração de espermatozoides menor que cinco milhões torna o procedimento pouco eficaz.

### Técnicas e resultados

Embora a IIU possa ser realizada em ciclo natural, a estimulação ovariana aumenta a eficácia do método. Os esquemas dessa estimulação são muito variáveis. As principais drogas indutoras da ovulação são o citrato de clomifeno e as gonadotrofinas (FSH, LH, hMG), que podem ser de origem urinária (urina da mulher na pós-menopausa) ou recombinante. Na IIU, a estimulação ovariana é feita de modo suave, para que se evite o desenvolvimento de um número excessivo de folículos. A estimulação é sempre monitorizada por ultrassom, que permite acompanhar o desenvolvimento folicular e a determinação do número de folículos pré-ovulatórios. Quando se detecta um núme-

ro de folículos superior a quatro, o ciclo deve ser cancelado ou a paciente deve ser encaminhada a uma técnica de alta complexidade, pois os riscos de gravidez múltipla, trigêmeos, quadrigêmeos ou mais são inadmissíveis. Na presença de folículos pré-ovulatórios, a rotura folicular é desencadeada pela administração da gonadotrofina coriônica humana (hCG), e a inseminação é realizada cerca de 36 horas depois. A inseminação propriamente dita é um procedimento simples, realizado com a paciente em posição ginecológica: após a inserção do espêculo e da limpeza vaginal e do colo uterino com soro fisiológico, introduz-se o cateter de inseminação pelo canal cervical e injeta-se 0,5 ml de meio de cultura com os espermatozoides após seu processamento e capacitação no laboratório. As taxas de gravidez obtidas com a IIU são muito variáveis e dependem de inúmeros fatores. Na literatura, encontram-se referências que variam de 8% a 35%. Normalmente, as taxas de sucesso giram em torno de 12% a 15% por tentativa. Em mulheres jovens, abaixo de 35 anos, as taxas podem atingir 20%. Recomenda-se que o número de tentativas de IIU seja de, no máximo, três; não ocorrendo a gravidez, técnicas mais complexas devem ser consideradas.

## FERTILIZAÇÃO IN VITRO E A TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (FIV)

A grande revolução no tratamento da infertilidade conjugal ocorreu com a publicação, em 1978, do primeiro nascimento após a fecundação extracorpórea e a transferência de embrião para a cavidade uterina de uma paciente com salpingectomia bilateral. Atualmente, as indicações para FIV são bem mais amplas, incluindo a endometriose, a infertilidade de causa inexplicada, o fator masculino, o fator imunológico e a falha nos tratamentos de baixa complexidade. Nos casos de falência ovariana, os programas de doação de oócitos/embriões, cessão temporária de útero, utilização de oócitos ou embriões congelados para futuras transferências e congelamento de oócitos ou embriões antes de terapia oncológica também são técnicas associadas à FIV. As etapas envolvidas na FIV compreendem a estimulação ovariana, a aspiração folicular para coleta de oócitos, a fecundação em laboratório e a transferência dos embriões.

### Estimulação ovariana

É o primeiro passo. A estimulação farmacológica dos ovários tem papel fundamental, tanto em pacientes com dis-

túrbios ovulatórios como na indução do desenvolvimento folicular múltiplo para procedimentos de reprodução assistida, embora o procedimento possa ser feito com o ciclo natural. As gonadotrofinas representam a principal modalidade terapêutica na estimulação ovariana para reprodução assistida. Dos preparados urinários, destacam-se o hMG, preparação com proporções iguais (75/75 UI/ ampola) de FSH/LH, o FSH purificado com menos de 1,0 UI LH/75 UI FSH e o FSH altamente purificado, com menos de 0,1 UI. LH/1000 UI FSH. Entre as gonadotrofinas recombinantes, destacam-se o FSH recombinante, com atividade exclusiva do FSH, e o LH recombinante, com atividade exclusiva do LH. É importante salientar que o desenvolvimento folicular múltiplo pode resultar em elevação precoce dos níveis de estradiol e liberação extemporânea do LH, provocando luteinização prematura. Para que tal efeito indesejável seja evitado, o uso dos análogos agonistas e antagonistas do GnRH está indicado para o bloqueio hipofisário. O esquema mais comum de estimulação ovariana para FIV é o bloqueio com análogo agonista do GnRH na fase lútea, sob a forma de depósito, administração diária por via subcutânea ou nebulização intranasal, entre o 18º e o 22º dia do ciclo menstrual. O início do estímulo é realizado de 15 a 20 dias após o bloqueio, empregando-se de 150 UI a 300 UI de FSH recombinante ou de hMG urinário altamente purificado. A primeira ecografia para monitorização do ciclo é feita no sétimo dia de estímulo com gonadotrofinas. A partir de então, monitora-se de acordo com o desenvolvimento folicular, até o desencadeamento da maturação folicular final, que é feito com a administração de hCG, na dose de 5 mil UI a 10 mil UI do produto urinário ou 250 µcg do produto recombinante. O hCG é administrado na presença de pelo menos três folículos com diâmetro médio maior ou igual a 17 mm. Outra maneira de se fazer a supressão hipofisária é empregando os análogos antagonistas do GnRH, que provocam supressão imediata da liberação de gonadotrofinas, sem o efeito de liberação aguda inicial, conhecido por *flare-up*. Normalmente, inicia-se a estimulação com gonadotrofinas no segundo ou no terceiro dia do ciclo, associando-se o antagonista no sexto dia de estimulação ou quando houver folículos de 13 mm a 14 mm de diâmetro. A suplementação da fase lútea é etapa obrigatória nos ciclos de reprodução assistida de alta complexidade; embora haja controvérsias sobre se os estrogênios devam ser utilizados, a suplementação com progesterona é fundamental. Atualmente, prefere-se o

emprego da progesterona natural micronizada, em cápsulas de 200 mg, ou do gel de progesterona a 8%, ambos administrados por via intravaginal.

## Aspiração folicular

A aspiração folicular é o procedimento que visa à coleta de oócitos para a fecundação *in vitro* e é realizada de 34 a 36 horas após o desencadeamento da maturação folicular final pela administração de hCG. Realiza-se a aspiração folicular em regime de hospital dia, em sala cirúrgica, na maioria dos serviços, contígua ao laboratório de manipulação de gametas. O procedimento é feito sob sedação, com o emprego de ultrassonografia transvaginal. Acopla-se um guia ao transdutor, por onde se insere a agulha de punção. São puncionados todos os folículos com diâmetro maior que 10 mm, e o líquido folicular obtido é encaminhado ao laboratório, para identificação e classificação dos oócitos.

## Fecundação em laboratório

Depois do processamento, os espermatozoides móveis e direcionais são colocados em contato com os óvulos, em uma placa apropriada com meio de cultura, que é então levada à incubadora a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Na FIV convencional, coloca-se cerca de 100 mil espermatozoides para cada óvulo. Após 18 a 20 horas, observa-se se ocorreu a fertilização, determinada pela presença de dois pronúcleos. Os embriões fertilizados continuam seu desenvolvimento na incubadora, por dois a três dias, sendo então transferidos para o útero. Pode-se, também, proceder à cultura prolongada, por meio da qual os embriões são transferidos no quinto dia após a aspiração folicular, já na fase de blastocisto.

## Transferência de embriões

A transferência de embriões (TE) para o útero, realizada por via transcervical, é a etapa final da fertilização *in vitro*. É realizada, normalmente, de 48 a 72 horas após a inseminação dos oócitos, com a paciente em posição ginecológica, podendo ser utilizada a visualização ultrassonográfica abdominal para acompanhar o procedimento. Em relação aos resultados, quantificando os vários fatores que interferem nas taxas de sucesso do tratamento, calcula-se que a idade da mulher e a qualidade oocitária participem em mais de 40%. A qualidade do laboratório, a experiência dos médicos, a escolha dos meios de cultura e o controle adequado das condições de toxicidade ambiental participam em outros 40%. Os 20% restantes são decididos no momento da TE.

## INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES (ICSI)

Este método consiste na injeção de um único espermatozoide diretamente no interior do óvulo, com a utilização de um micromanipulador. Com essa técnica, a fertilização é “forçada” no laboratório, de modo que ela se torna possível mesmo nos casos de fator masculino grave, pois é necessário um único espermatozoide para fecundar o óvulo. Com o advento da ICSI, as indicações de procedimentos com sêmen de doador tornaram-se bem mais raras, pois se consegue a fecundação mesmo na vigência de fator masculino grave. Portanto, as principais indicações da ICSI são o fator masculino grave e as falhas de fertilização anteriores. Uma das grandes vantagens da ICSI é que a técnica pode ser empregada nos casos de azoospermia obstrutiva, como ocorre na vasectomia. Além disso, a ICSI pode ser indicada nos casos de ausência congênita dos canais deferentes e de azoospermia após correção de hérnia bilateral. Nesses casos, são empregadas técnicas que permitem a obtenção de espermatozoides por meio da aspiração do epidídimo ou do testículo.

## CONGELAMENTO DE EMBRIÕES

O congelamento de embriões é utilizado quando há embriões excedentes nos ciclos de FIV, nos casos de cancelamento da transferência por risco da síndrome da hiperestimulação ovariana e antes de tratamento químico ou radioterápico em pacientes jovens com desejo de preservação da fertilidade. É possível desde o estágio de zigoto pronucleado até o estágio de blastocisto. Um aspecto controverso é a utilização de embriões congelados para pesquisa, em particular para a obtenção de células-tronco embrionárias. No Brasil, a lei 11.015, de 24 de março de 2005, prevê a utilização de embriões congelados para essa finalidade, desde que sejam inviáveis ou estejam congelados há três anos ou mais.

## PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE

O diagnóstico precoce de neoplasias malignas, associado a tratamentos cirúrgico, quimioterápico e radioterápico cada vez mais eficientes, promovem a remissão do câncer em um número significativo de pacientes, muitos em idade reprodutiva. É, portanto, fundamental que os aspectos relacionados à fertilidade sejam discutidos com todos os pacientes em idade reprodutiva que serão submetidos à te-

rapia oncológica e com seus pais ou responsáveis, quando se tratar de crianças. Recentemente, o Comitê de Ética da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva deliberou o seguinte: 1. os médicos devem informar aos pacientes com câncer as opções para a preservação da fertilidade antes do tratamento; 2. os únicos métodos com técnicas bem estabelecidas para a preservação da fertilidade são a criopreservação de espermatozoides para o homem e a criopreservação de embriões para as mulheres; 3. técnicas como a criopreservação de oócitos e tecido ovariano ainda devem ser consideradas experimentais; 4. preocupações relativas ao bem-estar da prole não devem constituir motivo para negar ao paciente com câncer assistência quanto à reprodução; 5. o diagnóstico genético pré-implantacional para evitar o nascimento de crianças com alto risco de câncer hereditário é eticamente aceitável.

## Técnicas de preservação da fertilidade

No caso dos homens, a criopreservação de espermatozoides é uma técnica bem estabelecida, e adolescentes de 12 anos de idade já podem apresentar maturidade física e emocional para entender o problema e fornecer amostras de sêmen. Por outro lado, a criopreservação de tecido testicular e espermatogônias são técnicas ainda completamente experimentais, e a supressão testicular com análogos do GnRH não se mostrou eficiente na proteção da função gonadal. Os aspectos éticos e emocionais que interferem na coleta de sêmen de adolescentes não devem ser negligenciados, e a participação dos pais é de fundamental importância nas decisões a serem tomadas. Tratando-se de homens adultos, não há dúvidas de que a opção de coleta e criopreservação de sêmen deve ser discutida e oferecida a todos os pacientes que serão submetidos a tratamento oncológico. No sexo feminino, as possibilidades são mais complexas. As principais alternativas consistem na criopreservação de embriões, oócitos e tecido ovariano e, em caso de radioterapia pélvica, transposição cirúrgica ovariana é recomendada. Devem ser considerados, ainda, a opção de supressão da função ovariana com análogos do GnRH, concomitantemente à quimioterapia, e o emprego de cirurgias conservadoras para certos tipos de câncer que acometem o aparelho reprodutor feminino. Nos últimos quatro anos, o congelamento de oócitos tem sido a melhor opção do ponto de vista ético e de resultados para a preservação de fertilidade social em mulheres abaixo dos 35 anos e em todas as idades com indicação oncológica.

## DIAGNÓSTICO GENÉTICO PRÉ-IMPLANTACIONAL (PGD)

O PGD consiste na análise cromossômica de células embrionárias antes da transferência do embrião para o útero. A retirada de células para biópsia é feita no terceiro dia do desenvolvimento *in vitro*, quando os embriões têm entre seis e oito células (blastômeros). São retirados um ou dois blastômeros, o que não acarreta danos ao embrião. Os blastômeros são extraídos pelo método de aspiração depois de realizado um orifício na zona pelúcida com a solução ácida de Tyrode. O PGD é indicado para a detecção das aneuploidias e das doenças monogênicas, quando houver risco para tais situações. O PGD pode ser realizado por meio das técnicas de hibridização fluorescente *in situ* (Fish) e da reação em cadeia da polimerase (PCR). A técnica de Fish é empregada para a avaliação de alterações cromossômicas, enquanto a PCR identifica as alterações monogênicas.

Mais recentemente, têm sido desenvolvidas técnicas que permitem estudo genético mais completo da célula embrionária. A finalização do projeto genoma humano, que permitiu o completo conhecimento da sequência do DNA humano, tem mudado o conhecimento de maneira muito rápida, principalmente na forma de diagnosticar e finalmente tratar muitas doenças humanas. Essas novas técnicas, denominadas “ômicas”, se referem à análise de um conjunto de entidades biológicas submetidas a um determinado estudo. Assim, genômica estudaria um conjunto de genes e a sequência de DNA de uma determinada espécie.

Acredita-se que as alterações genéticas constituem uma importante causa de infertilidade e são responsáveis pelos defeitos congênitos que se observam nos abortamentos espontâneos e em recém-nascidos. As alterações cromossômicas são responsáveis por 2,5% dos casos de mortalidade infantil e são encontradas em mais de 50% dos abortamentos espontâneos de primeiro trimestre. Os estudos cromossômicos clássicos realizados em material de aborto mostram uma incidência de anomalias cromossômicas que oscilam de 50% a 70% e, mais recentemente, em análise das vilosidades coriárias, foi observada uma incidência ainda maior, por volta de 83%.

A questão colocada é que as técnicas para análise genética descritas para o diagnóstico pré-implantacional, o PCR e o Fish, por estudarem apenas parte das células, carecem da eficácia necessária para descartar 100% das en-

fermidades cromossômicas, especialmente aquelas que são consequentes de pequenas deleções ou duplicações.

Nesse sentido, as técnicas de microvarredura, como a hibridização genômica comparativa (CGH), a análise do polimorfismo de único nucleotídeo (SNP) e a análise do DNA complementar (DNAc) estudam a citogenética da célula e permitem conhecer a carga de DNA em todo o genoma celular. A técnica de CGH baseia-se na hibridização do DNA com problema, marcado com sondas fluorescentes, e em sua comparação com uma situação normal sem deleções ou duplicações. Com este desenvolvimento, conseguimos realizar o cariótipo molecular, que permite a detecção de mudanças no número de cópias em nível submicroscópico do genoma celular completo, além de potencializar as técnicas já existentes.

