



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Beatriz Coelho Martins

TÉCNICAS DE PROcriação Medicamente
ASSISTIDA:
O CONTEXTO LABORATORIAL DA INFERTILIDADE
MASCULINA

Relatório de Estágio no âmbito do Mestrado em Bioquímica, orientado pela
Doutora Inés Cerdeira e pelo Professor Doutor João Ramalho-Santos e
apresentado ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências
e Tecnologias da Universidade de Coimbra.

Julho de 2022

Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra

TÉCNICAS DE PROcriação Medicamente ASSISTIDA: O CONTEXTO LABORATORIAL DA INFERTILIDADE MASCULINA

Beatriz Coelho Martins

Relatório de estágio no âmbito do Mestrado de Bioquímica orientado pela Doutora Inés Cerdeira, coorientado internamente pelo Professor Doutor João Ramalho-Santos e apresentado ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Julho de 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Agradecimentos

No presente segundo ano do mestrado em Bioquímica da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra, a realização do estágio curricular laboratorial na clínica Ferticentro revelou ser uma experiência magnífica e única, na qual não teria sido possível realizar na sua plenitude sem o apoio incansável que me foi dado. Assim, gostaria de agradecer a todos os que, de alguma forma, me ampararam e contribuíram para o meu enriquecimento pessoal e profissional.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Doutor Vladimiro Silva pela excelente oportunidade em acolher-me na Ferticentro para a realização deste estágio. Sempre foi um sonho, por vezes longínquo, poder ter esta experiência na área da PMA, e graças a si, consegui concretizar esta ambição de forma incrível.

Gostaria de agradecer à Doutora Inês Cerdeira pela sua disponibilidade em ser minha orientadora interna, por todo o apoio e paciência que teve comigo ao longo do estágio, que contribuiu e muito para a minha formação e potencializou a minha experiência na Ferticentro.

Gostaria de agradecer ao Professor João Ramalho-Santos por ter aceitado ser o meu orientador interno. Não tenho dúvidas que as suas aulas de Biologia da Reprodução foram um incentivo e uma certeza de que estava no caminho certo para o meu futuro. Quero agradecer também pela proatividade com que me aconselhou durante a elaboração do meu relatório.

Gostaria de agradecer a todos os embriologistas que possibilitaram a minha integração e acompanhamento ao longo do estágio, com momentos de bom ambiente e muitas gargalhadas. A ti Bruno, obrigada pela tua incansável compreensão dos meus receios e encorajamento a ensinares-me. À Sofia por toda a ajuda, partilha de conhecimento e amizade. Obrigada a ti Inês pelas tuas palavras de preocupação e apoio, considere-te no início e continuo a achar-te uma inspiração para mim. Ao Elisson por toda a iniciativa, simpatia e momentos de descontração. E obrigada Juliana, que desde início te mostraste disponível para me ajudar, mesmo quando as tarefas foram trabalhosas.

Queria agradecer a toda a equipa da Ferticentro com quem tive a oportunidade de conviver, por toda a amabilidade com que me acolheram e entreaduam que me dão.

Queria agradecer a ti Joel, por toda a paciência, carinho e companheirismo que demonstraste ao longo do ano. Obrigada pela tua ajuda na elaboração do relatório, foste essencial para me manter estável e focada no meu objetivo. Obrigada pelo teu encorajamento e amor.

Por último, mas sem dúvida não menos importante, agradeço à minha família. Obrigada aos meus pais, Mãe e João, por sempre me apoiarem nas minhas ambições, e à minha avózinha e ao meu avôzinho por todas as palavras de alento e carinho, que foram fulcrais para me manter forte

Resumo

O mecanismo de reprodução humana, no qual está envolvida a etapa de fertilização e o desenvolvimento de uma gravidez de forma natural, corresponde a um processo complexo e demorado com apenas 20% de probabilidade de sucesso a cada ciclo reprodutivo. Este acontecimento implica a união dos gametas feminino e masculino, com o propósito da obtenção de um embrião capaz de se desenvolver corretamente, pelo que qualquer dificuldade poderá inviabilizar o sucesso na obtenção de uma gravidez clínica e consequente descendência.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a Infertilidade é considerada um problema de saúde pública com incidência mundial em cerca de 186 milhões de pessoas, compondo uma questão preocupante para a manutenção da demografia da sociedade contemporânea. A infertilidade é vista como um problema conjugal, com ênfase em fatores de origem feminina, masculina, conjunta ou idiopática, podendo esta derivar de fatores patológicos, congênitos ou mesmo de fatores extrínsecos ambientais.

A Procriação Medicamente Assistida é considerada uma área em rápida expansão e surge como o conjunto de técnicas e tratamentos que possibilitam o sucesso em alcançar uma gravidez em casais inférteis, evitando as possíveis barreiras que dificultam uma concepção de forma natural. O Espemograma é considerado um dos principais pontos de partida nas técnicas de procriação medicamente assistida, na medida em que a avaliação dos parâmetros espermáticos permite um estudo aprofundado de fatores de infertilidade masculina, auxiliando na definição do melhor plano de tratamento a adotar. Para uso dos gametas masculinos em técnicas como a Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide e Inseminação Intrauterina, torna-se necessário o prévio processamento da amostra seminal, com o objetivo de mimetizar todos os acontecimentos bioquímicos de maturação espermática que ocorrem *in vivo*, precedentes à fertilização.

Durante a realização do estágio curricular em Procriação Medicamente Assistida, acompanhou-se permanentemente os trabalhos executados no laboratório da Ferticentro, de modo a compreender e integrar a rotina laboratorial desta instituição, tendo como ênfase principal o laboratório de Andrologia, onde foram executados protocolos de avaliação de parâmetros espermáticos, processamento de gametas para procriação medicamente assistida e criopreservação de espermatozoides, no qual se garantiu a aquisição de competências profissionais teóricas e práticas necessárias ao desempenho em qualquer laboratório de andrologia no futuro.

Abstract

The human reproduction mechanism is composed by a fertilization step and the development of a pregnancy, which, when done in a natural way correspond to a complex and time-consuming process with only a 20% probability of success in each reproductive cycle. This event implies the union of the female and male gametes, with the purpose of obtaining an embryo capable of developing correctly, so any difficulty could make the success in obtaining a clinical pregnancy and consequent offspring unfeasible.

According to the World Health Organization, Infertility is considered a public health problem with a worldwide incidence in about 186 million people, composing a worrying issue for the maintenance of the demography of contemporary society. Infertility is seen as a marital problem, with emphasis on factors of female, male, joint or idiopathic origin, which may derive from pathological, congenital, and environmental factors.

Medically Assisted Reproduction is considered a rapidly expanding area and emerges as the set of techniques and treatments that make possible to successfully achieve a pregnancy in infertile couples, avoiding the possible barriers that make it difficult to conceive naturally. The Spermogram is considered one of the main starting points in assisted reproduction techniques, as the evaluation of sperm parameters allows an in-depth study of male infertility factors, helping to define the best treatment plan to adopt. For the use of male gametes in techniques such as Intracytoplasmic Sperm Injection and Intrauterine Insemination, prior processing of the seminal sample is necessary, to mimic all the biochemical events of sperm maturation that occur *in vivo*, prior to fertilization.

During the curricular internship in Medically Assisted Reproduction, there was constant participation on all the tasks carried out in the Ferticentro laboratory, either observational or practical, in a way to understand and integrate the laboratory routine of this institution, with the main emphasis on the Andrology laboratory, where evaluation protocols were carried out. Among others, duties like the analysis of sperm parameters, gamete processing for medically assisted procreation and sperm cryopreservation, ensured the acquisition of theoretical and practical professional skills necessary for any andrology laboratory work in the future.

Índice

Agradecimentos.....	3
Resumo	4
Abstract	5
Índice	6
Índice de Figuras e Tabelas.....	8
Objetivos.....	11
I. Introdução.....	12
1. Diferenciação Sexual.....	12
2. O Sistema Reprodutor Masculino.....	13
2.1. Espermatozoide.....	15
2.2. Espermatogénese	18
2.3. Regulação Hormonal.....	21
2.4. Esperma.....	23
2.5. Maturação espermática.....	25
3. Interação entre os gâmetas feminino e masculino.....	27
4. A Infertilidade	28
4.1. Definição e Caracterização geral.....	28
4.2. Prevalência e Impacto em Portugal e no Mundo	30
4.3. Fisiopatologia.....	31
4.3.1. Fatores Conjugais Femininos.....	31
4.3.2. Fatores Conjugais Masculinos.....	32
5. Técnicas de Procriação Medicamente Assistida	33
5.1. Inseminação Intrauterina	33
5.2. Fertilização <i>in vitro</i>	34
5.2.1. Microinjeção Intracitoplasmática de Espermatozoide.....	34

II. Materiais e Métodos	36
I. Laboratório de Andrologia.....	36
I.1. Obtenção dos gametas masculinos.....	36
I.2. Análise Espermática.....	37
I.2.1. Avaliação Macroscópica.....	38
I.2.1.1. Odor.....	38
I.2.1.2. Aspeto.....	38
I.2.1.3. Liquefação.....	38
I.2.1.4. Volume.....	39
I.2.1.5. Viscosidade.....	39
I.2.1.6. pH.....	39
I.2.2. Avaliação Microscópica.....	40
I.2.2.1. Concentração.....	41
I.2.2.2. Motilidade.....	42
I.2.2.3. Morfologia.....	42
I.2.2.4. Vitalidade.....	44
I.2.3. Teste de Fragmentação do DNA.....	46
I.2.4. Teste de Ligação ao Ácido Hialurónico.....	47
I.3. Processamento dos gametas masculinos para tratamentos de PMA.....	48
I.3.1. Amostra para uso na técnica de ICSI.....	50
I.3.2. Amostra para uso na técnica de IUI.....	51
I.3.3. Amostra obtida por metodologias cirúrgicas.....	51
I.4. Criopreservação de gametas masculinos.....	52
III. Exposição e Discussão de Atividades Realizadas	54
1. Laboratório de Andrologia.....	54
2. Laboratório de Embriologia.....	55
3. Laboratório de Criobiologia.....	56
IV. Considerações Finais	57
V. Referências Bibliográficas	59

Índice de Figuras e Tabelas

Figura 1: Diferenciação sexual do trato reprodutivo humano no desenvolvimento embrionário. A: Representação esquemática do aparelho reprodutor indiferenciado. B: Desenvolvimento masculino, com regressão dos ductos de Müller e diferenciação dos ductos de Wolff. C: Desenvolvimento feminino, com regressão dos ductos de Wolff e diferenciação dos ductos de Müller. Adaptado de (Sherwood & Ward, 2019).....	12
Figura 2: Secção sagital do aparelho reprodutor masculino, evidenciando os órgãos primários, os órgãos secundários com o sistema de ductos e as glândulas sexuais anexas. Adaptado de (Shier et al., 2018).....	13
Figura 3: Esquema representativo do testículo e do interior dos túbulos seminíferos, com o respetivo desenvolvimento das células espermáticas, desde a lâmina basal até ao lúmen do túbulo seminífero. Adaptado de (Darszon et al., 2005).....	14
Figura 4: Representação estrutural do espermatozoide humano, evidenciando as suas partes principais, nomeadamente a cabeça, peça intermédia e cauda. Adaptado de (Darszon et al., 2005).....	16
Figura 5: Corte transversal de um flagelo espermático, evidenciando o interior do axonema, com o seu sistema 9+2 de microtúbulos e respetiva composição dos protofilamentos de tubulina. Adaptado de (Gilbert & Barresi, 2020).....	17
Figura 6: A. Túbulos seminíferos do testículo. Pode visualizar-se o epitélio germinativo (EG) contendo as células espermatogénicas nas diversas etapas de desenvolvimento e o lúmen dos túbulos (L). Tecido intersticial assinalado com a seta. Fotomicrografia corada com Hematoxilina-Eosina sob objetiva de pequeno aumento (4X). B. Espermatogénese. Na base do túbulo seminífero encontram-se espermatogónias e células de Sertoli. Os espermátides na fase da espermiogénese apresentam-se com um núcleo denso e alongado. Fotomicrografia corada com Hematoxilina-Eosina sob objetiva de grande aumento (40X). Adaptado de (Junqueira & Carneiro, 2013).....	19
Figura 7: Esquema ilustrado da regulação hormonal realizada no sistema reprodutor masculino, nomeadamente o eixo Hipotálamo-Hipófise-Testículo. O sistema nervoso central (SNC) perante estímulos internos ou ambientais provoca uma ação no hipotálamo, desencadeando ações sobre a hipófise anterior. São segregadas gonadotropinas cuja atuação na gónada masculina provoca o desenvolvimento da espermatogénese e a libertação de hormonas. Mecanismo de feedback	

negativo indicado a tracejado azul, fruto da ação das hormonas testosterona e inibina, nas hormonas LH, FSH e GnRH. Adaptado de (Silverthorn, 2019).22

Figura 8: Representação esquemática do processo de coagulação e liquefação do esperma humano. Adaptado de (Ferreira, 2020; Gupta & Kumar, 2017).25

Figura 9: Capacitação espermática em mamíferos. A remoção de colesterol da membrana promove a entrada de HCO_3^- e Ca^{2+} . Em conjunto com o efluxo de potássio (K^+), estas alterações provocam uma mudança no potencial membranar do gâmeta masculino. A ativação da AC promove a produção de cAMP, que ativa a PKA e promove a fosforilação de proteínas quinases, culminando na fosforilação de proteínas espermáticas essenciais para a hiperativação e reação acrossómica. Adaptado de (Gilbert & Barresi, 2020).26

Figura 10: Gráfico de comparação evidenciando o Índice Sintético de Fecundidade (ISF) inversamente proporcional à Idade Materna após o nascimento do primeiro filho, em Portugal, durante o período compreendido entre 1960-2021. O ISF foi calculado através da soma das taxas de fecundidade por grupos etários compreendidos entre os 15 e 49 anos, durante um ano civil. Adaptado de (INE, 2022a) e consultado a 01-06-2022.31

Figura 11: Câmara de contagem Makler (à esquerda) e visualização da grelha graduada onde é possível observar os espermatozoides através do microscópio de contraste de fase, a uma ampliação de 200x (à direita). A base da câmara Makler é delimitada por 4 estruturas em quartzo que permitem a colocação exata de 10 μL de amostra, sendo esta coberta com um vidro graduado contendo 100 quadrados (10x10) de 0,1x0,1mm cada. O volume de amostra numa linha graduada corresponde exatamente a 1×10^{-6} de mililitro, pelo que a contagem de espermatozoides em 10 quadrados indica a concentração destes no ejaculado, em milhões/mL. Imagem capturada na clínica Ferticentro e obtida com autorização.41

Figura 12: Observação microscópica a 1000x com óleo de imersão de uma amostra espermática após coloração com a metodologia Diff-Quik. **1:** Espermatozoide com peça intermédia amorfa. **2:** Espermatozoide com a cabeça alongada e a peça intermédia grossa. **3:** Espermatozoide com cabeça amorfa. **4:** Espermatozoides com a cauda enrolada. **5:** Espermatozoide com peça intermédia amorfa com inserção assimétrica na cabeça. **6:** Espermatozoide com cabeça redonda. **7:** Espermatozoide normal. Imagens capturadas na clínica Ferticentro e obtida com autorização.44

Figura 13: Avaliação da integridade do DNA espermático. **A:** Observação microscópica a 200x de espermatozoides após realização do teste de Dispersão da Cromatina Espermática. **B.I:** Espermatozoides com *halo* evidente e demarcado, característicos de espermatozoides com DNA intacto. **B.II:** Espermatozoides sem *halo* ou com pequenas dimensões, indicadores de espermatozoides com DNA fragmentado. **B.III:** Espermatozoide sem *halo* e com o núcleo corado de forma suave e irregular, evidenciado em espermatozoides degradados com danos no DNA e nas

proteínas nucleares. I3A: Imagem capturada na clínica Ferticentro e obtida com autorização; I3B: Imagem obtida por (Fernandez et al., 2005).....47

Figura 14: Técnicas de processamento espermático. **A:** Metodologia-padrão da técnica de Swim-up. **B:** Representação da técnica de Centrifugação por Gradiente Descontínuo de Densidades. Adaptado de (Agarwal et al., 2014).....50

Figura 15: Processamento fragmentos obtidos por biópsia testicular. **A:** Placa de Petri contendo os fragmentos testiculares após extração. **B:** Dispersão mecânica dos túbulos seminíferos com o objetivo de soltar os espermatozoides presentes no seu interior. **C:** Túbulos seminíferos aquando maceração. Imagens capturadas na clínica Ferticentro e obtidas com autorização.....52

Tabela 1: Compostos principais das secreções presentes no líquido seminal, provenientes das glândulas sexuais anexas e epidídimos. Adaptado de (Gupta & Kumar, 2017).24

Tabela 2: Classificação da motilidade espermática (World Health Organization, 2021).42

Tabela 3: Classificação da morfologia espermática (World Health Organization, 2021).43

Tabela 4: Nomenclatura de variações nos parâmetros de qualidade espermática (World Health Organization, 2010).45

Tabela 5: Quadro sumário dos procedimentos realizados relativamente ao tratamento de amostras espermáticas EP ou ECD para utilização em ciclos de ICSI. EP – Esperma próprio; ECD – Esperma criopreservado de dador.....55

Tabela 6: Quadro sumário dos protocolos realizados e competências desenvolvidas no laboratório de andrologia durante o período do estágio curricular: ● – protocolo executado com autonomia; ● – protocolo realizado com supervisão; ● – protocolo apenas observado.....55

Objetivos

O presente relatório diz respeito a um estágio curricular prático-pedagógico realizado na clínica de fertilidade Ferticentro em Coimbra, no âmbito do 2º ano do Mestrado em Bioquímica da Universidade de Coimbra, cujo objetivo principal se baseou em complementar a formação académica e ainda transpor esta formação para um típico ambiente profissional.