Comparado ao cariótipo convencional, a CGH tem uma resolução muito maior. Além disso, as técnicas de CGH vão muito além do diagnóstico das doenças, por exemplo, as técnicas de Fish são empregadas em procedimentos como FIV/ICSI, principalmente nos casos especiais, como nas falhas de implantação. Assim, no ciclo subsequente, realiza-se a biópsia dos embriões e estudam-se os cromossomos. Nesses casos, em cerca de 70% dos embriões são encontradas anormalidades, contra 30% na população normal. A CGH proporciona uma melhora nesta resolução e a complementação da técnica anterior.

A aneuploidia é uma das principais causas de falha em tratamentos de fertilização *in vitro* e sua frequência aumenta principalmente em função da idade materna. Com o aprimoramento na técnica de biópsia do blastocisto, associado à CGH, é possível identificar alterações numéricas em 24 cromossomos, diminuindo em muito o risco de erro. Grande número de embriões considerados de boa qualidade pode apresentar alterações no número dos cromossomos. A biópsia, que na técnica de Fish é realizada no terceiro dia, na CGH é realizada já na fase de blastocisto, utilizando tecido do trofoderma embrionário.

O exame de CGH não é capaz de detectar triploidias, tetraploidias, alterações cromossômicas equilibradas – como translocações recíprocas –, inversões ou inserções; também não identifica alterações do DNA mitocondrial nem mutações de ponto. Alterações cromossômicas em mosaico com frequência inferior a 30% podem não ser identificadas. As vantagens do uso desta técnica, entretanto, são: a. múltiplas células são analisadas, aumentando a eficiência no diagnóstico; b. a biópsia é realizada nas células que irão formar a placenta e não o feto; c. a análise



cromossômica é completa (23 pares + cromossomos sexuais - X e Y); d. aumenta a taxa de implantação e diminui a incidência de gestação múltipla.

Nesse sentido, suas principais indicações são: a. mulheres com mais de 35 anos; b. mulheres com histórico de abortos repetidos; c. história de anomalias cromossômicas na família; e d. casais que tiveram várias tentativas de FIV sem sucesso. Sua vantagem é a seleção natural no desenvolvimento dos embriões até o estágio de blastocisto, implicando uma diminuição do número de embriões a serem examinados. Quanto aos riscos envolvidos, se, por um lado, a seleção natural até o estágio de blastocisto pode representar uma vantagem, o casal deve estar ciente de que esta redução pode ser tão grande a ponto de não haver embriões para serem transferidos. Outra possibilidade é ter blastocistos, a biópsia ser realizada e revelar que todos os embriões são alterados. Nestas duas situações, infelizmente, não haverá transferência. É importante que os pacientes saibam que este fato, provavelmente, está apenas antecipando um resultado negativo de gravidez. Sabemos que a frustração é sempre muito grande diante dessas notícias, entretanto, o casal deve estar preparado para essas possibilidades.

## SITUAÇÕES ESPECIAIS EM REPRODUÇÃO ASSISTIDA

### Doação de oócitos

A doação de oócitos está indicada nos casos de falência ovariana prematura, más respondedoras à estimulação ovariana, níveis de FSH superiores a 15 UI/ml e idade avançada da mulher. Toda mulher com idade igual ou superior a 40 anos, que necessite de TRA, é uma candidata a ser receptora de óvulos doados. Para ser doadora de óvulos, a mulher precisa preencher alguns requisitos básicos. Segundo a Sociedade Americana de Reprodução Assistida, a idade deverá estar compreendida entre 21 e 34 anos, a paciente deve possuir um bom estado psicofísico, histórico negativo para doença de transmissão genética, testes negativos para HIV, sífilis, hepatite B e C e cultura cervical negativa para *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis*. Nos Estados Unidos, a doação de gametas pode ter caráter comercial, de modo que a mulher que necessite de ovodoação pode escolher a doadora e remunerá-la pelo procedimento. No Brasil, o Conselho Federal de Medicina, em resolução de 1992, determina que a doação de oócitos não pode ter caráter lucrativo e deve ser preservado o anonimato da doadora, o que dificulta a obtenção de doadoras.

### Cessão temporária de útero

A cessão temporária de útero, ou gestação de substituição, está indicada nos casos em que uma mulher jovem, com função ovariana normal, é histerectomizada ou não tem útero em condições de promover o desenvolvimento fetal. O Conselho Federal de Medicina recomenda que a doadora do útero pertença à família da mãe genética. O Conselho Regional de Medicina do Estado de São Paulo, por meio do parecer nº 43.765/01, não exige o parentesco e faz as seguintes recomendações: 1. é proibido o uso do “útero de aluguel” com qualquer forma de remuneração ou compensação financeira da mãe gestacional; 2. é necessária a obtenção de consentimento esclarecido da mãe que doará temporariamente o útero, lembrando-lhe dos aspectos biopsicossociais envolvidos no ciclo gravídico-puerperal e dos riscos inerentes à maternidade; 3. neste termo, deve ser mencionada a impossibilidade de interrupção da gravidez após o início do processo gestacional, mesmo que diante de uma anomalia genética, salvo raras exceções autorizadas judicialmente; 4. até o puerpério, ficam garantidos à mãe que doará temporariamente o útero tratamento e acompanhamento médico e, se necessário, de equipes multidisciplinares, bem como o registro da criança pelos pais genéticos; 5. esta documentação deve ser providenciada durante a gravidez, além de “contrato” entre as partes estabelecendo claramente a situação. Os documentos devem ser assinados pelas partes envolvidas, isto é, o casal e a doadora temporária do útero, e encaminhados ao CRM local.

### COMPLICAÇÕES DAS TRA

As complicações mais comuns relacionadas às TRA são representadas pela gravidez múltipla e pela síndrome da hiperestimulação ovariana. A gravidez múltipla, pela sua incidência e potencial de morbiletalidade perinatal, deve ser considerada a principal complicação das TRAs. Sua prevenção reside, basicamente, na redução do número de embriões transferidos; em alguns países, em particular os escandinavos, a transferência de embrião único é fortemente estimulada, e mesmo prevista por lei. No Brasil, a resolução do Conselho Federal de Medicina, de 1992, permite a transferência de até quatro embriões; entretanto, em nosso meio, há uma tendência generalizada de transferir, no máximo, dois embriões, e a transferência de mais de três embriões é, atualmente, situação de exceção. Na estimulação ovariana para relação sexual programada, ou para TRA de baixa complexidade, deve-se suspender o tratamento quando houver mais de três folículos com

diâmetro máximo de 16 mm. A alternativa para o cancelamento é a transformação desses ciclos em TRA de alta complexidade, quando se pode determinar o número de embriões a serem transferidos. A síndrome da hiperestimulação ovariana (OHSS) é uma complicação provocada pela estimulação farmacológica dos ovários. Os sintomas aparecem tipicamente alguns dias após a administração do hCG para a maturação folicular final. As formas leves da OHSS são relativamente frequentes, enquanto a grave acomete cerca de 1% das pacientes submetidas à estimulação ovariana. Os principais fatores de risco para a OHSS são: 1. mulheres jovens (com menos de 35 anos de idade); 2. níveis séricos de estradiol acima de 5 mil pg/ml; 3. grande número de folículos durante a estimulação ovariana (mais de 15 folículos em cada ovário); e 4. síndrome dos ovários policísticos. A fisiopatologia da OHSS ainda é pouco clara; o acentuado aumento da permeabilidade capilar, com perda de líquido para o terceiro espaço, é componente fundamental da síndrome. Os sintomas variam de distensão

abdominal e desconforto, observados nas formas leves, até ascite, hipovolemia, hidrotórax, hemoconcentração, distúrbios de coagulação e insuficiência renal, nas formas graves. A prevenção da OHSS fundamenta-se principalmente no cancelamento dos ciclos de risco, evitando-se a administração do hCG. Pode-se, também, congelar os embriões e transferi-los em outro ciclo, evitando-se a piora que seria determinada pela ocorrência da gravidez. O tratamento das formas leves e moderadas é ambulatorial e requer, basicamente, repouso e tratamento sintomático. Nas formas graves, a internação é impositiva, com a administração de albumina humana, heparina e a realização de paracentese. Embora pouco frequentes, deve-se também considerar a possibilidade de complicações anestésicas, infecciosas e hemorrágicas, consequentes à aspiração folicular.

## REFERÊNCIA

1. Tratado de Reprodução Assistida da Sociedade Brasileira de Reprodução Humana (SBRH). 2 ed. ampl. e atualiz. Dzik A, Pereira DHM, Cavagna M, do Amaral WN. 2011.

# FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*

*Nilka Fernandes Donadio*

*Artur Dzik*

*Mario Cavagna*

## INTRODUÇÃO

Em 1978, nasceu Louise Brown, a primeira gestação a termo obtida por meio da aplicação da assim chamada técnica de Fertilização *In Vitro* (FIV)<sup>1</sup>. Na FIV, óvulos e espermatozoides são manuseados em laboratório e os pré-embriões resultantes, devolvidos para o útero da mulher. Este procedimento revolucionou o tratamento dos fatores tuboperitoneais não resolvíveis por cirurgias laparotômicas ou laproscópicas convencionais. Desde então, a possibilidade de manusear gametas e embriões em laboratório vem contribuindo com o desenvolvimento de inúmeras variantes da FIV clássica, como a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI); a criopreservação de gametas, embriões e tecidos gonadais; e a avaliação da viabilidade genética destes, assim como tem permitido, em paralelo com o desenvolvimento da biologia molecular, a avaliação dos chamados “omas”: genoma, proteoma, transcriptoma e metaboloma dos embriões, revolucionando cada vez mais o tratamento da infertilidade conjugal.

## FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* CLÁSSICA

A FIV clássica, como dito anteriormente, consiste no manuseio dos gametas femininos e masculinos em laboratório, ocorrendo, durante o procedimento, a fertilização espontânea dos óvulos pelos espermatozoides, com pos-

terior formação de pré-embriões que são devolvidos para o trato genital feminino, mais frequentemente para a cavidade uterina. Entre as principais indicações para a aplicação da técnica estão os fatores tuboperitoneais; o fator masculino moderado, com sêmen apresentando entre 5 e 10 milhões de espermatozoides pós-processamento, com morfologia e motilidade normais; três ou mais falhas de ciclos de inseminação artificial intrauterina; e esterilidade sem causa aparente.

## Propedêutica prévia a FIV

Antes de se iniciar um ciclo de FIV indicado por exames habituais da propedêutica de infertilidade, a Anvisa, por meio da RDC33/06, exige que todos os casais tenham sorologias para HIV, hepatites B e C, VDRL e HTLV I e II. Diante de algum resultado positivo, existe a necessidade de o procedimento ser realizado em laboratório específico isolado, não podendo ocorrer em concomitância com casos soronegativos.

Exame ultrassonográfico de base, preferencialmente no início de um ciclo para avaliar o útero, anexos e também contagem de folículos antrais (entre 2 mm e 10 mm) são obrigatórios. A avaliação detalhada da cavidade uterina por histeroscopia, embora não obrigatória, é considerada útil. Avaliações seminais, complementadas com teste de Endtz (teste para diferenciar células redondas da



espermatogênese com os leucócitos), devem ser realizadas pouco tempo antes do ciclo, para evitar processos infecciosos, com leucospermias, no dia da FIV, diminuindo as taxas de sucesso.

## Hiperestimulação ovariana controlada

Embora seja viável a obtenção de óvulo e embrião a partir de um ciclo espontâneo, é aconselhável realizar uma hiperestimulação ovariana controlada (HOC), que resulta na possibilidade de se trabalhar com mais óvulos, com consequente desenvolvimento de maior número de embriões. Desta maneira, é possível realizar a escolha dos melhores pré-embriões a serem transferidos para o útero, podendo-se até criopreservar os extranumerários, visando às chances suplementares de gestação, sem a necessidade de repetir todo o processo.

Antes de se iniciar o estímulo com as gonadotrofinas exógenas, deve-se estabelecer como será feito o bloqueio das gonadotrofinas endógenas para evitar o pico prematuro de LH e luteinização precoce dos óvulos<sup>2</sup>. O uso dos análogos agonistas do GnRH (aGnRH) representa o modo mais comum de bloqueio. Devem ser aplicados de preferência na segunda fase do ciclo precedente à estimulação ovariana, ao redor do vigésimo dia do ciclo, na apresentação de depósito intramuscular (ex.: acetato de leuprolide – Lupron depot®, Lectrum®; acetato de triptorelina – Neodecapeptil® – Gonapeptyl®) ou por meio de aplicações diárias subcutâneas (acetato de leuprolide – Lupron diário®) ou intranasais (acetato de nafarelina – Synarel®).

Outra opção de bloqueio seria os análogos antagonistas do GnRH (antGnRH), aplicados diariamente a partir do quinto dia de estímulo ou a partir do momento em que se notam, ao ultrassom, folículos com maior diâmetro, entre 12 mm e 14 mm (acetato de cetorelix – Cetrotide®; acetato de ganirelix – Orgalutran®). Em ambos os esquemas, o bloqueio é mantido até o término da estimulação ovariana.

A estimulação ovariana propriamente dita é feita por meio do uso diário de gonadotrofinas (Gns) exógenas, como a gonadotrofina de mulher menopausada (hMG) (Menogon® – Ferring), o hMG ultrapurificado (Menopur® – Ferring; Merional® – Meizler), o FSH urinário altamente purificado (Bravelle® – Ferring; Fostimon® – Meizler), as versões recombinantes, que são a alfa e betafolitrofina (Gonal® – MerckSerono e Puregon® – Organon), e, eventualmente, o uso do LH recombinante (Luveris® – MerckSe-

rono) ou da própria gonadotrofina coriônica humana em baixas doses, diante de riscos de hiperestímulo ovariano (hCG – Choriomon® – Meizler; Choragon® – Ferring). A escolha da droga a ser utilizada depende de vários fatores, entre eles a presença de hipogonadismo hipogonadotrófico, em que se indicam estímulos com suplementação de LH; idade da mulher; risco de respostas exageradas à estimulação; síndrome dos ovários micropolicísticos; tipo de bloqueio do GnRH utilizado, entre outros.

A dose inicial de gonadotrofinas também deve ser individualizada, de acordo com a idade e a reserva ovariana de cada mulher. Como exemplo, mulheres com idade superior a 35 anos, ou com ovários submetidos anteriormente a procedimentos cirúrgicos, com FSH basal acima de 12 mUI/ml, com estrogênio acima de 50 pg/ml, com hormônio antimulleriano (AMH) menor do que 1,0 ng/ml, inibina B inferior a 45 pg/ml ou com número de folículos antrais (folículos entre 2 mm e 10 mm), ou submetidas a ultrassom basal inferior a quatro, devem iniciar o estímulo com altas doses de medicação, por apresentarem grande probabilidade de serem pobres respondedoras. Em contrapartida, mulheres portadoras de SOP devem iniciar o tratamento com diminutas doses, pelo risco de respostas exageradas. As doses habitualmente aplicadas variam de 75 UI a 450 UI ao dia, embora outras doses possam ser utilizadas em casos excepcionais, como 37,5 UI ou até 600 UI ao dia.