Objetivos mais específicos incluíram proporcionar um contacto próximo com as áreas da Embriologia e Reprodução Medicamente Assistida, através da aquisição de competências laboratoriais e científicas, experienciando situações reais do quotidiano e desenvolvendo capacidades técnicas de execução dos procedimentos realizados nos laboratórios de PMA. A componente prática incidiu maioritariamente no laboratório de andrologia, onde se teve como objetivo a obtenção de autonomia no estudo e análise dos parâmetros espermáticos, preparação dos gâmetas masculinos para inseminação artificial, fertilização *in vitro* e ainda criopreservação de gâmetas masculinos. Nos laboratórios de embriologia e criobiologia, teve-se como objetivo o contacto observacional com as metodologias aplicadas na preparação de gâmetas femininos para uso em PMA, assim como as técnicas utilizadas na criopreservação de ovócitos e embriões, envolvendo a dinâmica do banco de gâmetas e o seu respetivo armazenamento e manutenção.

O desenvolvimento de competências interpessoais e sociais também foi um dos objetivos da realização deste estágio curricular, na medida em que é permitida uma aproximação com o contexto socioprofissional necessário para melhor desempenhar as funções profissionais futuras, estimulando a capacidade de comunicação e trabalho em equipa, independência de trabalho e flexibilidade de pensamento.

I. Introdução

I. Diferenciação Sexual

Durante a reprodução humana é fundamental que o desenvolvimento embrionário envolva um conjunto de mudanças morfológicas sexuais essenciais para a distinção entre indivíduos femininos e masculinos. A determinação e diferenciação do sexo gonadal do embrião está dependente da expressão do gene *sex determining region Y* (SRY) presente no braço curto do cromossoma Y. Este gene codifica o fator de transcrição *testis-determining factor* (TDF) que tem a função de se ligar ao DNA de genes essenciais para iniciar o desenvolvimento sexual masculino, nomeadamente o desenvolvimento dos testículos (Sadler, 2016; Silverthorn, 2019).

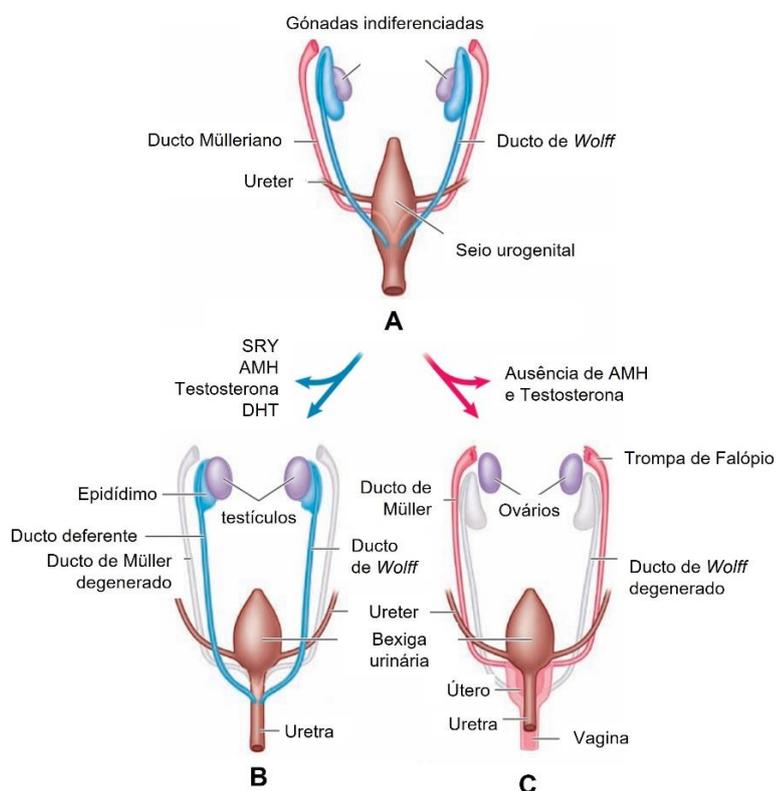


Figura I: Diferenciação sexual do trato reprodutivo humano no desenvolvimento embrionário. **A:** Representação esquemática do aparelho reprodutor indiferenciado. **B:** Desenvolvimento masculino, com regressão dos ductos de Müller e diferenciação dos ductos de Wolff. **C:** Desenvolvimento feminino, com regressão dos ductos de Wolff e diferenciação dos ductos de Müller. Adaptado de (Sherwood & Ward, 2019).

Após a diferenciação dos testículos, dá-se o início da segregação de hormonas como a hormona Anti Mülleriana (do inglês *Anti-Müllerian Hormone*, AMH), produzida pelas células de Sertoli e a hormona testosterona, libertada pelas células de Leydig. A hormona AMH será

responsável pela regressão dos ductos genitais de Müller no embrião masculino, e a hormona testosterona, em conjunto com a di-hidrotestosterona (DHT), atuará como um potenciador para o desenvolvimento dos ductos genitais de Wolff nas estruturas sexuais secundárias masculinas como os epidídimos, os ductos deferentes, os ductos ejaculatórios, as vesículas seminais, a próstata e ainda toda a genitália externa (Figura 1) (Sadler, 2016; Sharma et al., 2017).

Contrariamente, perante uma ausência do gene SRY, ocorre a formação e diferenciação dos folículos primordiais que darão origem aos futuros folículos ováricos. Sob ausência de testosterona, ocorre o desenvolvimento dos ductos de Müller que culminará na formação das trompas de falópio, do útero, do cérvix e da parte superior da vagina. Simultaneamente, a ausência da hormona AMH promove a regressão dos ductos de Wolff (Figura 1) (Sherwood & Ward, 2019).

2. O Sistema Reprodutor Masculino

O aparelho reprodutor masculino possui duas grandes funções, nomeadamente a produção de espermatozoides e a entrega do esperma ao trato reprodutor feminino. Este encontra-se organizado em órgãos primários que correspondem ao par de testículos e em órgãos secundários, que podem pertencer à genitália externa da qual faz parte o pénis e o escroto, ou à genitália interna, onde se encontra o trato reprodutivo organizado num sistema de ductos, nomeadamente dois epidídimos, dois ductos deferentes e a uretra. Também pertencem à genitália interna as glândulas sexuais anexas ou acessórias, especificamente as duas vesículas seminais, a próstata e as glândulas bulbouretrais (Figura 2) (Shier et al., 2018).

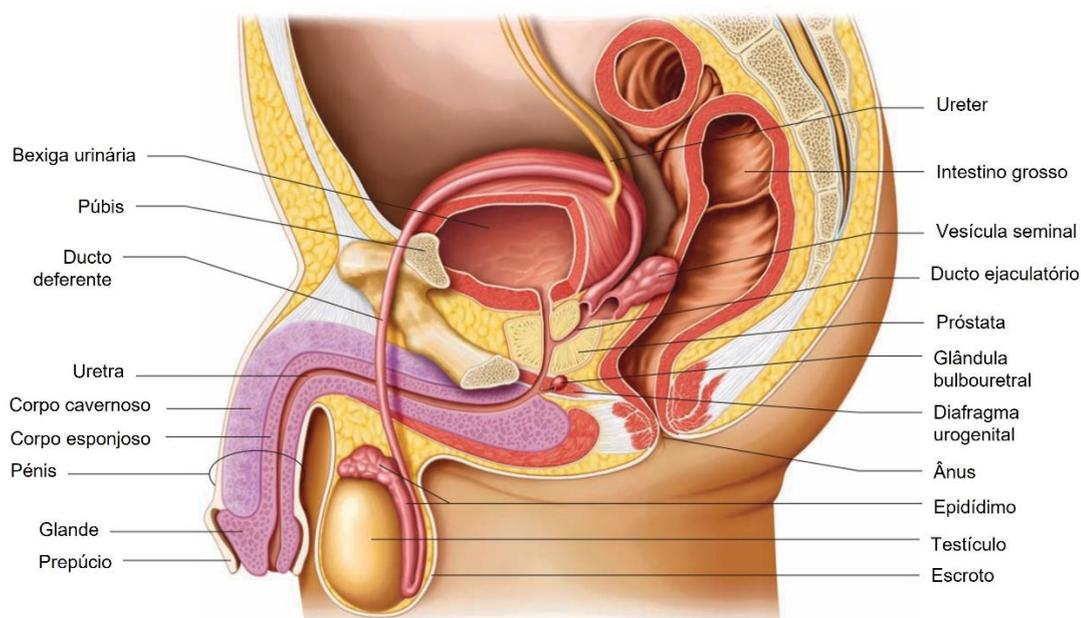


Figura 2: Secção sagital do aparelho reprodutor masculino, evidenciando os órgãos primários, os órgãos secundários com o sistema de ductos e as glândulas sexuais anexas. Adaptado de (Shier et al., 2018).

O escroto é um saco externo no qual os testículos se deslocam durante o desenvolvimento embrionário. O facto dos testículos se encontrarem fora do corpo humano permite que a

temperatura no interior das gónadas seja 2 a 3°C abaixo da temperatura corporal, essencial para a realização eficiente da espermatogénese, uma vez que este processo é considerado termo sensível (Silverthorn, 2019). A posição do escroto pode ser mediada através da contração reflexa dos músculos escrotais, que aproximam o escroto do abdómen perante um ambiente mais frio, e inversamente em ambientes mais quentes promovem um relaxamento deste órgão para que os testículos se afastem do corpo quente (Sherwood & Ward, 2019).

Os testículos são um par de estruturas ovoides que se encontram externos à cavidade abdominal, no interior do escroto. São revestidos por três túnicas, sendo que a túnica mais interna se encontra próxima de uma enorme rede de túbulos seminíferos compactados, local onde se dá a espermatogénese. Cada testículo encontra-se dividido através de septos e apresenta cerca de 250 lóbulos, podendo ter até 4 túbulos seminíferos cada (Shier et al., 2018). Estes túbulos convergem na *rede testis*, podendo observar-se intratubularmente um epitélio estratificado com células espermatogénicas em diversas etapas de desenvolvimento e células de Sertoli. No espaço peritubular é possível encontrar vasos sanguíneos, células do tecido conjuntivo, células de Leydig, fibroblastos, macrófagos e ainda células mioídes (Figura 3) (Neto et al., 2016; Silverthorn, 2019).

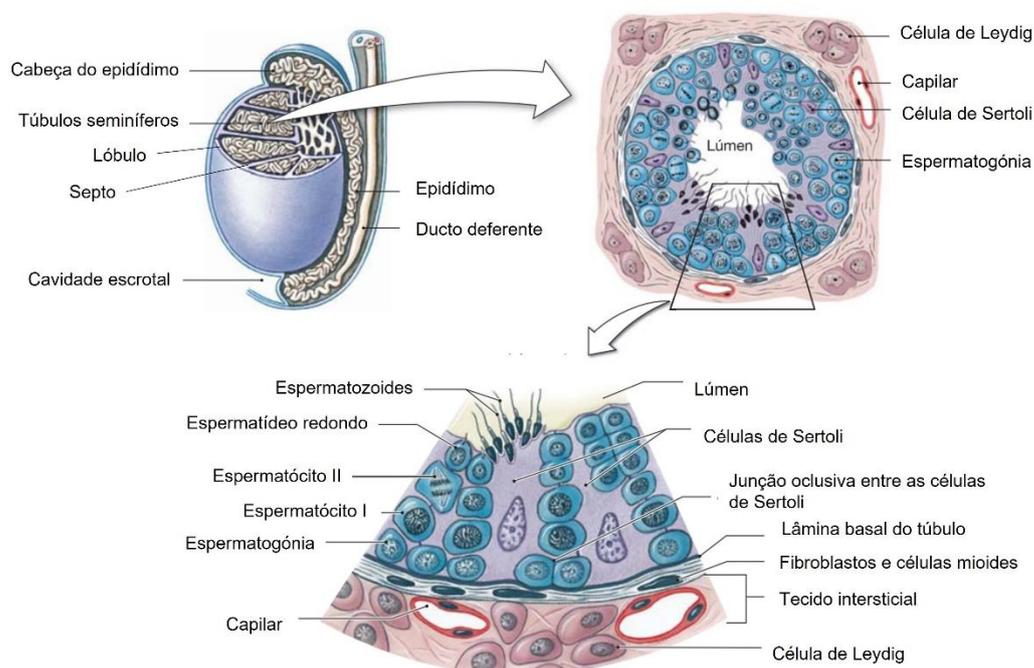


Figura 3: Esquema representativo do testículo e do interior dos túbulos seminíferos, com o respetivo desenvolvimento das células espermáticas, desde a lâmina basal até ao lúmen do túbulo seminífero. Adaptado de (Darszon et al., 2005).

Após o desenvolvimento da espermatogénese, os espermatozoides em conjunto com secreções das células de Sertoli são conduzidos ao epidídimo que se encontra na parte externa do testículo. Nesta etapa os espermatozoides são imóveis, pelo que se deslocam com o auxílio de movimentos peristálticos. Esta passagem epididimal pode durar 10 a 15 dias, sendo fundamental para que ocorra a maturação destas células, possibilitando que os espermatozoides adquiram motilidade e proteínas essenciais para fertilizar o ovócito, assim como obtenham uma maior resistência ao pH e à temperatura a que estão sujeitos durante todo o processo (Dhole & Kumar,

2017b; Shier et al., 2018). Simultaneamente, os cílios epididimais absorvem também o fluido testicular, assim como fagocitam espermatozoides anormais e corpos residuais remanescentes que não tenham sido removidos pelas células de Sertoli. Os espermatozoides ao saírem do epidídimo devem possuir uma motilidade rápida e progressiva, caracterizada por curvas lineares e simétricas com baixa amplitude. Seguidamente, dirigem-se pelos ductos deferentes, entrando na cavidade pélvica e terminando posteriormente à bexiga. É neste momento que os gâmetas masculinos se envolvem com as secreções das glândulas sexuais anexas, formando o esperma.