Durante a HOC, exames ultrassonográficos transvaginais são realizados, a cada dois ou três dias, para a avaliação do número e do desenvolvimento folicular, visando à adequação de doses e para estabelecer o momento ideal da aplicação do hCG. O hCG deve ser administrado quando ao menos um folículo atingir 18 mm e 50% dos outros recrutados se encontrarem com mais de 16 mm. Neste momento, se suspende o uso dos análogos do GnRH. A aplicação do hCG é de extrema importância para a maturação final dos oócitos e para a retomada da meiose, devendo ser feita na dose única de 5 mil a 10 mil UI ao dia ou, no caso do recombinante (Ovidrel®), na dose de 250 mcg.

## Captação oocitária

De 34 a 36 horas após a administração do hCG, realiza-se, sob sedação ou anestesia locorregional, a foliculo-aspiração transvaginal guiada por ultrassom para captação oocitária.

Uma agulha especial, fixada ao transdutor vaginal e acoplada a um sistema fechado de aspiração com pressão negativa controlada, permite, pela parede vaginal, atingir

os ovários, esvaziar os folículos e obter o líquido intrafolicular aspirado em tubos de Falcon® de 14 ml, com fundo redondo. Em meio a este líquido posteriormente despejado em placas de petri, localizam-se, sob estereomicroscópio, os oócitos rodeados pelas células granulosa, chamados de complexo cúmulus-oóforos (CO).

Em raras ocasiões, quando existem dificuldades ou riscos na realização das aspirações foliculares por via transvaginal, por quadros aderenciais graves, ou malformações, elas podem ser feitas por via laparoscópica, transvesical ou até mesmo laparotômica.

## Protocolos laboratoriais para um ciclo de fertilização *in vitro* clássica

### Véspera da foliculo aspiração

Na véspera da captação oocitária, algumas providências devem ser tomadas quanto ao preparo dos materiais e meios de cultura (MC).

Os meios que contêm Hepes, como, por exemplo, o HTF modificado, não precisam ser balanceados previamente, sendo somente aquecidos no dia de sua utilização. Já os meios não tamponados, como o HTF simples, devem permanecer entre 12 e 24 horas em incubadora com concentração entre 5% e 7% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C e com 98% de umidade antes de entrar em contato com os gametas e embriões.

O óleo mineral deve ser filtrado (millipore 0,8 µ) e posteriormente misturado na proporção 1:1 com HTF simples e permanecer em incubadora nas mesmas condições dos meios entre 12 e 24 horas.

### Dia da foliculo-aspiração e inseminação (Dia zero – D0).

No dia da foliculo-aspiração, o embriologista, assim que chega ao laboratório, checa a temperatura e a umidade do ambiente, a temperatura das placas aquecedoras e das incubadoras e avalia a concentração de CO<sub>2</sub> destas últimas.

Conhecendo previamente o número total de folículos com mais de 14 mm de diâmetro, obtidos após estimulação ovariana e avaliados pelo ultrassom no dia da indicação do hCG, o embriologista calcula o número provável de óvulos que serão obtidos, podendo preparar a quantidade adequada de placas de reconhecimento e inseminação que serão utilizadas. São necessárias para o procedimento de reconhecimento e lavagem inicial dos oócitos (processo

também chamado de *flushing*) e placas de 60 mm x 15 mm com poço central. Na área do poço central, coloca-se 1 ml de HTF simples com 10% a 15% de HSA (soro albumina humana) ou SSS (soro sintético substituto) sob 2 ml de óleo mineral previamente balanceado. Em lugar do HTF simples, pode-se utilizar qualquer dos meios da Tabela 1, entre outros. Calcula-se uma placa para cada oito ovócitos, que, uma vez montadas, são mantidas na incubadora até o momento de sua utilização. São preparadas também neste momento inicial placas de quatro poços para inseminação. Cada poço da placa é preenchido com 750 µL de HTF simples, com 10% a 15% de SSS (ou outro meio da Tabela 1), recoberto com 400 µL de óleo mineral balanceado, e, posteriormente, a placa é mantida em incubadora.

**Tabela 1.** Meios para *flushing* e cultivo de embriões com duas a oito células

Nome	Utilização e fabricante
G-GAMETE™	Com HSA, necessita permanecer em 6% de CO <sub>2</sub> e 37 °C – Vitrolife, cerca de 12 a 18 horas antes de sua utilização.
G-IVF™	Cerca de 12 a 18 horas antes de sua utilização, deve permanecer em 6% de CO <sub>2</sub> e 37 °C. Adicionar HSA ou SSS – Vitrolife
HTF simples	Cerca de 12 a 18 horas antes de sua utilização, deve permanecer em 6% de CO <sub>2</sub> e 37 °C. Adicionar HSA ou SSS – Irvine Scientific
Universal IVF Medium™	Cerca de 12 a 18 horas antes de sua utilização, deve permanecer em 6% de CO <sub>2</sub> e 37 °C – Medicult
Early Cleavage Medium® ECM®	Cerca de 12 a 18 horas antes de sua utilização, deve permanecer em 6% de CO <sub>2</sub> e 37 °C. Adicionar HSA ou SSS – Irvine Scientific
EmbryoGen®	Contém GM–GSF <i>growth factor</i> – Medicult

imediatamente antes da foliculo-aspiração, tubos de falcon de fundo redondo de 14 ml são preenchidos com 1 ml de HTF modificado com 10 UI/ml de heparina (ou outro meio para aspiração constante da Tabela 2) e colocados no aquecedor de tubos para serem encaminhados à sala de cirurgia.

**Tabela 2.** Meios de cultura para foliculo-aspiração.

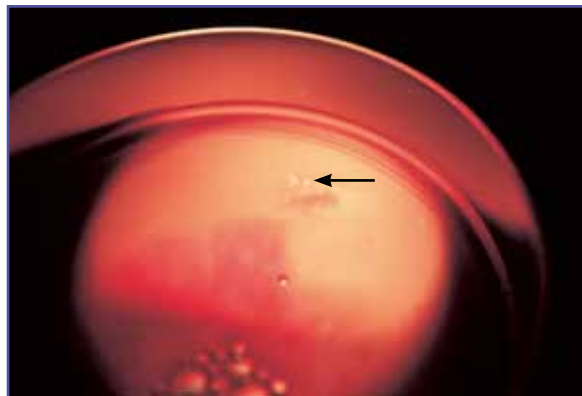
Nome	Utilização e fabricante
ASP™	Com 10 UI/ml de heparina – Vitrolife
G-MOPS™	Com solução tampão, necessita de suplementação com 5 UI/ml a 10 UI/ml de heparina – Vitrolife
SynVtro®Flush	Com 10 UI/ml de heparina – Medicult
HTF modificado	Necessita de suplementação com 5 UI/ml a 10UI/ml de heparina – Irvine Scientific

Os tubos são acoplados à agulha de aspiração e à bomba de pressão negativa. Depois, vão sendo trocados ao longo do procedimento, conforme vão sendo preenchidos com o líquido folicular. Anotam-se quantos folículos foram aspirados por tubo, no intuito de procurar o número equivalente de oócitos.