A próstata é uma glândula exócrina masculina composta por vários lóbulos que circundam a parte proximal da uretra. Esta é controlada hormonalmente e é essencial para a composição do esperma, nomeadamente com a sua contribuição de secreções prostáticas ácidas nutritivas para os espermatozoides, com especial ênfase na secreção do antigénio específico da próstata (do inglês, *Prostate Specific Antigen*, PSA), uma enzima que auxilia na liquefação do esperma, mantendo a capacidade de motilidade dos espermatozoides (Gupta & Kumar, 2017). Após a libertação do fluido espermático nos ductos deferentes, este alcança o líquido prostático e a secreção vinda da vesícula seminal, no ducto ejaculatório.

As vesículas seminais são um par de glândulas responsáveis por libertar o líquido seminal alcalino, capaz de neutralizar a acidez do trato reprodutor feminino. Já as glândulas bulbouretrais (ou glândulas de Cowper) são responsáveis por libertar um fluido incolor pré ejaculatório que auxilia na lubrificação do pénis em preparação para a relação sexual e também retira a acidez remanescente na uretra proveniente da urina (Shier et al., 2018).

O pénis é um órgão cilíndrico cuja função se baseia em depositar o esperma no aparelho reprodutor feminino e também transportar a urina para o exterior do corpo humano. Para tal, faz uso da uretra, um canal no seu interior rodeado pelo corpo esponjoso e pelos corpos cavernosos. Na sua extremidade é possível encontrar a glande e o prepúcio, uma zona que contém recetores sensoriais para a estimulação sexual. Na sua extremidade encontra-se o orifício da uretra (Figura 2) (Shier et al., 2018).

2.1. Espermatozoide

O espermatozoide é considerado a célula principal do sistema reprodutor masculino, pelo que no seu estado funcional deve apresentar-se com uma forma semelhante a um girino, com cerca de 50-60 μm de comprimento. É composto por uma cabeça oval, achatada e prolongada, uma peça intermédia cilíndrica e um flagelo alongado (Figura 4).

Na cabeça encontra-se o núcleo com DNA paterno, acompanhado na porção superior pelo acrossoma, essencial para a fertilização. Esta possui cerca de 4 μm de comprimento e encontra-se organizada, do interior para o exterior, em: núcleo, envelope nuclear, teca peri nuclear, acrossoma e membrana plasmática. O núcleo encontra-se altamente condensado, com o seu DNA envolvido maioritariamente em protaminas. O envelope nuclear compreende duas membranas, no entanto, durante a espermiogénese a sua espessura diminui de acordo com a condensação do núcleo. Possui

ainda uma porção excedentária que facilita a hiperativação do gâmeta, através do fornecimento de reservatórios intracelulares de cálcio (Sharma & Kumar, 2017).

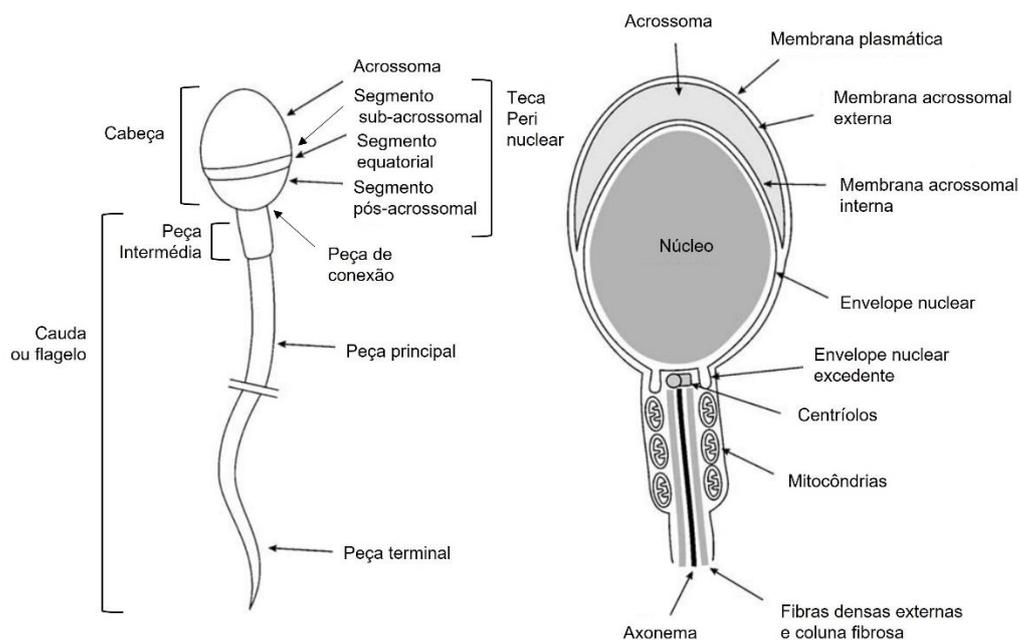


Figura 4: Representação estrutural do espermatozoide humano, evidenciando as suas partes principais, nomeadamente a cabeça, peça intermédia e cauda. Adaptado de (Darszon et al., 2005).

O acrossoma é derivado do complexo de Golgi durante a espermiogénese e constitui uma estrutura que protege a cabeça do espermatozoide. Encontra-se delimitado por duas membranas, pelo que a membrana mais externa sofre desintegração aquando da reação acrossómica (RA). No interior do acrossoma permanecem diversas enzimas hidrolíticas capazes de destruir as células da *corona radiata* e da zona pelúcida, permitindo assim que o espermatozoide penetre no ovócito. Mais especificamente, é possível encontrar acrosina, uma serina protease que auxilia na penetração da zona pelúcida através da sua lise, a acrogranina que atua na adesão à zona pelúcida, e ainda hidrolases ácidas e hialuronidases (Sharma & Kumar, 2017).

Exteriormente ao envelope nuclear está presente a teca peri nuclear, formada por proteínas que integram o citoesqueleto da cabeça espermática, dando-lhe estrutura. Encontra-se dividida em três segmentos: sub-acrossomal, equatorial e pós-acrossomal (Figura 4). Estes segmentos fundem-se com as membranas acrossomais e com a membrana plasmática do espermatozoide, sendo considerados importantes uma vez que possuem recetores que irão ligar a cabeça do espermatozoide à zona pelúcida do ovócito, e ainda proteínas de sinalização que irão potenciar o início do desenvolvimento do zigoto, nomeadamente através da ativação do ovócito para que seja retomada a divisão meiótica, ocorra a formação dos pronúcleos e se dê inibição da polispermia (Sharma & Kumar, 2017).

A cauda ou flagelo é essencial para o movimento espermático, sendo fina e extensa, pelo que possui um esqueleto central, o axonema. Este consiste num conjunto de microtúbulos organizados num sistema de 9+2, sendo 9 dupletos exteriormente e 2 microtúbulos na zona central, que se interligam pelo raio radial. Cada um destes microtúbulos é formado por

heterodímeros α e β da proteína tubulina. Quando estas se associam formam os protofilamentos (Gilbert & Barresi, 2020). Os microtúbulos dos dupletos possuem filamentos de tubulina de forma desigual, um com 11 filamentos e outro com 13 filamentos. Aos dupletos está ligada a proteína dineína, uma ATPase que hidrolisa a adenosina trifosfato (ATP) e produz uns prolongamentos que ao se moverem geram a força e energia mecânica necessária para o movimento dos restantes dupletos, causando o movimento ao flagelo (Figura 5) (Sharma & Kumar, 2017).

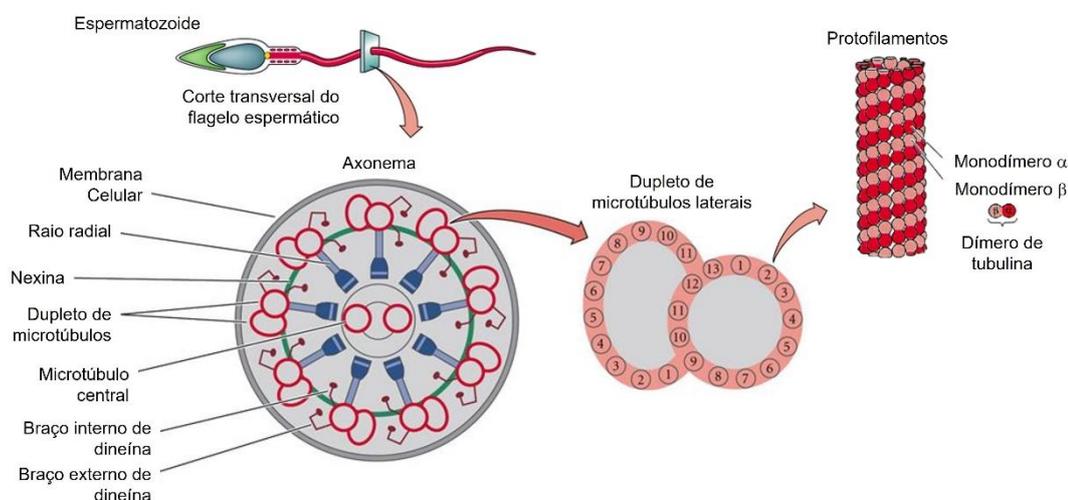


Figura 5: Corte transversal de um flagelo espermático, evidenciando o interior do axonema, com o seu sistema 9+2 de microtúbulos e respetiva composição dos protofilamentos de tubulina. Adaptado de (Gilbert & Barresi, 2020).

Exteriormente, o axonema é protegido por fibras densas, e mais externamente por uma coluna fibrosa, que fornece rigidez e resistência à cauda (Shier et al., 2018). As fibras densas são formadas durante a espermiogénese e incorporam no seu interior iões zinco, proveniente maioritariamente da secreção prostática. Durante a maturação do espermatozoide no epidídimo, mais de 60% do zinco intracelular é removido, tomando estas fibras densas mais rígidas. Tal acontecimento está associado aos movimentos progressivos do espermatozoide em forma de chicote. A eliminação dos iões zinco é um passo essencial para o gâmeta adquirir motilidade progressiva (Sharma & Kumar, 2017).

O flagelo possui quatro estruturas que rodeiam o axonema, detalhadamente: a peça de conexão, a peça intermédia, a peça principal e a peça terminal (Figura 4). A peça de conexão possui 0,5 μm de comprimento, encontra-se ligada à membrana externa do envelope nuclear e é responsável por ancorar as fibras densas à base do flagelo. Nela estão presentes os centríolos proximal e distal do espermatozoide. Os centríolos, em conjunto com a matriz pericentriolar, formam o centrossoma masculino. Esta estrutura é importante na ativação do desenvolvimento, visto que as proteínas do centrossoma masculino se fundem com as proteínas do centrossoma feminino, formando um conjunto de microtúbulos conhecido como áster. O áster é necessário para orientar os movimentos e a união dos pronúcleos feminino e masculino. Defeitos ao nível do centrossoma espermático poderão culminar em infertilidade masculina (Sharma & Kumar, 2017).

A peça intermédia é uma estrutura com 7 μm de comprimento, que no seu interior possui o axonema rodeado por uma bainha mitocondrial que forma uma hélice estrutural com várias mitocôndrias condensadas. Esta bainha é responsável por fornecer energia para que o espermatozoide se mova ao longo do trato genital feminino. A peça principal é o segmento mais longo, com 40 μm de comprimento e é composta por duas colunas fibrosas a rodear as fibras densas e o axonema. Por fim, a peça terminal constitui 5 a 7 μm de comprimento do total da cauda (Sharma & Kumar, 2017). O espermatozoide é caracterizado por possuir o mínimo citoplasma possível, uma vez que esta célula apesar de carregar o material genético consigo, requer uma elevada compactação para que se consiga movimentar de forma eficaz (Sherwood & Ward, 2019).

2.2. Espermatogénese

A formação de um espermatozoide implica uma complexa variedade de processos, todos necessários para obtenção deste gâmeta no seu estado maduro e funcional. A produção de espermatozoides, denominada espermatogénese, é um processo cíclico, com duração aproximada de 42-76 dias/ciclo, tendo início na puberdade e prolongando-se até à morte do indivíduo (Neto et al., 2016). Esta ocorre em colunas, desde a zona mais externa do túbulo seminífero até ao lúmen e pode ser dividida em 4 etapas, nomeadamente: a fase proliferativa, a fase meiótica, a espermiogénese e a espermiacção (Dhole & Kumar, 2017a).

As células germinativas que se formam na vida intrauterina são consideradas células indiferenciadas, sendo que aquando do nascimento de um indivíduo do sexo masculino estas proliferam por mitose, aumentando em número, originando as espermatogónias. Seguidamente, estas mesmas células interrompem o processo de mitose, e em conjunto com as gónadas mantêm-se quiescentes até ao período da puberdade, momento em que a mitose das espermatogónias é retomada (Neto et al., 2016).

Nesta etapa do desenvolvimento masculino podem observar-se dois tipos de células na zona basal dos túbulos seminíferos: as espermatogónias de tipo A e de tipo B. As espermatogónias tipo A são responsáveis pela sua própria manutenção e contínua proliferação através da mitose, enquanto as espermatogónias de tipo B são responsáveis por proliferar em espermatócitos primários. Desta forma, a espermatogénese é assegurada durante toda a vida do indivíduo. As células germinativas encontram-se em contacto próximo com as células de Sertoli, células de formato irregular e comprido que possuem ramificações citoplasmáticas aptas para envolver as células germinativas e potenciar a sua migração durante as diferentes fases da espermatogénese. (Figura 3 e Figura 6) (Neto et al., 2016).

Estas células ramificadas encontram-se unidas umas às outras por junções oclusivas contínuas (do inglês *tight junctions*) que permitem dividir o interior do túbulo seminífero em dois compartimentos: a zona Basal e a zona Adluminal. As espermatogónias e espermatócitos primários permanecem na zona basal, pelo que todos os estágios consequentes de diferenciação se apresentam na zona adluminal, não tendo contacto com a zona basal. Esta diferença de zonas criada pelas células de Sertoli designa-se Barreira Hemato Testicular (BHT), sendo a sua presença essencial

para o ambiente seguro e estável em que se dá a espermatogênese, nomeadamente para a prevenção da entrada de toxinas e moléculas de elevado peso molecular nos túbulos, e ainda torna as células espermatogénicas imunoprotégidas, uma vez que as espermatogónias e os espermatócitos possuem antigénios que podem ser reconhecidos como *non-self* e desencadear uma resposta imune. Desta forma, a BHT impede a entrada de leucócitos e anticorpos no compartimento adluminal. Esta barreira está em constante transformação, sendo bastante flexível para permitir a passagem das células germinativas do compartimento basal para o adluminal, através da constante quebra e recuperação das junções oclusivas (Dhole & Kumar, 2017a). Devido à existência desta barreira e da lâmina basal, o líquido luminal possui uma composição muito distinta do líquido intersticial, apresentando baixas concentrações de glicose e elevadas concentrações de hormonas esteroides (Silverthorn, 2019).