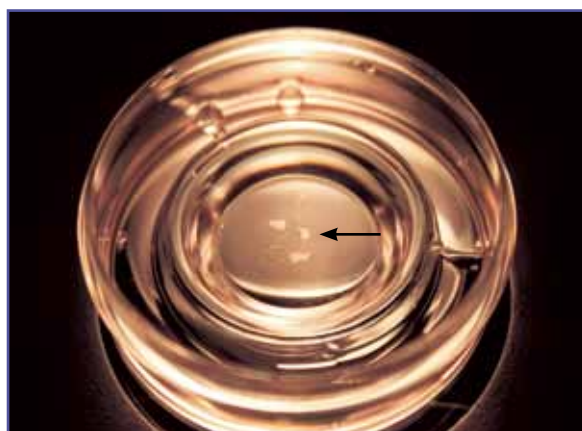
A placa de reconhecimento com o poço central já contendo HTF suplementado sob óleo é retirada da incubadora e a sua área externa, somente neste momento, é preenchida com 2 ml de HTF com Hapes.

O conteúdo de cada tubo é despejado em placa de petri de falcon de 100 mm x 20 mm e, sob o estereomicroscópio, localizam-se os complexos cúmulus-oóforos (oócitos rodeados de células da granulosa e protoaminoglican) (Figura 1). Cada oócito reconhecido é imediatamente retirado do líquido folicular com pipeta *pasteur* 5"  $\frac{3}{4}$ , lavado na parte externa da placa de reconhecimento contendo HTF com Hapes e, posteriormente, depositado no poço central da placa contendo HTF simples suplementado com 10% a 15% de SS, sob óleo mineral (Figura 2). Todo o procedimento de reconhecimento é feito sob fluxo laminar, sobre placa aquecida, com a menor exposição à luz possível, pois variações de temperatura e luz são extremamente prejudiciais. Após o reconhecimento, as placas contendo os oócitos são mantidas de três a seis horas em incubadoras a 37 °C, com 5% a 7% de CO<sub>2</sub>, dependendo do meio de cultura utilizado, e com 98% de umidade, para sua maturação final. Todas as placas devem ser adequadamente identificadas com o nome e o registro da paciente, assim como devem apresentar o número de oócitos ali contidos.

Os óvulos são classificados quanto a sua provável maturidade, pois, uma vez rodeados pelas células da granulosa, fica difícil avaliar adequadamente a presença de corpúsculo polar que caracteriza definitivamente o oócito como maduro, em metáfase II; ou a presença de vesícula germinativa (VG), que caracteriza imaturidade, estando o ovócito em prófase I; ou a ausência tanto do corpúsculo quanto da VG que caracteriza o estágio de metáfase I. Desta maneira, são avaliadas as características das células da granulosa, e filancia do cúmulus. Habitualmente, oócitos em metáfase II apresentam-se com a granulosa radiada, com grande número de células, espaçadas e citoplasma claro, além de ser fácil notar a grande filancia do cúmulus (Figura 3). Na metáfase I, a granulosa contém muitas células, mas compactas (Figura 4), e na prófase I, o número de células é bem reduzido, além do citoplasma do oócito ser também mais escuro. Aqueles gametas imaturos são mantidos por mais cerca de 12 a 24 horas em cultura, para atingir a maturidade antes de serem inseminados.



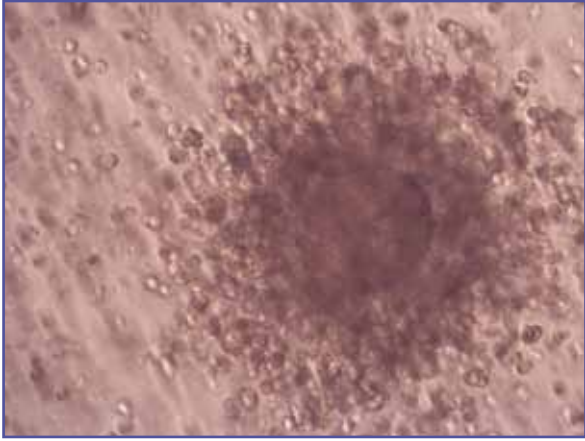
**Figura 1.** Tubo de 14 ml, com HTF modificado com 10 UI/ml de heparina, preenchido com líquido folicular sendo despejado em placa de 100 mm x 20 mm. Visualização de dois complexos cúmulus-oóforos (pequenas estruturas acinzentadas e translúcidas - setas), em meio ao líquido folicular.



**Figura 2.** Placa de reconhecimento com HTF suplementado com SSS, sob óleo mineral no poço central, e HTF modificado na área externa. Presença de três complexos cúmulus-oóforos no poço central (seta).



**Figura 3.** Complexo cúmulus-corona de oócito maduro. Células da granulosa em grande quantidade, claras e esparsas. Imagem obtida em microscópio invertido, com aumento de 100 vezes, com filtro Hoffmman.



**Figura 4.** Oócito imaturo. Menor quantidade de células da granulosa de citoplasma escuro e compactadas. Imagem obtida em microscópio invertido, com aumento de 200 vezes, com filtro Hoffmman.

Em paralelo ao manuseio dos gametas femininos, ocorre o processamento do sêmen, que consiste na separação dos gametas masculinos do plasma seminal por meio de centrifugação em meio de cultura simples ou em gradientes descontínuos de polivinilpirrolidone (ex.: Isolate® – Irvine).

Após o período de incubação, os oócitos maduros são transferidos para as placas de inseminação, sendo depositados no máximo três oócitos em cada poço, deixando sempre um dos quatro poços livres para que, no dia seguinte, os oócitos possam ser desnudados neste local para posterior avaliação da fertilização. Uma média de 100 mil espermatozoides móveis por ml, obtidos pós-processamento, é depositada em cada um dos poços com oócitos. Depois da inseminação, as placas são mantidas em incubadora.

São preparadas neste dia as placas de cultivo embrionário de 35 mm x 15 mm, para serem utilizadas no dia seguinte. O meio utilizado nas placas de cultivo varia de acordo com o tempo de cultivo embrionário pretendido. O pré-embrião apresenta diferentes necessidades, de acordo com seu desenvolvimento. Embriões com duas a oito células não metabolizam adequadamente a glicose, sendo ideais, então, meios com menores quantidades deste soluto. Já no período de oito células até blastocisto, existem outros compostos orgânicos que devem estar presentes no meio, como aminoácidos e vitaminas. Em função dessas variantes, há duas linhas de meios: aqueles ditos globais, como o Single Step Medium™ SSM™ (Irvine Scientific) e Global® (Lifeglobal), entre outros que são aplicáveis para

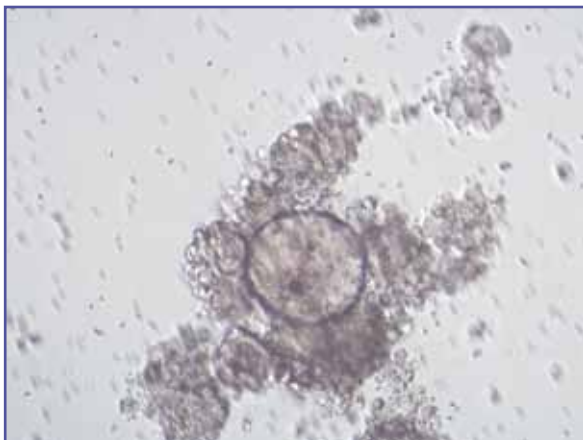
todo o período de cultivo embrionário, desde a fertilização até o blastocisto, e outros, ainda, conhecidos como sequenciais, como, por exemplo, o S1 e o S2; o ISM – 1 e ISM – 2™ (Medicult); o P1® e o MultiblastMedium® (Irvine Scientific), em que se inicia o cultivo com o primeiro meio, trocado quando o embrião chega a oito células, para que este atinja estágio de blastocisto em cultivo no segundo meio. Independentemente do MC, as placas são montadas com microgotas de 20 µL a 50 µL sob óleo mineral ou de parafina, e mantidas em incubadora por 24 horas até sua utilização.