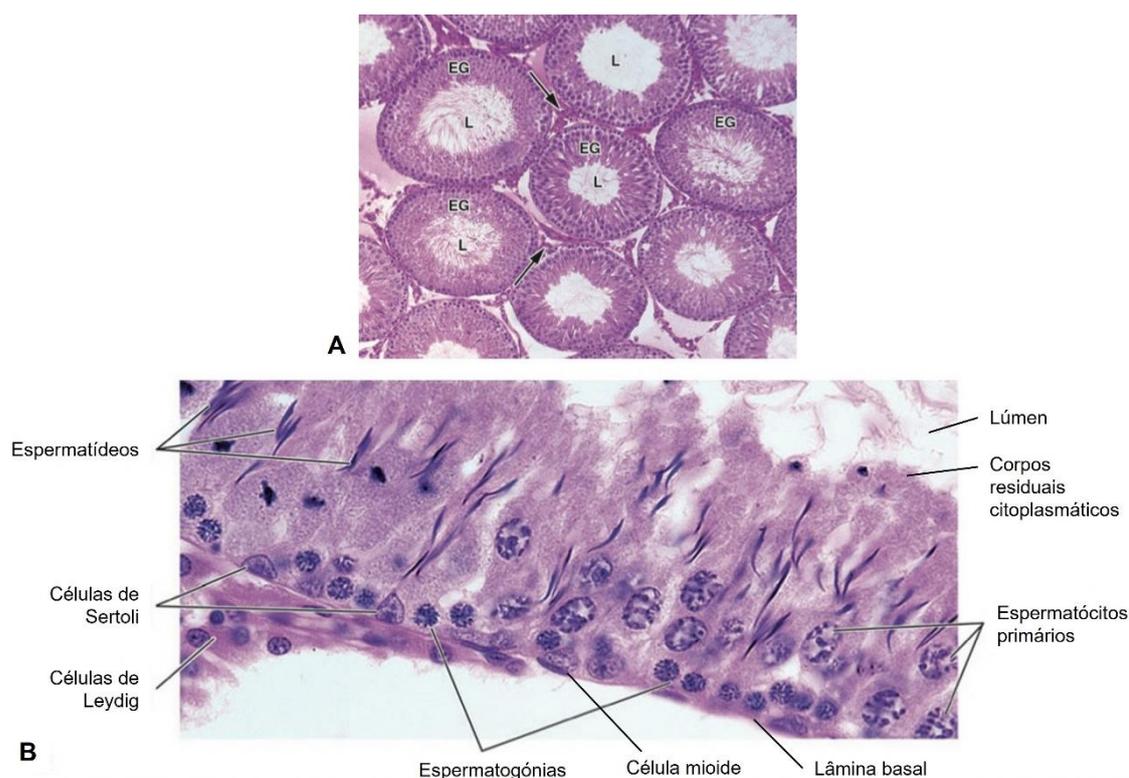


Figura 6: **A.** Túbulos seminíferos do testículo. Pode visualizar-se o epitélio germinativo (EG) contendo as células espermatogénicas nas diversas etapas de desenvolvimento e o lúmen dos túbulos (L). Tecido intersticial assinalado com a seta. Fotomicrografia corada com Hematoxilina-Eosina sob objetiva de pequeno aumento (4X). **B.** Espermatogênese. Na base do túbulo seminífero encontram-se espermatogónias e células de Sertoli. Os espermatídeos na fase da espermiogénese apresentam-se com um núcleo denso e alongado. Fotomicrografia corada com Hematoxilina-Eosina sob objetiva de grande aumento (40X). Adaptado de (Junqueira & Carneiro, 2013).

Além da criação da BHT, as células de Sertoli apresentam diversas outras funções, nomeadamente a produção da hormona AMH durante o desenvolvimento embrionário, a conversão da hormona testosterona em DHT, a segregação de inibina e ainda a nutrição dos espermatozoides. A segregação da proteína de ligação a androgénios (do inglês *Androgen Binding Protein*, ABP) é uma função essencial destas células, uma vez que permite regular a biodisponibilidade da testosterona no lúmen dos túbulos seminíferos, mantendo uma concentração

elevada desta hormona essencial para a espermatogénese, uma vez que esta hormona facilmente se difunde na membrana plasmática. Atuando como macrófagos, as células de Sertoli possuem também a capacidade fagocitar espermatogónias após longos períodos de abstinência sexual ou mesmo detritos resultantes da espermatogénese. Este mecanismo de proteção é considerado relevante pois a presença de células mortas no lúmen dos túbulos leva à libertação de conteúdos nocivos que afetam negativamente a produção de espermatozoides (Neto et al., 2016).

Através da divisão mitótica das espermatogónias tipo B, são obtidos espermatócitos primários que atravessam a BHT para a zona adluminal e procedem à duplicação do DNA como preparação para a entrada em meiose. Da primeira divisão meiótica resultam dois espermatócitos secundários, com o conteúdo cromossómico reduzido para metade e na segunda divisão são obtidos um total de quatro espermatídeos redondos haploides (Silverthorn, 2019). Todas as divisões celulares desde o estado de espermatócito primário até espermatídeo são incompletas, uma vez que as células partilham material citoplasmático, permanecendo ligadas umas às outras para que se dê um desenvolvimento síncrono (Figura 6) (Junqueira & Carneiro, 2013).

Seguidamente, os espermatídeos entram na fase da Espermiogénese, que corresponde à etapa final de diferenciação dos espermatídeos redondos, que vão ficando mais alongados dando origem a espermatozoides maduros. O objetivo desta etapa baseia-se em transformar o espermatídeo numa célula apta que seja libertada no lúmen do túbulo seminífero, e para tal acontecer ocorrem diversas transformações morfológicas, como forma de tornar esta célula menos volumosa e facilitar o seu movimento.

Inicialmente, o DNA deixa de estar envolvido em histonas para ser rodeado por proteínas de transição, que posteriormente serão substituídas por protaminas, proteínas de reduzido peso molecular que condensam eficazmente a cromatina do espermatozoide, reduzindo o seu volume celular e tomando a sua cabeça mais hidrodinâmica. Por um lado, a atividade de transcrição desta célula vai diminuindo com o evoluir da espermiogénese, devido à elevada compactação nuclear, no entanto cerca de 5-10% do DNA manter-se-á envolvido em histonas, e crê-se que contribui para a expressão proteica de genes essenciais para o desenvolvimento embrionário numa fase inicial, após fertilização. Quando o espermatozoide penetra o ovócito e entra no ooplasma, as protaminas são substituídas por histonas fornecidas pelo ovócito, e caso ocorra algum erro nesta substituição, pode ser reparado pelo ovócito, no entanto, se os danos excederem a capacidade de reparação do gâmeta feminino, poderá evidenciar-se um caso de infertilidade (Chohan et al., 2006; Hao et al., 2019; Rathke et al., 2013).

Ainda no núcleo, ocorre a formação do acrossoma através de grânulos do complexo de Golgi. Simultaneamente, centríolos migram para a superfície da célula no pólo oposto, onde ocorre a formação do axonema, com o conjunto de microtúbulos que formam o eixo central do flagelo. Ocorre uma acumulação de mitocôndrias na zona proximal do flagelo que constituirá a peça intermédia. Consecutivamente, dá-se a fagocitose do citoplasma desnecessário pelas células de Sertoli e a ocorre uma reorientação do espermatídeo, cujo núcleo se localiza em direção à lâmina basal do túbulo seminífero, permitindo a extensão do flagelo para o lúmen do túbulo (Hao et al.,

2019; Junqueira & Carneiro, 2013). Neste momento, os espermatozoides apresentam-se com uma morfologia completamente diferente do estado de diferenciação anterior, sendo compactos e móveis, pelo que em conjunto com o fluído testicular presente no lúmen dos túbulos seminíferos são encaminhados para o epidídimo, um processo denominado espermição (Dhole & Kumar, 2017a).

2.3. Regulação Hormonal

O desenvolvimento sexual e a reprodução masculina são controlados pelo sistema nervoso e endócrino, através da interação entre o hipotálamo, a hipófise e os testículos, mediante mecanismos de feedback (Figura 7).

Os testículos possuem a função de produzir espermatozoides e segregar testosterona, com o auxílio das células de Leydig. Esta hormona esteroide deriva da molécula precursora de colesterol, podendo ser também produzida em reduzidas quantidades pelos ovários nas mulheres e pelas glândulas adrenais. Uma vez produzida, parte é libertada na corrente sanguínea com destino aos seus locais de ação, sendo outra porção direcionada para o lúmen dos túbulos seminíferos como forma de induzir a espermatogénese. A testosterona pode atuar de diversas formas, nomeadamente antes do nascimento, em que a produção de testosterona no embrião promove a masculinização do trato reprodutor e da genitália externa, assim como impulsiona a descida dos testículos para o escroto. Depois do nascimento, a secreção desta hormona cessa, considerando-se o indivíduo reprodutivamente imaturo (Sherwood & Ward, 2019).

Por volta dos 13 a 15 anos de idade, os rapazes entram na fase de maturação sexual, denominada puberdade, que culmina na capacidade de reprodução. Esta mudança endócrina, psicológica e comportamental é estimulada pela incrementação da secreção de testosterona, que resulta no aumento do tamanho e maturação das gónadas, no desenvolvimento das características sexuais secundárias, na produção de gâmetas e ainda no desenvolvimento da libido sexual. Nesta altura podem evidenciar-se características como: o aumento do crescimento de pelos corporais; o alargamento da laringe e espessamento da voz; o alargamento dos ombros; o aumento da massa muscular e o fortalecimento dos ossos (Sherwood & Ward, 2019; Shier et al., 2018). Posteriormente à etapa da puberdade, o processo cíclico da produção espermática é mantido ao longo da vida do indivíduo, pelo que a secreção contínua de testosterona é essencial para a manutenção do trato reprodutor e para a espermatogénese (Shier et al., 2018).

O Hipotálamo é responsável pela libertação pulsátil do Fator Libertador de Gonadotropinas (do inglês *Gonadotropin-Releasing Hormone*, GnRH), que através da corrente sanguínea alcança a hipófise. Em resposta, a hipófise anterior segrega as gonadotropinas lúteo-estimulante (*Luteinizing Hormone*, LH) e folículo-estimulante (*Follicle-Stimulating Hormone*, FSH) na corrente sanguínea. A hormona LH atua nas células de Leydig dos testículos, promovendo a libertação da testosterona, já a hormona FSH atua nas células de Sertoli, estimulando a espermatogénese, sendo ainda responsável por aumentar a aromatização da testosterona, convertendo-a em estradiol no interior das células de Sertoli (Silverthorn, 2019).

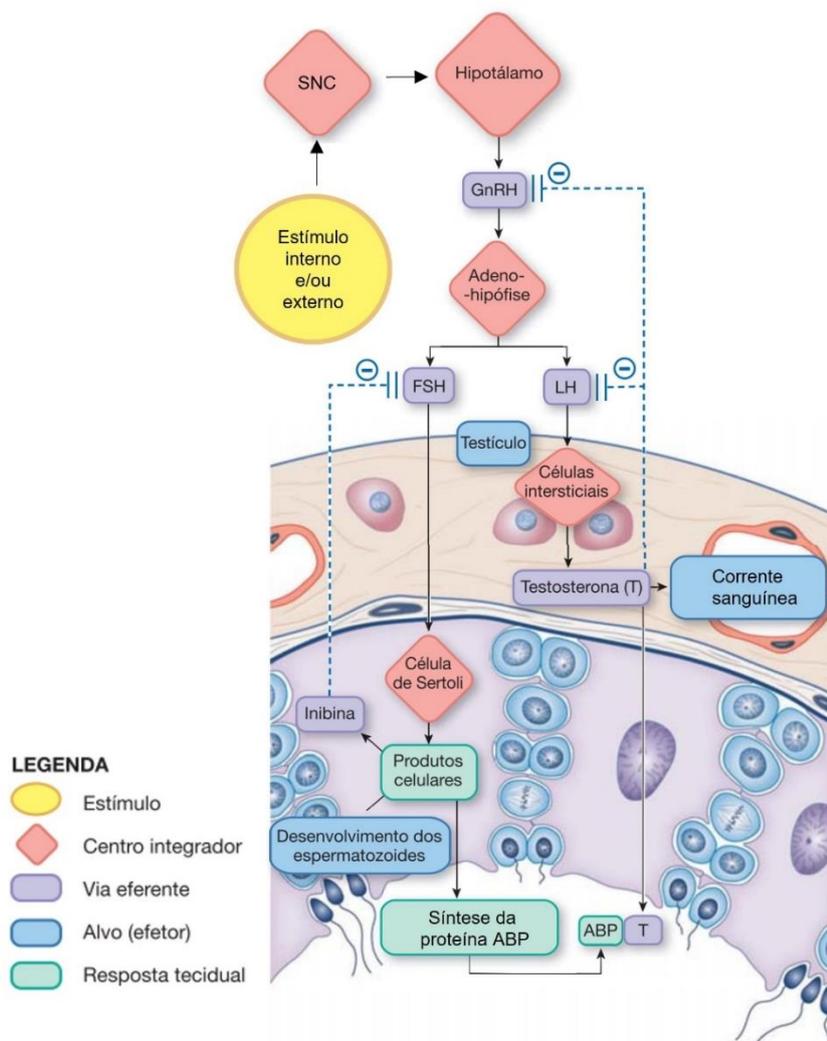


Figura 7: Esquema ilustrado da regulação hormonal realizada no sistema reprodutor masculino, nomeadamente o eixo Hipotálamo-Hipófise-Testículo. O sistema nervoso central (SNC) perante estímulos internos ou ambientais provoca uma ação no hipotálamo, desencadeando ações sobre a hipófise anterior. São segregadas gonadotropinas cuja atuação na gónada masculina provoca o desenvolvimento da espermatogénese e a libertação de hormonas. Mecanismo de feedback negativo indicado a tracejado azul, fruto da ação das hormonas testosterona e inibina, nas hormonas LH, FSH e GnRH. Adaptado de (Silverthorn, 2019).

A produção destas gonadotropinas é regulada pela GnRH e pelas hormonas produzidas a nível testicular nomeadamente a testosterona, inibina, estradiol e DHT. Perante uma concentração excessiva destas hormonas, ocorre uma inibição ao nível do hipotálamo por ação da testosterona, nomeadamente com a estimulação de péptidos opióides de neurónios hipotalâmicos conhecidos por inibir a libertação pulsátil de GnRH, resultando na interrupção da produção de FSH e LH. Já a inibina suprime a secreção de FSH, atuando a nível hipofisário. Consecutivamente, todo este mecanismo de feedback negativo culmina numa redução da produção de espermatozoides e nos níveis de testosterona, estradiol e inibina (Nandedkar, 2017a). Contrariamente, uma concentração de testosterona sanguínea mais reduzida induzirá a produção e libertação das hormonas GnRH, LH e FSH, uma vez que as glândulas endócrinas deixam de estar inibidas. Desta forma, o nível de testosterona é controlado, permitindo a homeostasia do funcionamento do sistema reprodutor masculino (Figura 7).

2.4. Esperma

Durante a excitação sexual masculina, ocorre um estímulo ao nível do sistema parassimpático que desencadeia um aumento do fluxo sanguíneo no tecido erétil peniano, resultante da dilatação das artérias. Desta forma, o aumento da pressão arterial provoca uma compressão das veias penianas, reduzindo o fluxo de sangue venoso para o sistema periférico, e conseqüentemente uma acumulação sanguínea no tecido erétil do pênis, desencadeando uma ereção (Shier et al., 2018). Aquando do orgasmo, o sistema nervoso autónomo simpático atua provocando contrações musculares rítmicas e involuntárias nas paredes dos órgãos internos e externos do aparelho reprodutor, preparando-os para a libertação de esperma através do fenómeno de ejaculação (Van Ahlen & Kliesch, 2010).

Para que ocorra o estímulo deste percurso, dá-se a libertação da hormona ocitocina pela hipófise posterior, com o objetivo de estimular a contração dos epidídimos e dos túbulos seminíferos, auxiliando o movimento dos espermatozoides. Toda esta sequência de eventos é antecipada por ação das glândulas bulbouretrais que segregam um fluido pré-ejaculatório incolor e viscoso contendo soluções-tampão que visam neutralizar a acidez, garantindo a viabilidade dos espermatozoides aquando da sua libertação (Shier et al., 2018). Após ejaculação, o sistema simpático atua na contração das artérias penianas, reduzindo o fluxo sanguíneo para o órgão através do aumento do fluxo sanguíneo venoso para o exterior do tecido erétil peniano, causando uma redução do volume do pênis, permitindo que este retorne ao seu estado flácido (Sherwood & Ward, 2019).

O esperma humano consiste num fluido extraordinariamente nutritivo, pelo que cerca de 95% da sua composição corresponde a secreções das glândulas sexuais anexas, testículos e epidídimos, o denominado líquido seminal, e apenas 5% aos gâmetas masculinos. O maior contributo com 60-75% das secreções são originadas nas vesículas seminais, 25-30% com origem na próstata, 5-10% provenientes dos testículos e dos epidídimos e uma pequena contribuição das glândulas bulbouretrais, com 1-5% do total do ejaculado (Evenson & Wixon, 2006; World Health Organization, 2021).

Durante a ejaculação, o esperma é depositado na proximidade do cérvix em forma de coágulo, permitindo que os espermatozoides fiquem aderidos às paredes vaginais. A libertação do esperma ocorre de forma fracionada, sendo expelidas: primeiramente as secreções das glândulas bulbouretrais; as secreções provenientes dos epidídimos e da próstata, que compõem a fração com maior concentração de espermatozoides em todo o ejaculado; e por último o fluido vesicular seminal, que corresponde à maior fração libertada (Gupta & Kumar, 2017). Os constituintes do líquido seminal não se consideram essenciais para a fertilização, no entanto são essenciais no transporte e maturação dos espermatozoides para que este seja capaz de fertilizar o ovócito (Tabela 1) (Sherwood & Ward, 2019).

Tabela I: Compostos principais das secreções presentes no líquido seminal, provenientes das glândulas sexuais anexas e epidídimos. Adaptado de (Gupta & Kumar, 2017).

Origem	Composto secretado	Função
Epidídimos	Fosforilcolina	Composto energético espermático.
Próstata	Ácido cítrico	Atua no equilíbrio osmótico e eletrolítico do esperma.
	Fosfatase prostática ácida	Enzima que hidrolisa compostos energéticos como fosforilcolina.
	PSA	Protease que atua na liquefação do coágulo espermático após ejaculação, podendo estar na sua forma ativa ou inativa, consoante a sua ligação a inibidores.
	Iões zinco	Regulam a liquefação e possuem atividade antibacteriana.
Vesículas Seminais	Frutose	Fonte de energia para os espermatozoides no esperma.
	Semenogelinas	Proteína envolvida na coagulação do esperma e na ativação da hialuronidase espermática.
	Prostaglandinas	Proteínas que induzem contrações na musculatura lisa dos tratos genitais feminino e masculino, facilitando o transporte dos espermatozoides.
	Lípidos (colesterol + fosfolípidos)	Auxiliam na estabilização dos espermatozoides perante mudanças ambientais como a alteração da temperatura.

Após ejaculação, as semenogelinas e a fibronectina, proteínas provenientes das vesículas seminais, agregam-se e formam uma massa gelatinosa semelhante a um coágulo, que é posteriormente liquefeito 5 a 30 minutos após ejaculação (Jonsson et al., 2005). A formação deste coágulo espermático é potenciada pelos iões zinco presentes no esperma. Inicialmente, grande parte dos iões de zinco presentes na próstata encontram-se ligados à PSA, tornando esta protease inativa, no entanto, quando todas as frações do esperma se misturam e sabendo que estes iões possuem uma maior afinidade com as semenogelinas, estes ligam-se preferencialmente a estas proteínas após a ejaculação. Tal ligação desencadeia uma mudança conformacional nas semenogelinas, que formam um complexo proteico insolúvel, originando o coágulo (Figura 8) (Gupta & Kumar, 2017).

As concentrações de zinco envolvente diminuem, pelo que a PSA deixa de estar inibida, passando à sua forma livre e ativa, capaz de iniciar o seu processo de clivagem das semenogelinas, resultando na liquefação do coágulo espermático e favorecendo assim a motilidade dos espermatozoides móveis no ejaculado. Uma vez que as semenogelinas são quebradas em pequenos fragmentos, a quantidade de iões zinco circundante aumentará, pelo que a PSA voltará a ter a sua atividade inibida, impedindo a continuação de proteólise (Jonsson et al., 2005).

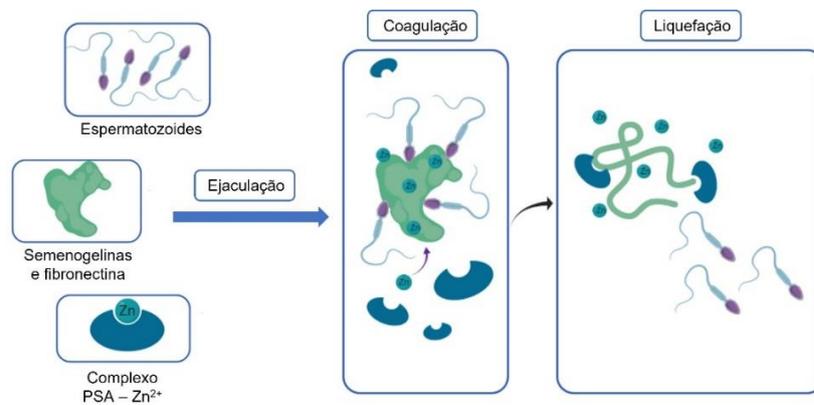


Figura 8: Representação esquemática do processo de coagulação e liquefação do esperma humano. Adaptado de (Ferreira, 2020; Gupta & Kumar, 2017).

O mecanismo de coagulação e liquefação espermática após ejaculação torna-se essencial para permitir que os espermatozoides se movam dentro do trato genital feminino, evitando que estes sejam expulsos do trato reprodutor após a saída do pênis e aumentando assim, a capacidade de fertilização. Um processo incompleto ou ausente de liquefação espermática está correlacionado com uma reduzida hipótese de fertilização (Gupta & Kumar, 2017).

2.5. Maturação espermática

Durante o seu percurso nos tratos genitais, os espermatozoides são sujeitos a modificações estruturais, funcionais e bioquímicas, fruto dos diversos meios extracelulares que experienciam. A maturação destas células engloba a etapa de espermiogénese nos testículos, a maturação ao nível do epidídimo, e ainda durante a sua passagem pelo trato genital feminino. A maturação epididimal diz respeito à segregação de proteínas por parte dos epidídimos através de epididimossomas que se fundem com a membrana do espermatozoide, desencadeando mudanças nas suas proteínas de superfície e alterações membranares. As proteínas adquiridas estão envolvidas nos mecanismos de capacitação, reação acrossómica e na interação entre gâmetas (Gupta & Kumar, 2017).

Os espermatozoides ao passarem pelos epidídimos adquirem fatores decapacitantes, como forma de prevenir o gâmeta masculino de sofrer precocemente alguns dos processos da fertilização. No entanto a remoção destes fatores ocorre durante a passagem do gâmeta no trato genital feminino. Após ejaculação, os espermatozoides sofrem um processo de maturação denominado capacitação, caracterizado por modificações estruturais, moleculares e funcionais, cujo objetivo assenta em tornar os espermatozoides competentes para fecundar o gâmeta feminino. Esta etapa é essencial para o sucesso da fertilização, uma vez que espermatozoides não capacitados são incapazes de fertilizar o ovócito. A capacitação envolve vários acontecimentos, designadamente: alterações lipídicas e movimentos iónicos na membrana plasmática do espermatozoide; e a fosforilação de tirosinas em proteínas envolvidas na hiperativação e reação acrossómica (Deshmukh & Siva, 2017).

Inicialmente, a proteína albumina presente nas secreções do trato genital feminino provoca a remoção do colesterol presente na membrana do espermatozoide, tornando esta membrana mais

fluída para a reação acrossômica. Esta remoção promove a entrada de íons bicarbonato (HCO_3^-) para o interior do citoplasma espermático, criando um aumento do pH intracelular. Dá-se então a saída de potássio (K^+) do interior do gâmeta, causando hiperpolarização da membrana, com um potencial de membrana cada vez mais negativo. Esta mudança na dinâmica membranar provoca a abertura dos canais de cálcio (Ca^{2+}), permitindo a entrada deste íon para o meio intracelular (Nandedkar, 2017b). Em conjunto, os íons HCO_3^- e Ca^{2+} promovem a ativação da Adenilato Ciclase (AC), uma enzima que faz uso de ATP e o converte em adenosina monofosfato cíclico (cAMP). O aumento de cAMP, para além de manter o influxo de Ca^{2+} , permite a ativação da proteína cinase A (PKA), que irá potenciar a fosforilação de tirosinas de várias proteínas presentes na cabeça e no flagelo do espermatozoide. Como resultado desta modificação pós traducional, ocorre uma exposição dos recetores de superfície do espermatozoide, que facilitarão a fusão da membrana plasmática com o acrossoma durante a reação acrossômica, e com a membrana do ovócito no momento da fusão dos gâmetas (Figura 9) (Gilbert & Barresi, 2020; Gupta & Kumar, 2017).

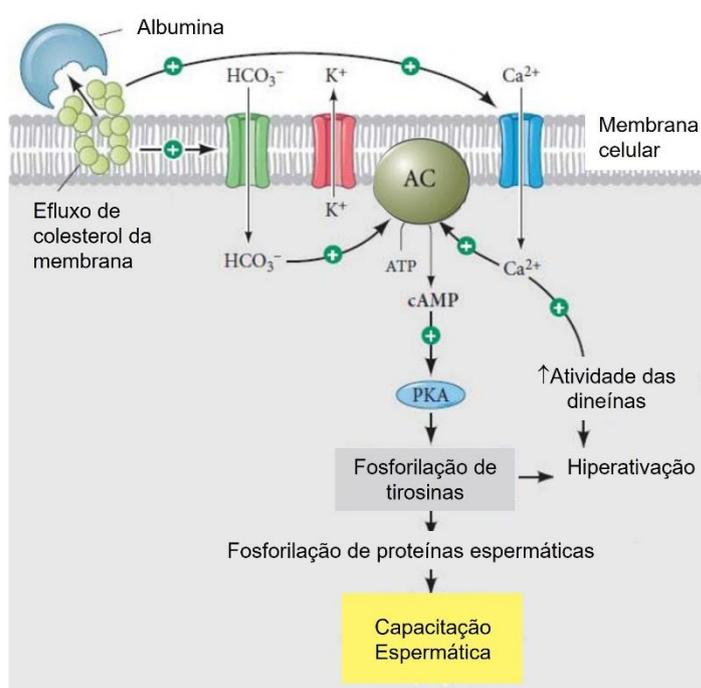


Figura 9: Capacitação espermática em mamíferos. A remoção de colesterol da membrana promove a entrada de HCO_3^- e Ca^{2+} . Em conjunto com o efluxo de potássio (K^+), estas alterações provocam uma mudança no potencial membranar do gâmeta masculino. A ativação da AC promove a produção de cAMP, que ativa a PKA e promove a fosforilação de proteínas quinases, culminando na fosforilação de proteínas espermáticas essenciais para a hiperativação e reação acrossômica. Adaptado de (Gilbert & Barresi, 2020).

A concentração intracelular de íons Ca^{2+} também é responsável pelo aumento da atividade das dineínas presentes no flagelo do espermatozoide, que ao serem fosforiladas iniciam a hiperativação, um processo caracterizado por uma mudança do movimento progressivo simétrico para um padrão de motilidade circular assimétrico, com um aumento de movimentos laterais da cabeça e batimentos rápidos e contorcidos por parte do flagelo, em forma de chicote. Esta hiperativação é essencial para os espermatozoides atravessarem o fluído presente no trato genital feminino e penetrarem na zona pelúcida do ovócito, sendo mantida pelo influxo contínuo de Ca^{2+}

e pela estimulação de ATPases dependentes de cálcio ao longo de toda a cauda dos espermatozoides (Sharma & Kumar, 2017).

3. Interação entre os gâmetas feminino e masculino

A fertilização é dada como o processo de fusão entre os gâmetas feminino e masculino, que corre de forma natural na ampola da trompa de falópio com o objetivo de produzir o zigoto, a primeira célula do embrião, que resulta da interligação entre o material genético materno e paterno. Para tal, o espermatozoide necessita de ultrapassar as três barreiras essenciais do ovócito, nomeadamente: as células do *cumulus oophorus*, a zona pelúcida (ZP) e a membrana plasmática ou oolema do ovócito, envolvendo: a reação acrossómica; o reconhecimento e penetração da zona pelúcida; a ligação e fusão da membrana do espermatozoide ao oolema; e a entrada do espermatozoide no ooplasma (Sharma & Kumar, 2017).

Após capacitação, os espermatozoides migram em direção ao ovócito para as trompas de falópio, fazendo uso da sua motilidade hiperativa, das contrações uterinas que facilitam o seu movimento e ainda através dos processos de termotaxia e quimiotaxia. A termotaxia engloba a capacidade de os espermatozoides capacitados detetarem mínimas oscilações de temperatura, tendo tendência a migrar para zonas com temperaturas mais elevadas, como a ampola da trompa de falópio, direcionando os gâmetas para o local de fertilização. A progesterona produzida pelas células do *cumulus oophorus* que rodeiam o ovócito também auxilia na orientação desta migração, assim como estimula a hiperativação (Gilbert & Barresi, 2020).

A reação acrossómica corresponde ao mecanismo de fusão entre a membrana acrossomal externa e a membrana plasmática do espermatozoide, que resulta na exposição do conteúdo interior do acrossoma, através da libertação de enzimas hidrolíticas capazes de degradar a ZP (Sharma & Kumar, 2017). No que diz respeito ao momento de ocorrência da RA, a população de espermatozoides atua de forma heterogénea. Inicialmente pensava-se que este processo ocorria quando o gâmeta contactava com a ZP através da glicoproteína ZP3, no entanto, estudos recentes revelaram que muitos dos espermatozoides iniciam a reação acrossómica antes do contacto com a ZP, quando ainda se localizam no istmo em direção à ampola (Siu et al., 2021). À medida que os espermatozoides se aproximam do ovócito, os elevados níveis de progesterona induzem a RA através da ativação dos canais de cálcio na membrana dos gâmetas, pelo que este influxo iónico promove a exocitose do acrossoma. Uma vez no *cumulus oophorus*, o espermatozoide alcança a ZP e liga-se a glicoproteínas presentes, sendo esta ligação específica para cada espécie. Espermatozoides capacitados que já tenham sofrido reação acrossómica ligam-se diretamente à glicoproteína ZP2, enquanto os gâmetas com o acrossoma intacto ligam-se à ZP3 e sofrem RA posteriormente, ligando-se depois à ZP2 (Gilbert & Barresi, 2020).

Após penetração na ZP, o espermatozoide atravessa o espaço peri vitelino e alcança o oolema do ovócito. Durante a RA ocorre também a exposição da membrana acrossomal interna, que se funde com o oolema na região do segmento equatorial. Esta fusão envolve várias proteínas,

nomeadamente a Izumo que se localiza na membrana acrossomal, e a Juno, uma proteína localizada no oolema. Estas proteínas ligam-se entre si e recrutam outras proteínas para formar um complexo de adesão. As membranas de ambos os gâmetas fundem-se, pelo que o espermatozoide entra inteiramente no ooplasma (Gilbert & Barresi, 2020).