### *Checagem da fertilização – Dia +1 (D1)*

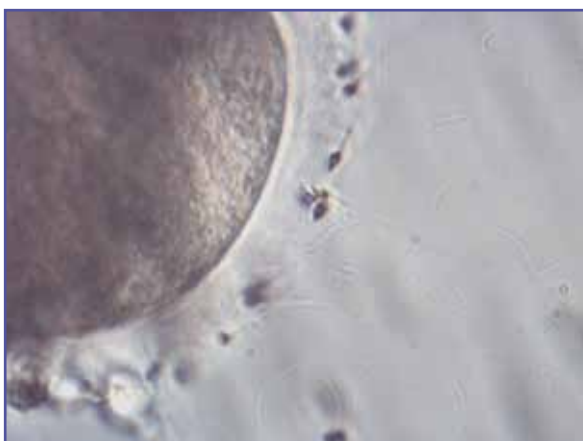
Na manhã seguinte (Dia +1), ou melhor, de 12 a 18 horas depois, as placas de inseminação são retiradas das incubadoras e, sob fluxo laminar, em estereomicroscópio, transferem-se os óvulos dos três poços onde foram inseminados para o poço limpo de cada placa, onde serão gentilmente desnudados, ou seja, o excesso de células da granulosa e espermatozoides aderidos na zona pelúcida (Figuras 5 e 6) são mecanicamente retirados pela passagem sucessiva dos óvulos, um a um, por finos capilares de diâmetros progressivamente menores (*Stripper tips*) de 145 µm a 125 µm (Figura 7). Ao final da desnudação, cada oócito é transferido isoladamente para uma gota da placa de cultivo, preparada na véspera.

Cada placa de cultivo e cada uma de suas gotas são numeradas, permitindo a identificação de cada oócito e possibilitando o acompanhamento da evolução individual de cada pré-embrião ao longo dos dias. A placa de cultivo com os óvulos é transferida para um microscópio invertido, onde, sob aumento de 400 vezes, é verificada a presença dos dois pronúcleos (PNs), masculino e feminino, o que comprova a fertilização. Fertilizações anômalas podem ocorrer, como a verificação de somente um pronúcleo ou a presença de três ou mais PNs no oócito, sendo, então, descartados. Do total dos óvulos maduros (em metáfase II) submetidos à FIV, cerca de 60% a 70% fertilizam. Os pronucleados são classificados morfológicamente, de acordo com a simetria entre ambos os PNs, com o alinhamento deles com os corpúsculos polares e com a distribuição, no seu interior, dos corpúsculos precursores dos nucléolos, que devem estar em número superior a sete e dispersos em ambos os PNs (Figura 8), ou em número menor do que sete e polarizados na interface de contato dos PNs (Figura 9)<sup>3</sup>. Todos os dados sobre a fertilização e a classificação dos pronucleados são anotados em formulários específicos, onde diariamente serão descritas as suas clivagens e evoluções.





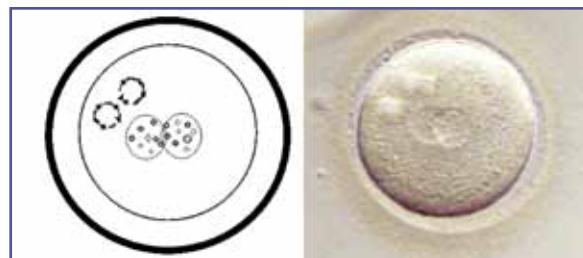
**Figura 5.** Oócito na placa de inseminação, antes da denudação, apresentando excesso de células da granulosa e espermatozoides aderidos na zona pelúcida. Imagem obtida em microscópio invertido, com aumento de 200 vezes, com filtro Hoffmman.



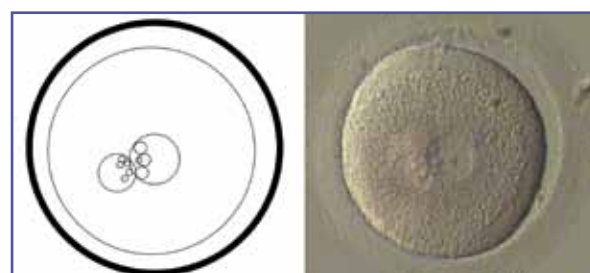
**Figura 6.** Detalhe da zona pelúcida do oócito após 12 a 18 horas de inseminação, apresentando células da granulosa e espermatozoides aderidos. Imagem obtida em microscópio invertido, com aumento de 400 vezes, com filtro Hoffmman.



**Figura 7.** Procedimento de denudação de oócitos após inseminação, em placa de quatro poços preenchidos com meio de cultivo, sob óleo mineral.



**Figura 8.** Esquematização e foto de zigoto apresentando pronúcleos (PN) justapostos, centralizados, com distribuição normal dos corpúsculos precursores dos nucléolos, sendo estes pequenos, em número superior a sete por PN e dispersos. No citoplasma, nota-se a presença de halo citoplasmático. Imagem obtida em microscópio invertido, com aumento de 400 vezes, com filtro Hoffmman.



**Figura 9.** Esquematização e foto de zigoto apresentando pronúcleos justapostos, centralizados, com distribuição normal dos corpúsculos precursores dos nucléolos, sendo estes grandes, em número inferior a sete por PN e polarizados. No citoplasma, nota-se a presença de halo citoplasmático. Imagem obtida em microscópio invertido, com aumento de 400 vezes, com filtro Hoffmman.

### Verificação da clivagem – Dia +2 (D2)

No dia seguinte, 48 horas após a inseminação, verifica-se a presença de divisão celular entre os fertilizados. Nesse momento, habitualmente, apresenta de 4 a 6 células, ou melhor dizendo, blastômeros. Com 72 horas, frequentemente os pré-embriões com desenvolvimento adequado se encontram com 8 a 10 blastômeros. Em algumas situações ou protocolos, como já citado, os embriões são mantidos em cultivo até o quinto ou sexto dia, atingindo o estágio de blastocisto (Figura 10).



**Figura 10.** Blastocisto no sexto dia de cultivo em meio de cultura Single Step Medium® – Irvine Scientific. Imagem obtida em microscópio invertido, com aumento de 400 vezes, com filtro Hoffmman.



## CLASSIFICAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

A transferência (TE) dos pré-embriões pode ser realizada no chamado Dia +2 (48 horas), no Dia +3 (72 horas) ou em estágios mais avançados, já na forma de blastocistos com cinco a seis dias de cultivo.

Os melhores embriões são selecionados para a transferência, de acordo com a sua qualidade morfológica. Entre os principais parâmetros avaliados estão o tempo de clivagem dos embriões, a presença de fragmentação citoplasmática (fragmentos celulares anucleados que aparecem entre os blastômeros), a simetria entre os blastômeros, a presença de vários núcleos em vez de um único por célula, a compactação e o aspecto do citoplasma. Embriões com blastômeros simétricos e ausência de fragmentação são classificados como embriões do tipo I, segundo Veeck LL<sup>4</sup>. Já aqueles com fragmentação até 20%, sem assimetria, são considerados do tipo II. A presença de assimetria entre os blastômeros com até 20% de fragmentação os torna do tipo III. A existência de 20% a 50% de fragmentação caracteriza os embriões do tipo IV, e os do tipo V apresentam mais do que 50% do seu volume ocupado por fragmentos. Outros parâmetros de classificação são discutidos em capítulo específico deste atlas.