Fruto da fusão membranar, ocorre um aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} que despoleta vários eventos referentes à ativação do ovócito, nomeadamente a reação cortical; a retoma da segunda divisão meiótica e a formação dos pronúcleos materno e paterno. Para evitar a polispermia, a reação cortical envolve a fusão de grânulos do interior do ovócito com o oolema. Estes grânulos libertam enzimas hidrolíticas que promovem o endurecimento da ZP e modificam as suas glicoproteínas como as ZP2 e ZP3, tomando-as não funcionais e incapazes de se ligarem a mais espermatozoides, prevenindo a sua entrada no gâmeta feminino. Complementariamente a este bloqueio ocorre a libertação de iões zinco para o exterior do ovócito, pelo que estes ao se ligarem à ZP inibem as enzimas acrossomais, assim como se dá a libertação da proteína Juno da superfície do oolema (Gilbert & Barresi, 2020).

Ocorre também a retoma e finalização da meiose feminina, com a extrusão do segundo corpúsculo polar (CP) para o espaço peri vitelino e a formação do pronúcleo materno, mediante os cromossomas que permanecem no ooplasma. O núcleo do espermatozoide expande-se através da descompactação da cromatina e a degradação do envelope nuclear, pelo que a consequente formação do pronúcleo paterno e materno envolve um novo envelope nuclear proveniente de vesículas do REL do ooplasma. Uma vez formados, ambos os pronúcleos migram para o centro do ovócito, mediante microtúbulos do áster, resultantes do centrossoma masculino. Após quebra dos envelopes nucleares, os cromossomas maternos e paternos orientados no fuso mitótico agrupam-se num processo denominado singamia, que resulta na formação do zigoto diploide cerca de 20-24 horas após a fusão dos gâmetas, sendo este processo tido como o culminar da fertilização (Gilbert & Barresi, 2020; Papale et al., 2012; Sathananthan, 2013).

4. A Infertilidade

4.1. Definição e Caracterização geral

É de conhecimento empírico que o termo Fertilidade se relaciona com a saúde reprodutiva de uma pessoa ou casal, no entanto esta envolve simultaneamente questões psicológicas, económicas e culturais que podem perpetuar o nervosismo e stress nos casais, especialmente se estes estiverem inseridos em sociedades que atribuam um grande valor sentimental e cultural à gravidez. Devido aos vários fatores envolvidos que potenciam o processo complexo e único da fecundação, quando comparados os humanos às demais espécies de mamíferos, em que a probabilidade de atingir gravidez se aproxima dos 100% a cada ciclo menstrual, é possível afirmar que na espécie humana existe uma maior dificuldade em procriar naturalmente. A fecundabilidade, definida como a probabilidade de obtenção de gravidez num único ciclo menstrual, apresenta-se

sob uma percentagem de sucesso bastante baixa para uma mulher saudável de 30 anos, de aproximadamente 20%, no entanto uma mulher de 40 anos tem ainda menos hipóteses de engravidar naturalmente a cada ciclo menstrual, com aproximadamente 5% de sucesso (Soares et al., 2011).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a infertilidade ou subfertilidade é considerada uma doença relacionada com o sistema reprodutivo, que se define como a incapacidade de um casal obter uma gravidez clínica após um mínimo de 12 meses de relações sexuais regulares e desprotegidas, ou devido a um comprometimento da capacidade de uma pessoa se reproduzir seja como indivíduo ou com o seu parceiro. Este período pode ser reduzido para 6 meses em casos de: mulheres que possuam mais de 35 anos; que tenham experienciado 3 ou mais abortos de repetição; que possuam um problema a nível do sistema reprodutor feminino que tenha sido detetado anteriormente; ou mesmo quando o parceiro já possui um perfil anterior de subfertilidade (World Health Organization, 2021; Zegers-Hochschild et al., 2017).

A infertilidade pode afetar de forma individual ou ambos os elementos de um casal em simultâneo, e pode ser categorizada como primária quando nunca se alcançou uma gravidez clínica anteriormente, ou secundária, no caso da existência prévia de uma gravidez (Vander Borgh & Wyns, 2018). Relativamente aos possíveis fatores que culminam em infertilidade, cerca de 20 a 30% dos casos são explicados com base em causas provenientes do indivíduo masculino, 20 a 35% através de causas fisiológicas na mulher, 25 a 40% dos casos são devido a problemas que afetam ambos os elementos do casal, e cerca de 10 a 20% resultam de uma infertilidade inexplicada, no qual a causa não foi identificada (ESHRE, 2022). Enquanto um diagnóstico de infertilidade apresenta uma maior dificuldade em procriar que pode ser revertida com o acompanhamento médico e tratamento adequados, a esterilidade é um diagnóstico que engloba um estado permanente de infertilidade (Zegers-Hochschild et al., 2017).

Como forma de identificar o fator de infertilidade conjugal, inicia-se o estudo do casal com a realização de uma anamnese a ambos, com especial foco em parâmetros como a idade, a profissão, a sua história reprodutiva, antecedentes médicos ou cirúrgicos, a existência de infertilidade na família, entre outros. Seguidamente é realizado o exame físico, que envolve a avaliação do desenvolvimento sexual, a anatomia genital e a existência ou não de sinais de patologia reprodutiva e são realizados exames sanguíneos para avaliação hormonal. De forma a facilitar a obtenção do diagnóstico, realizam-se ainda exames como o espermograma, ultrassonografias, ou mesmo análises genéticas, com vista na análise do cariótipo para despiste de potenciais anomalias cromossómicas ou ainda a pesquisa de microdeleções do cromossoma Y envolvendo genes relacionados com a produção dos espermatozoides (Garolla et al., 2021; Gonçalves, 2005). Esta metodologia de análise exaustiva é considerada de extrema importância, uma vez que permite selecionar a melhor abordagem terapêutica com o objetivo final de contornar a infertilidade, e ainda facilitar a gestão de expectativas em situações nas quais os tratamentos disponíveis não viabilizem a possibilidade de maternidade e paternidade biológica (Santos, 2013).

4.2. Prevalência e Impacto em Portugal e no Mundo

De acordo com a Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia, 1 em cada 6 casais no mundo sofre ou sofreu de infertilidade pelo menos uma vez durante a sua vida (ESHRE, 2022). Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que aproximadamente 8 a 12% dos casais em idade reprodutiva sofra de infertilidade, com mulheres em idades compreendidas entre os 20 e os 44 anos de idade, afetando cerca de 186 milhões de pessoas em todo o mundo (WHO, 2020). Já a nível nacional, a epidemiologia da infertilidade aparece caracterizada no estudo Afrodite realizado em 2009, tendo permitido inferir que a prevalência de infertilidade feminina ao longo da vida reprodutiva corresponde a aproximadamente 9%, englobando aproximadamente 300 mil mulheres portuguesas (Carvalho & Santos, 2009; WHO, 2020).

A infertilidade integra um alarmante problema de saúde pública do ponto de vista demográfico, na medida em que o número de nascimentos pode tornar-se insuficiente na compensação dos óbitos num país. Tal facto resulta numa diminuição da população jovem e um proporcional aumento da população envelhecida, situação atualmente visível em Portugal (INE, 2022b).

O Índice Sintético de Fecundidade (ISF), dado como o número total de nascidos vivos por cada mulher em idade fértil, é considerado um valor importante na avaliação da população. Para assegurar uma renovação populacional o ISF não deve ser inferior a 2,1 filhos por mulher, tendo em conta que os dois nascidos vivos substituem os pais e a fração de 0,1 é necessária para compensar os indivíduos que morrem antes de atingir a idade reprodutiva (INE, 2022a). Ao longo dos anos têm-se verificado valores mais elevados deste índice nos países subdesenvolvidos em contraste com os países desenvolvidos, pelo que fatores como o aumento da divulgação de campanhas contraceptivas, a implementação de medidas de planeamento familiar, a inserção da mulher no mercado de trabalho de forma igualitária aos homens, e até mesmo o progressivo aumento da urbanização, contribuem para esta diminuição.

Atualmente, a idade materna portuguesa aquando do nascimento do primeiro filho apresenta-se nos 30,9 anos, representando um impacto ainda maior para o contínuo decréscimo do ISF, uma vez que o declínio da fertilidade feminina começa a verificar-se a partir dos 25-30 anos, devido à diminuição do número e qualidade ovocitária com o aumento da idade (Figura 10) (Mendes et al., 2016; Vander Borgh & Wyns, 2018). A nível mundial, Portugal é considerado um dos países com o ISF mais baixo, sendo que em 1982 o ISF português cruzou o limiar de substituição das gerações, e até à atualidade esta tendência tem-se verificado com Portugal a apresentar o mais recente ISF de 1,42 filhos em 2020 (INE, 2022a).

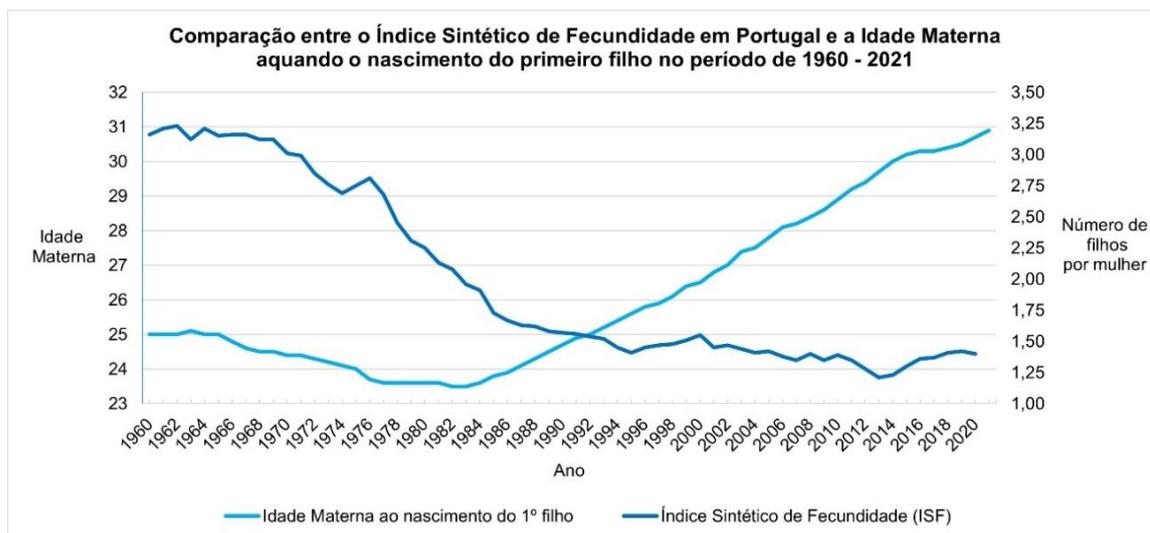


Figura 10: Gráfico de comparação evidenciando o Índice Sintético de Fecundidade (ISF) inversamente proporcional à Idade Materna após o nascimento do primeiro filho, em Portugal, durante o período compreendido entre 1960-2021. O ISF foi calculado através da soma das taxas de fecundidade por grupos etários compreendidos entre os 15 e 49 anos, durante um ano civil. Adaptado de (INE, 2022a) e consultado a 01-06-2022.

4.3. Fisiopatologia

É de conhecimento científico que a infertilidade conjugal possui um caráter multifatorial, podendo derivar de uma patologia pré-existente, condições genéticas, eventos traumáticos ou de hábitos de vida nocivos, como o consumo de álcool, drogas, tabaco, o desenvolvimento de obesidade e o excesso de stress, podendo afetar ambos elementos do casal (Amaral et al., 2018; Deyhoul et al., 2017; Farquhar et al., 2019; Hakim et al., 1998).

4.3.1. Fatores Conjugais Femininos

A idade da mulher é um fator importante na possibilidade de alcançar uma gravidez, uma vez que o número de ovócitos presentes nos ovários e a sua qualidade vão diminuindo com o aumento da idade materna. O mecanismo pelo qual a idade materna afeta a qualidade ovocitária não é ainda totalmente conhecido, no entanto sabe-se que os ovócitos sofrem uma contínua deterioração ao nível do DNA com o tempo através do encurtamento dos telómeros, por ação de componentes ambientais nocivos que eventualmente causam um aumento do stress oxidativo nestas células, ou mesmo devido ao aumento da disfunção mitocondrial fruto do envelhecimento (Farquhar et al., 2019; Hassold & Hunt, 2009; Kalmbach et al., 2013; Lourenço et al., 2014; Thomas, 2001).

O normal funcionamento e posicionamento das trompas de falópio é essencial para a captação do Complexo *Cumulus*-Ovócito (CCO), fecundação e consequente transporte do embrião para a cavidade uterina, pelo que erros neste processo poderão resultar numa gravidez ectópica (Harris-Glocker & McLaren, 2013). A infertilidade por fator tubar pode ser causada por: complicações após cirurgias abdominais; endometriose; pólipos uterinos; infeções peritoneais como

a doença inflamatória pélvica, infecções sexualmente transmissíveis (IST's), que causam faixas de tecido cicatricial nas trompas de falópio, dificultando a fecundação. Muitas destas infecções evoluem da vagina ou cólo do útero para a região mais superior do sistema reprodutor, provocando uma inflamação aguda nas trompas, condição denominada salpingite, que pode provocar um aumento de dimensões das trompas, com acumulação de líquido no seu interior resultando em hidrossalpinge, afetando a migração dos espermatozoides (Farquhar et al., 2019).

A ovulação consiste num processo dependente de hormonas, pelo que na ausência destas ou em quantidades insuficientes podem ocorrer alterações ovulatórias como anovulação (ausência de ovulação), oligoovulação (ovulações pouco frequentes) que podem resultar em sintomatologia como amenorreia (ausência de menstruação), oligomenorreia (ciclos menstruais irregulares), acne, obesidade e hirsutismo (Harris-Glocker & McLaren, 2013). Este tipo de alterações podem advir de: doenças endócrinas que afetem o eixo hipotálamo-hipófise-ovários; doenças autoimunes; patologias genéticas, como a Síndrome de Turner; estruturas anatómicas anormais e/ou falhas no desenvolvimento das gónadas; trauma; exposição do hipotálamo e da hipófise a radiação ou mulheres com Insuficiência Ovárica Precoce (Assumpção, 2014; Direkvand-Moghadam et al., 2013; Farquhar et al., 2019).

4.3.2. Fatores Conjugais Masculinos

Parâmetros seminais anormais são uma das principais causas para a infertilidade conjugal por fator masculino, nomeadamente ao nível da morfologia, concentração e motilidade, visto que, apesar de apenas um espermatozoide fecundar o ovócito, é necessário que este esteja maduro e funcional. Irregularidades na produção de espermatozoides também podem resultar em infertilidade, nomeadamente devido a causas congénitas: seja por alterações genéticas, como o caso de microdeleções do cromossoma Y e Síndrome de Klinefelter, que se caracteriza por hipogonadismo e azoospermia não obstrutiva; criptorquidia, caracterizada pela ausência de um ou dos dois testículos na bolsa escrotal, devido à descida incompleta destes nos primeiros meses de vida; ou causas adquiridas como: lesões testiculares p.e. torções, que podem resultar de trauma durante a prática de desporto; orquite associada à papeira; varicocele, que se caracteriza pela existência de veias dilatadas no escroto, que aumentam a temperatura dos testículos e afetam a espermatogénese; cancro testicular; a presença de anticorpos anti-espermatozoide, que podem provocar a degradação dos gâmetas; ou mesmo alterações hormonais, caracterizadas por défices em FSH e/ou LH, que impedem os testículos de produzir testosterona, condicionando a espermatogénese. Também são comuns problemas de obstrução ao nível do epidídimo, vasos deferentes e ducto ejaculatório, resultando num esperma sem espermatozoides no ejaculado. Estas obstruções podem resultar de causas congénitas como a ausência congénita bilateral dos vasos deferentes, especialmente identificada em homens com fibrose quística e causas adquiridas como: infeções prévias, nas quais poderá ter ocorrido cicatrização tecidual nos canais originado o seu

bloqueio; uma vasectomia realizada anteriormente; ou a existência de quistos que impeçam a passagem espermática pelo sistema de ductos (Vander Borgh & Wyns, 2018).

5. Técnicas de Procriação Medicamente Assistida

Na tentativa de ultrapassar a problemática da infertilidade conjugal, as Técnicas de Procriação Medicamente Assistida (do inglês *Assisted Reproductive Technologies*, ART) disseminaram-se por todo o mundo, tendo como impulsionamento o nascimento de Louise Brown em 1978, a primeira criança nascida por meio de um tratamento de Fertilização *in vitro* (FIV), ao cuidado do Dr. Patrick Steptoe e do fisiologista Robert Edwards. Pouco tempo depois, foi registada a primeira gravidez bem-sucedida com um embrião criopreservado em 1983, na Austrália. Desta forma, o final do século ficou marcado com uma nova forma de trazer felicidade para o Mundo (ESHRE, 2018).

De acordo com a OMS, o conceito de Procriação Medicamente Assistida engloba todas as intervenções de manipulação *in vitro* de gâmetas femininos e masculinos ou embriões com vista na obtenção de uma gravidez, envolvendo protocolos de estimulação ovárica controlada e indução da ovulação, inseminação intrauterina (IIU), fertilização *in vitro*, transferência de embriões (TE), injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), biópsia embrionária, testes genéticos pré-implantatórios, uso da eclosão assistida e a criopreservação de gâmetas ou embriões (De Geyter, 2019; Zegers-Hochschild et al., 2017).

Em Portugal, a introdução das ART foi semelhante aos países desenvolvidos fruto do excelente empenho, dedicação e qualidade dos grandes pioneiros da PMA. A primeira criança cuja fecundação ocorreu por FIV nasceu a fevereiro de 1986, pelo que a técnica de criopreservação de embriões foi pioneira em Portugal na Maternidade Dr. Alfredo da Costa, coordenada pelo Dr. Elmano Barroco, em 1990 (CNPMA, 2020). No ano de 2018, 2733 crianças nasceram em Portugal como resultado das técnicas de PMA, representando 3,1% do número total de crianças nascidas no país durante esse ano (CNPMA, 2021). Desde a sua implementação, a utilização clínica destas técnicas estima que já tenham nascido mais de 8 milhões de crianças em todo o mundo (ESHRE, 2018).

5.1. Inseminação Intrauterina

A inseminação intrauterina consiste numa técnica de reprodução medicamente assistida que tem por base a inserção na cavidade uterina de uma amostra espermática previamente processada, por meio de um cateter. Desta forma, as barreiras físicas ao longo do trato genital feminino são ultrapassadas. É considerada a técnica pouco invasiva e de baixo custo, com menos complexidade e a mais semelhante à procriação de forma natural. Este procedimento pode ser realizado com esperma do parceiro (Inseminação Artificial Conjugal, IAC) ou com esperma de dador (Inseminação Artificial de Dador, IAD) mediante ciclo natural ou com estimulação ovárica controlada, fazendo uso de fármacos que induzem o desenvolvimento e maturação dos folículos ováricos. Esta estimulação é monitorizada regularmente através da realização de ultrassonografias e análises

sanguíneas para dosagem da hormona estradiol. Normalmente, a inseminação é realizada cerca de 36-40 horas após a administração intramuscular da hormona hCG, responsável por induzir a ovulação, sendo administrada após visualização de 1 ou mais folículos com 16-18 mm de diâmetro e uma espessura endometrial superior a 7 mm. Consiste numa técnica normalmente indicada em pacientes com problemas de ovulação, alterações ligeiras no número e motilidade dos espermatozoides, casos de infertilidade inexplicada, pacientes com disfunções ejacutórias ou mesmo perante uma necessidade de recurso a espermatozoides doados. A IIU apresenta uma taxa de sucesso de gravidez clínica inferior às técnicas de fertilização *in vitro*, estando dependente de vários fatores como a idade da mulher, a qualidade do esperma, a origem da infertilidade, entre outros fatores (Allahbadia & Merchant, 2012).

5.2. Fertilização *in vitro*

O conceito Fertilização *in vitro* diz respeito às metodologias que proporcionam a união entre os gâmetas feminino e masculino fora do corpo humano e em ambiente laboratorial, ou seja, *in vitro*. Envolve geralmente uma etapa inicial de estimulação ovárica controlada, seguida da recolha, observação e preparação laboratorial dos ovócitos. Após processamento dos gâmetas masculinos e respetiva fecundação dos ovócitos, os embriões obtidos são mantidos em estufas ao longo do seu desenvolvimento embrionário, pelo que após seleção, 1 ou 2 embriões poderão ser transferidos para o útero da paciente no mesmo ciclo reprodutivo, ou poderão todos os embriões resultantes ser criopreservados para tratamentos num ciclo posterior. A FIV pode ser realizada de forma convencional, na qual os CCO obtidos por punção folicular são incubados em contacto com os espermatozoides, que de forma natural progridem até atingir o ovócito e penetram as suas camadas circundantes, ou pela inserção direta do gâmeta masculino no ovócito, através da técnica de Microinjeção Intracitoplasmática de Espermatozoide. Geralmente, a FIV convencional pode ser indicada em casos de obstrução ou ausência bilateral das trompas de falópio, perante patologias uterinas como endometriose, ou mesmo em casos de insucesso com tratamentos mais simples como a IIU.

5.2.1. Microinjeção Intracitoplasmática de Espermatozoide

A técnica de Microinjeção Intracitoplasmática de um espermatozoide foi introduzida no início da década de 1990 e considerou-se como um dos avanços tecnológicos mais revolucionários na tecnologia da reprodução medicamente assistida, especialmente no tratamento de infertilidade proveniente de fatores masculinos, que anteriormente não tinha sido ultrapassada na maioria dos tratamentos com recurso à FIV convencional (Rubino et al., 2015).

Esta metodologia permite que apenas um espermatozoide previamente selecionado seja utilizado por ovócito, pelo que o facto de este ser injetado no ooplasma permite que a barreira física de alcance até ao gâmeta feminino seja ultrapassada, aumentando assim a probabilidade de fertilização. No entanto, é necessário ter em conta que à semelhança do que ocorre *in vivo*, a fertilização *in vitro* dos gâmetas deve também despoletar a ativação do ovócito, com a consequente extrusão do segundo corpúsculo polar e formação dos dois pronúcleos (Santos, 2013).

A técnica de ICSI envolve várias etapas, nomeadamente: a obtenção dos gâmetas femininos através de uma punção folicular em que, sob protocolos de estimulação ovárica controlada, múltiplos folículos em ambos os ovários se desenvolvem e maturam, para que sejam aspirados e utilizados; a desnudação ovocitária caracterizada pela remoção de células do *cumulus oophorus* em redor do gâmeta feminino, permitindo avaliar o seu estado de maturação nuclear, nomeadamente o estado de Metafase II; o processamento da amostra espermática através da separação dos gâmetas do líquido seminal ou soluções crioprotetoras e ainda a estimulação da sua maturação *in vitro*; a imobilização e seleção do espermatozoide a microinjetar; o posicionamento do ovócito e a consequente microinjeção do gâmeta masculino. O uso de um microscópio ótico invertido com equipamentos de micromanipulação torna-se essencial, uma vez que permite transformar os movimentos da motricidade fina humana numa escala muito menor, com elevada precisão, de forma que seja possível manipular gâmetas e embriões.

A imobilização do espermatozoide imediatamente antes da microinjeção é fulcral para o sucesso da técnica. Esta imobilização é realizada com recurso à agulha de microinjeção, através de uma compressão da cauda seguida de arrastamento na base da placa de Petri, causando uma rutura na membrana do espermatozoide. Assim, a quebra da cauda do espermatozoide causa uma rutura na membrana plasmática do gâmeta, promovendo uma despolimerização membranar que permite que as enzimas do ooplasma penetrem facilmente no núcleo espermático e iniciem a descondensação nuclear, assim como se dá a libertação de fatores indutores de oscilações de cálcio, necessário na ativação do ovócito, após microinjeção. Este tipo de rutura membranar aumenta a probabilidade de uma fertilização normal (Chen et al., 1996; Van den Bergh et al., 1995; Velaers et al., 2012).

Esta técnica de PMA é frequentemente recomendada para casos infertilidade conjugal masculina como oligozoospermia (secção 1.2.2.1), astenozoospermia (secção 1.2.2.2) e teratozoospermia (secção 1.2.2.3), no entanto também pode ser indicada em casos de ovócitos previamente congelados, podendo a técnica superar o endurecimento da zona pelúcida por vezes resultante da criopreservação dos gâmetas; casos de obtenção de espermatozoides por metodologias cirúrgicas; casos em que o número de ovócitos recuperados é reduzido, permitindo aumentar as probabilidades de que um maior número destes gâmetas seja fecundado; casos de insucesso em anteriores tratamentos de PMA usando FIV; e também perante ovócitos com anomalias na zona pelúcida (Pereira & Palermo, 2018).

II. Materiais e Métodos

Todos os materiais, meios e gâmetas utilizados durante o estágio curricular foram fornecidos pelos laboratórios de andrologia, embriologia e criobiologia da Ferticentro, em Coimbra, entre julho de 2021 e julho de 2022, mediante autorização, pelo que todos os procedimentos efetuados em contexto laboratorial decorreram sob as devidas condições de assepsia, com a limpeza periódica das câmaras de fluxo laminar e outras superfícies de trabalho, uso de materiais não tóxicos, estéreis e descartáveis sempre que necessário, assim como roupa e calçado apropriado para o laboratório, com vista na mitigação de qualquer propagação de contaminação exterior.

I. Laboratório de Andrologia

Na secção de andrologia, o objetivo principal baseia-se na preparação e processamento do esperma com vista na utilização dos gâmetas masculinos em tratamentos de PMA, nomeadamente na sua utilização para as técnicas de Fertilização *in vitro* e Inseminação artificial. Também são realizados exames complementares de diagnóstico de infertilidade conjugal por fator masculino, através do estudo dos parâmetros espermáticos. No campo da preservação da fertilidade e doação de gâmetas, o esperma pode também ser preparado e criopreservado para posterior utilização.

I.1. Obtenção dos gâmetas masculinos

Geralmente, para proceder à recolha de esperma, encaminhou-se o indivíduo para uma sala específica para o efeito, onde através de masturbação todo o conteúdo da ejaculação foi recolhido num frasco não tóxico para os espermatozoides, devidamente identificado com o nome, data e número do paciente. Após ejaculação, o recipiente foi colocado numa janela com ligação entre a sala de recolha e o laboratório, como forma de facilitar o manuseamento da amostra e impedir que esta sofra alterações devido às variações de temperatura. No caso de ocorrer perda de amostra, tal informação foi comunicada e incluída no relatório de análise, uma vez que o diagnóstico de fertilidade podia tomar-se incorreto.

Em certos casos, perante a impossibilidade de realizar a recolha na clínica, recorreu-se a kits específicos que podem ser usados no exterior da clínica, contendo um preservativo específico que possui um lubrificante não espermotóxico, permitindo ao paciente ter relações sexuais e não recorrer apenas à masturbação. O tempo de entrega da amostra foi rigorosamente cumprido, não ultrapassando os 60 minutos após a ejaculação, assim como o transporte da mesma foi efetuado e mantido preferencialmente em contacto com o corpo do indivíduo, a uma temperatura entre 20-37°C (World Health Organization, 2021).

Anteriormente à recolha, com o objetivo de complementar o conhecimento relativamente ao esperma que se pretende analisar, foram questionadas informações como: o período de abstinência ejaculatória atual, a existência de cirurgias prévias, a toma de medicação diária ou pontual e a existência de alguma patologia ou estado febril no período anterior à recolha. É aconselhado um período de abstinência entre 2 a 7 dias, visto que em períodos de abstinência mais longos os espermatozoides mais velhos ficarão armazenados, diminuindo a qualidade dos espermatozoides mais recentemente produzidos. Um período de abstinência mais curto também não é aconselhável, dado que a quantidade de espermatozoides e o volume de ejaculado poderão não ser representativos da amostra. Relativamente à toma de medicação, fármacos pertencentes aos grupos de anti-hipertensivos, antipsicóticos, anticonvulsivantes e antidepressivos resultaram em mudanças relevantes a nível espermático, nomeadamente: o impedimento do transporte dos espermatozoides para a uretra, a inibição das secreções das glândulas sexuais anexas, o aumento da fragmentação do DNA espermático e a diminuição do tamanho das gónadas (Beeder & Samplaski, 2020; Drobnis & Nangia, 2017; World Health Organization, 2021).

Outras metodologias de obtenção de espermatozoides em situações mais particulares foram realizadas, nomeadamente a aspiração espermática a nível epididimal e diretamente a partir do testículo. Estas metodologias foram realizadas no bloco operatório sob anestesia local por um médico urologista, no qual uma agulha conectada a uma seringa foi inserida no testículo ou epidídimo com o objetivo de aspirar o parênquima testicular ou fluído epididimal existente no interior. Estes procedimentos costumam ser realizados em indivíduos que tenham realizado uma vasectomia anteriormente e não pretendam reverter o procedimento, que tenham um diagnóstico de ausência de ductos deferentes ou que possuam azoospermia obstrutiva. As técnicas de obtenção espermática por aspiração possuem a desvantagem de apresentar um baixo rendimento espermático, podendo muitas vezes inviabilizar a congelação da amostra obtida, sendo que muitos dos tratamentos realizados com recurso as estas técnicas terão de fazer uso da amostra espermática a fresco (Agarwal et al., 2021; Coward & Mills, 2017).

Em pacientes diagnosticados previamente com azoospermia não obstrutiva, obtiveram-se espermatozoides provenientes do testículo por meio de biópsia, um procedimento também realizado no bloco cirúrgico em condições de anestesia geral ou local, em que pequenos fragmentos de tecido testicular foram extraídos e encaminhados para o laboratório, paralelamente à realização da cirurgia. A técnica de biópsia testicular permite obter uma elevada taxa de recuperação espermática, no entanto apresenta a desvantagem de poder comprometer o estado do testículo, no caso de biópsias múltiplas (Coward & Mills, 2017).

1.2. Análise Espermática

Na investigação de um diagnóstico de infertilidade conjugal, a vertente masculina pode ser estudada por meio de um exame complementar de diagnóstico: o Espermograma. Este consiste na análise citomorfobioquímica do esperma e dos seus constituintes, sendo analisados parâmetros que podem ser: macroscópicos como o cheiro, aspeto, viscosidade, volume, pH e período de liquefação; e ainda microscópicos que englobam a análise da motilidade, concentração, morfologia,

vitalidade, a presença de agregação, aglutinação, ou mesmo células não espermáticas no ejaculado. Em casos de azoospermia, perda inicial de ejaculado e irregularidades no processo de recolha, foi agendada uma nova recolha de espermatozoides através da realização de um novo espermograma.

No âmbito do estágio curricular, o estudo dos parâmetros espermáticos e o processamento do espermatozoides foi realizado de acordo com as diretrizes da Organização Mundial de Saúde, através da 5ª edição do manual “*Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*”, que engloba todos os procedimentos e normas para a uniformização da avaliação do espermatozoides humano, com um valor científico reconhecido mundialmente.

1.2.1. Avaliação Macroscópica

1.2.1.1. Odor

No âmbito do estágio curricular não foi analisado o odor espermático, no entanto, perante situações em que se verificou um intenso odor a urina ou putrefação, essa informação foi anotada no relatório de análise.