Nos primórdios da FIV, em razão do alto custo dos procedimentos e das baixas taxas de implantação, a maioria dos centros de Reprodução Assistida (RA) transferia um elevado número de embriões para a cavidade uterina, visando à otimização dos resultados. Esta prática promoveu um aumento significativo das gestações múltiplas em comparação aos dados da população geral, que não ultrapassam 2%. Ainda hoje, na população submetida à FIV, segundo dados do CDC<sup>5</sup>, as gestações múltiplas estão presentes em 31,8% dos ciclos, sendo 28% gemelares, 3,8% trigemelares e o restante quadrigemelares ou mais. As gestações múltiplas são, atualmente, consideradas iatrogênicas da RA, em função dos riscos e dos custos da prematuridade, morbidade e mortalidade neonatal. Atualmente, o Conselho Federal de Medicina consente com a transferência de até dois embriões para a cavidade uterina em pacientes com até 35 anos de idade; para pacientes com idades entre 36 e 39 anos, até três embriões e, naquelas com mais de 40 anos, permite-se a transferência de até quatro embriões. A transferência de um único embrião, a chamada SET (*Single embryo transfer*) eletiva, sem queda nas taxas de gravidez, é o grande objetivo dos centros de

reprodução. Gerris *et al.* preconizam em mulheres com menos de 36 anos, na primeira ou na segunda tentativa de FIV, a TE de um único embrião de boa qualidade morfológica e, na ausência deste, a TE de no máximo dois pré-embriões. Em mulheres com idades entre 37 e 39 anos, dois PE, e somente a colocação de três ou quatro PE em mulheres com mais de 39 anos ou naquelas com dois ciclos anteriores infrutíferos<sup>6</sup>.

O principal problema nas transferências de números menores de embriões é que o aspecto da morfologia do embrião no momento da transferência não traduz obrigatoriamente a sua capacidade de implantação e evolução. Muitas vezes, pode-se deixar de transferir aquele embrião com reais chances de implantação por não ser o melhor no aspecto morfológico. Futuramente, com o desenvolvimento e o domínio das técnicas de avaliação do genoma embrionário, o transcriptoma (avaliação do RNAm), o proteoma (produção de proteínas) e o metaboloma (estudo dos metabólitos produzidos por cada embrião), será possível uma escolha mais adequada, garantindo maiores chances de implantação e adequado desenvolvimento.

As TEs são realizadas sem necessidade de analgesia, pela passagem de um cateter carregado com os embriões pelo colo uterino. Este momento é crucial para o sucesso do ciclo. O ideal é que a mulher esteja com a bexiga cheia, pretendendo-se a retificação da flexão colo-corpo-uterino. Lava-se exaustivamente o colo com soro fisiológico e, posteriormente, com solução tampão (PBS1X® – Irvine). O cateter é carregado com os embriões em meio de cultura enriquecido com 50% de SSS. Evita-se tocar o fundo do útero com o cateter, evitando contrações miométriais, sendo o cateter, de preferência, bem macio e maleável, para diminuir o trauma no endométrio. O acompanhamento do procedimento por ultrassom via transabdominal é recomendado.

Os cateteres variam quanto a sua rigidez, presença de camisa externa, presença de guia metálico-moldável, podendo ou não apresentar ponta hiper-refringente ao ultrassom (*eco-tip*). Essas opções de cateter existem para superar eventuais dificuldades na hora de sua passagem pelo canal endocervical. O ideal é realizar o assim chamado *mock test*, que representa a passagem do cateter vazio, em ciclo anterior ao procedimento, para diagnosticar possíveis dificuldades e eventualmente indicar dilatação cervical prévia. Transferências difíceis, em que ocorre sangramento, diminuem as taxas de gestação em até 50%.

## RESULTADOS

Segundo dados do registro de 2008 da Rede Latino-americana de Reprodução Assistida, a taxa de gravidez clínica foi de 35,58% por transferência embrionária e, no Centro de Reprodução Humana do Hospital Perola Byington, foi de 29%, devendo-se lembrar que este último se trata de uma instituição pública e de ensino para residentes e estagiários das áreas médica e biomédica.

## FERTILIZAÇÃO IN VITRO COM INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES VS. FERTILIZAÇÃO IN VITRO CLÁSSICA

O ano de 1992 representa um marco histórico no tratamento da infertilidade masculina, pelo surgimento da chamada injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), que revolucionou a conduta no fator masculino grave. A diferença entre a FIV clássica e a ICSI é que, nesta última, a fertilização do óvulo não ocorre espontaneamente, mas, sim, é provocada, de maneira mecânica, pelo depósito de um espermatozoide diretamente no citoplasma oocitário por meio de micromanipulação (técnica descrita em capítulo específico deste Atlas).

A ICSI deveria ser indicada somente nos casos de fator masculino grave, falha de fertilização pela técnica de FIV clássica ou perante a necessidade de diagnóstico pré-implantacional, para evitar contaminação com DNA de espermatozoides aderidos na zona pelúcida dos embriões oriundos de ciclos de FIV.

O que nos chama a atenção é que cada vez mais os ciclos de FIV clássica vêm sendo abandonados pelos centros de RA, em detrimento da aplicação da ICSI, mesmo em casos em que esta última técnica não estaria indicada. Para exemplificar, em 2008, segundo dados da Redlara, dos 25.896 ciclos iniciados, somente 3.842 (14,83%) foram de FIV clássica, e os 22.056 (85,17%) restantes foram de ICSI, embora somente 30% das indicações de RA tenham sido por fator masculino.

Os centros que não fazem mais nenhum ciclo de FIV clássica justificam que a ICSI é melhor por garantir maior

fertilização, diminuindo os casos sem embriões para transferência, uma vez que os casais têm custos elevados para fazer uma tentativa de fertilização. Esquecem-se, porém, que na FIV clássica ocorre uma escolha mais fisiológica do espermatozoide, e a manipulação dos gametas é menor. Além disso, o estudo da gametologia e a avaliação da fertilização espontânea são partes importantes do diagnóstico do fator de infertilidade sem causa aparente.

Dados comparando as taxas de implantação segundo a técnica de fertilização não mostraram diferenças estatisticamente significantes, apesar de serem mais elevadas na FIV clássica, de acordo com dados da Redlara (Registro de 2008 – Gráfico 1).

A FIV clássica tem ainda um papel importante dentro da RA, não podendo ser abandonada.

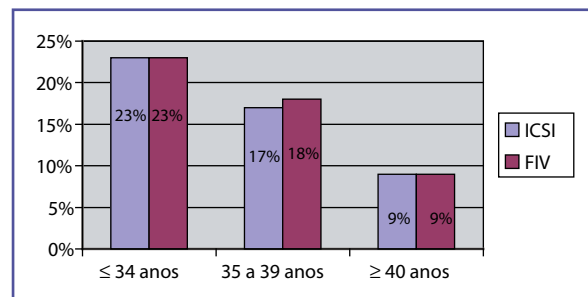


Gráfico 1. Taxa de implantação em cada faixa etária segundo a técnica de fertilização.

## REFERÊNCIAS

1. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the implantation of human embryo. *Lancet*. 1978;12;2(8085):366.
2. Karten MJ, Rivier JE. Gonadotropin-releasing hormone analog design. Structure-function studies towards the development of agonists and antagonists: rationale and perspectives. *Endocr Rev*. 1986;7(1):44-66.
3. Donadio NF, Donadio N. Influência nas taxas de implantação, da seleção de pré-embriões para transferência uterina, a partir do escore dos pronucleados associado ao obtido no terceiro dia de cultura. *RBGO*. 2005;27(5):295.
4. An Atlas of human gametes and conceptuses: an illustrated reference for assisted reproduction technologies. Lucinda L. Veck. 1999. Parthenon Publishing group.
5. Gerris JMR, Human Reprod Update. 2005;11(2):105-21.
6. Registro Latino-americano de Procedimentos de Reprodução Assistida 2008. Disponível em: [www.redlara.com](http://www.redlara.com).