1.2.1.2. Aspeto

Amostras de espermatozoides normais classificaram-se como macroscopicamente homogêneas, com uma aparência cremosa, de tonalidade branca ou acinzentada e opalescente. Alterações ao nível da cor foram anotadas no relatório de análise, podendo ser indicadoras de patologias ou consumo específico de fármacos, nomeadamente: um aspeto avermelhado típico da condição de hematospermia, resultante de processos inflamatórios, obstruções, quistos ou neoplasias; coloração amarelada, indicadora de períodos de abstinência longos; ou uma tonalidade de amarelo mais intenso característico de icterícia ou toma de suplementos vitamínicos e medicamentos (World Health Organization, 2021).

1.2.1.3. Liquefação

Naturalmente após a ejaculação, o espermatozoides forma um coágulo semissólido que liquefaz com o passar do tempo, tornando-se mais homogêneo e aquoso. Este processo considera-se essencial para que os espermatozoides progridam livremente no trato feminino e alcancem o ovócito. A amostra foi mantida no interior da câmara de fluxo laminar enquanto liquefazia, pelo que uma liquefação tipicamente normal foi observada através da mudança do aspeto do espermatozoides num período de 20 a 30 minutos após recolha.

Perante casos particulares em que a liquefação não ocorreu até uma hora depois, esta foi classificada como incompleta e a análise do espermatozoides foi iniciada, como forma de evitar os danos causados pela exposição *in vitro* prolongada da amostra, nomeadamente ao nível da vitalidade, motilidade e morfologia espermática, por ação da temperatura e desidratação. Por vezes os ejaculados apresentaram filamentos de muco e grânulos gelatinosos não liquefeitos, que apesar de não apresentarem relevância clínica foram retirados para não interferirem na análise espermática subsequente (World Health Organization, 2021).

Existem alternativas para facilitar a liquefação, tais como: liquefação sob temperatura controlada, a 37°C em constante movimento circular lento; liquefação mecânica através do vulgo “*up-and-down*”, que poderá ser feita com ou sem diluição em meio fisiológico; ou ainda a liquefação através da adição da enzima proteolítica bromelina ao ejaculado. No entanto, este tipo de alternativas deve ser anotado no relatório de análise, uma vez os parâmetros de concentração, motilidade e morfologia poderão ser significativamente alterados (World Health Organization, 2021).

1.2.1.4. Volume

Um indivíduo dito saudável ejacula entre 1.5-6 mL de esperma, pelo que grande parte deste depende das secreções vindas das glândulas sexuais anexas, testículos e epidídimos. O volume das amostras foi analisado através de aspiração por uma seringa graduada de 2 mL. Um volume inferior a 1,5 mL poderá advir de perda de amostra ou de patologias como ejaculação retrógrada parcial, obstruções ao nível do ducto ejaculatório, ausência congénita uni- ou bilateral dos vasos deferentes, vesículas seminais pouco desenvolvidas, ou mesmo um défice androgénico (Costa e Sousa, 2016; Tauber et al., 1975). Uma ejaculação superior a 6 mL poderá ser indicativo de uma exsudação ativa das glândulas sexuais anexas fruto de uma infeção (World Health Organization, 2021).

1.2.1.5. Viscosidade

Uma amostra saudável de esperma liquefeito não deve ser viscosa, possibilitando a capacidade de progressão dos espermatozoides. A análise da viscosidade consistiu em aspirar o esperma com uma pipeta graduada de 3 mL, e aquando da sua libertação observou-se o esperma a escorrer em pequenas gotas com a gravidade, pelo que o ideal seria a inexistência de rastros viscosos. Em casos de elevada viscosidade, esta foi classificada como tal e o ejaculado foi aspirado por uma seringa com uma agulha de calibre fino e consecutivamente libertado, como forma de reduzir a viscosidade da amostra e esta não interferir com a avaliação dos parâmetros microscópicos.

1.2.1.6. pH

Também o pH espermático se relaciona diretamente com a quantidade de fluídos secretados pelas glândulas sexuais anexas, visto que o líquido prostático é determinado por um pH ácido e o líquido seminal por um pH alcalino. A predominância de uma acidificação ou alcalinização do esperma altera a motilidade dos espermatozoides presentes no ejaculado, pelo que o pH ideal deve ser ≈ 7.2 , no entanto é importante analisar o pH logo após liquefação, uma vez que num ambiente *in vitro* ocorre uma perda contínua de CO₂, causando o aumento gradual do pH (World Health Organization, 2021).

Os valores de pH foram determinados mediante a impregnação de tiras de papel indicador para valores de pH compreendidos entre 6 e 10, e conseqüente comparação de cores de acordo com a tabela de referência. Um pH >8 poderá ser indicativo alguma patologia ao nível da próstata, devendo ser suspeitado imediatamente com a ausência de liquefação na fase inicial de análise. Já um

valor de pH <7,2 pode ser indicativo de contaminação com urina ou patologias nas vesículas seminais por falta de fluido alcalino, normalmente associadas a uma ausência de coagulação.

1.2.2. Avaliação Microscópica

Após avaliação dos parâmetros macroscópicos, a amostra foi observada sob um microscópio ótico de contraste de fase, com recurso a uma câmara de contagem Makler (Figura 11). A câmara *Makler* corresponde a um método de contagem espermática reutilizável que não necessita de diluições prévias ao esperma nem faz uso de uma substância fixadora comparativamente à convencional Câmara de *Neubauer*, facilitando assim o cálculo da concentração de espermatozoides no ejaculado, tendo esta sido criada especificamente para o efeito (Cardona-Maya et al., 2008).

Esta foi mantida numa incubadora com temperatura controlada a 37°C, tendo apenas sido retirada para avaliação dos parâmetros de motilidade e concentração. Inicialmente, após eficiente homogeneização do esperma, foram adicionados 10 µL de amostra à câmara *Makler* com recurso a uma micropipeta e o esperma foi observado a uma ampliação de 200x para verificar a composição geral do ejaculado e a identificação, se aplicável, de espermatozoides agregados e/ou aglutinados e células não espermáticas, como células do trato genital e leucócitos. Qualquer alteração significativa foi anotada no relatório de análise.

A agregação é visível quando se observam espermatozoides imóveis presos entre si, ou espermatozoides móveis que se encontram unidos a células não espermáticas, resíduos presentes na amostra e cordões de muco. Já a aglutinação corresponde à existência de espermatozoides móveis ligados entre si, envolvendo ligações cabeça-cabeça, cauda-cauda, ou mesmo interligando-se com estruturas distintas no espermatozoide. Tais fatores podem dificultar uma gravidez natural, diminuindo a capacidade de movimento dos gâmetas (World Health Organization, 2021).

Perante situações em que não se observaram espermatozoides no campo ótico contendo a quadrícula, procedeu-se à observação atenta e sistemática de toda a lâmina na mesma ampliação. No caso de não terem voltado a ser observados espermatozoides, procedeu-se à transferência da amostra para um tubo de fundo cónico de 10 mL, ao qual foi adicionado meio de manipulação de gâmetas¹ previamente aquecido e equilibrado a 37°C e 5% de CO₂, na proporção de 1:1, e posteriormente o tubo foi centrifugado durante 10 minutos a 1300 rpm. O *pellet* foi ressuspensionado em 0.1 mL do sobrenadante e repetiu-se a observação sistemática da amostra na câmara *Makler*, utilizando as mesmas condições-padrão que anteriormente. Se na amostra concentrada não tiverem

¹Sperm Preparation Medium (SPM), Origio®: Meio usado na manipulação e preparação do esperma, responsável por estimular a motilidade espermática e manter a viabilidade durante todo o seu processamento, promovendo a capacitação. Entre outros constituintes, contém: vermelho de fenol; bicarbonato de sódio (mimetiza as condições fisiológicas *in vivo* e promove a capacitação); albumina sérica humana (atua como antioxidante e captador de iões que permitem a estabilização celular, neste caso removendo o colesterol da membrana espermática); gentamicina (antibacteriano) (Lampiao & du Plessis, 2008; Origio, 2006b).

sido observados espermatozoides, anotou-se nas observações do espermograma a informação de azoospermia, pelo que os restantes parâmetros microscópicos não foram avaliados.

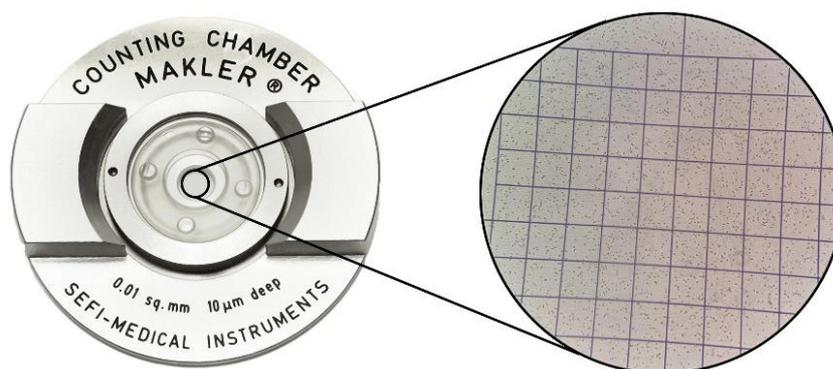


Figura 11: Câmara de contagem Makler (à esquerda) e visualização da grelha graduada onde é possível observar os espermatozoides através do microscópio de contraste de fase, a uma ampliação de 200x (à direita). A base da câmara Makler é delimitada por 4 estruturas em quartzo que permitem a colocação exata de 10 µL de amostra, sendo esta coberta com um vidro graduado contendo 100 quadrados (10x10) de 0,1x0,1mm cada. O volume de amostra numa linha graduada corresponde exatamente a 1x10⁻⁶ de mililitro, pelo que a contagem de espermatozoides em 10 quadrados indica a concentração destes no ejaculado, em milhões/mL. Imagem capturada na clínica Ferticentro e obtida com autorização.

Em condições normais, os leucócitos não devem existir em concentrações superiores a 1x10⁶/mL no ejaculado, pelo que em concentrações superiores se denomina leucospermia, uma condição que pode advir de uma inflamação dos órgãos reprodutores masculinos, que consecutivamente pode afetar a motilidade e a integridade do DNA, através da libertação de espécies reativas de oxigénio (do inglês *Reactive Oxygen Species*, ROS). Na presença deste diagnóstico, foi aconselhada a realização simultânea de uma espermocultura, um exame microbiológico laboratorial cujo objetivo se baseia em diagnosticar possíveis infeções bacterianas ou fúngicas no trato reprodutor masculino, com a identificação específica do microrganismo que originou a infeção (World Health Organization, 2021).

1.2.2.1. Concentração

Embora seja necessário apenas um único espermatozoide para que ocorra fecundação, o caminho deste até ao ovócito torna-se dificultado devido aos mecanismos de defesa do trato genital da mulher. Assim, existe uma necessidade biológica adquirida ao longo da evolução de aumentar o número de gâmetas masculinos ejaculados, na tentativa de aumentar a probabilidade de ocorrer fecundação.

A concentração total de espermatozoides no ejaculado é considerado um parâmetro importante a ser aferido, podendo ser calculado através da multiplicação entre a concentração de espermatozoides num mililitro de ejaculado e volume total deste. A concentração espermática de um indivíduo saudável e fértil deve ser $\geq 15 \times 10^6$ espermatozoides/mL e/ou $\geq 39 \times 10^6$ espermatozoides/ejaculação, caso contrário seria identificada a condição de Oligozoospermia, caracterizada como uma amostra espermática com os valores de concentração inferiores aos valores de referência estipulados (World Health Organization, 2010).

Uma diminuição na concentração espermática pode ser desencadeada por desequilíbrios hormonais, efeitos colaterais de tratamentos, fatores ambientais como o stress, hábitos de vida como o consumo de tabaco e álcool, obesidade, doenças sexualmente transmissíveis, fatores hereditários e ainda situações de hipertermia prolongada (World Health Organization, 2021).

Para determinar a concentração de espermatozoides, 10 µL de amostra a fresco foram adicionados à câmara de contagem e posteriormente observados ao microscópio ótico em contraste de fase com ampliação a 200x. Com o auxílio de um contador de células, analisaram-se cerca de 3 linhas da quadrícula para que se contassem pelo menos 200 espermatozoides, sendo que na impossibilidade de totalizar este número foram consideradas mais linhas para análise. Procedeu-se à média entre os valores obtidos em cada uma das linhas, tendo-se obtido a quantidade de espermatozoides por cada mililitro de ejaculado.

1.2.2.2. Motilidade

A motilidade é um parâmetro extremamente importante de ser analisado, uma vez que uma boa motilidade espermática progressiva está diretamente relacionada com as taxas de fecundação, através da uma maior capacidade de penetração na zona pelúcida (World Health Organization, 2021). Este parâmetro foi avaliado simultaneamente com a concentração espermática, sob as mesmas condições. Os espermatozoides foram classificados em 4 categorias consoante o seu nível de motilidade estipulado na Tabela 2, e com o auxílio de um contador de células contabilizaram-se cerca de 200 espermatozoides em duplicado, primeiramente as classes de motilidade A e B, para que a contagem fosse o mais precisa possível. O resultado de cada categoria foi expresso em percentagem no relatório. De acordo com a OMS, o limite de referência mínimo para a motilidade total (A+B+C) de um esperma normal corresponde a 40%, assim como a motilidade progressiva (A+B) a 32%, pelo que perante valores de motilidade inferiores, os indivíduos foram diagnosticados com astenozoospermia (World Health Organization, 2021).

Tabela 2: Classificação da motilidade espermática (World Health Organization, 2021).

Classificação	Descrição da Motilidade
Móvel progressivo rápido (tipo A)	Movimento com progressão linear ou circular igual ou superior a meia cauda num segundo ($\geq 25\mu\text{m/s}$).
Móvel progressivo lento (tipo B)	Movimento com progressão linear ou circular semelhante ao tamanho de uma cabeça ou metade da cauda do espermatozoide num segundo ($5\text{-}25\mu\text{m/s}$).
Móvel não progressivo ou <i>in situ</i> (tipo C)	Movimento sem progressão semelhante ao tamanho de uma cabeça num segundo ($\leq 5\mu\text{m/s}$).
Imóvel (tipo D)	Sem movimento.

1.2.2.3. Morfologia

A fertilidade masculina e a qualidade de uma amostra de esperma são significativamente afetadas pela sua morfologia espermática, pelo que quanto maior a percentagem de espermatozoides normais morfológicamente numa amostra, maior a probabilidade de gravidez (World Health Organization, 2010).

Para analisar a morfologia, preparou-se um esfregaço com 10 µL de amostra homogeneizada. Perante amostras oligozoospermicas, realizou-se uma etapa antecedente de centrifugação a 1300 rpm por 10 minutos e ressuspendeu-se em 0.1 mL do volume sobrenadante, como forma de concentrar a amostra e facilitar a análise morfológica. Após secagem à temperatura ambiente, com recurso a um kit de coloração rápida², a lâmina foi fixada com a solução 1 durante 15 segundos, corada com a solução 2 por 10 segundos e com a solução 3 por 10 segundos. Por fim, a lâmina foi passada por água corrente para remover o excesso de corante e aguardou-se a sua secagem em posição vertical à temperatura ambiente. Depois de seca, a lâmina foi avaliada ao microscópio ótico, a uma ampliação de 1000x com óleo de imersão. A contagem foi realizada com base nos critérios de morfologia listados na Tabela 3, tendo-se atribuído um valor percentual para anomalias na cabeça, peça intermédia, flagelo e a presença de resíduos citoplasmáticos, se muito evidentes (Figura 12).

Tabela 3: Classificação da morfologia espermática (World Health Organization, 2021).

Localização	Normal	Anormal
Cabeça	<ul style="list-style-type: none"> - Forma oval e lisa com contornos regulares; - Região acrossomal bem definida que corresponda 40-70% da área total da cabeça; - Sem vacúolos na região pós acrossomal; - Região acrossomal sem vacúolos de grandes dimensões; - Cabeça sem mais do que dois vacúolos pequenos (volume não superior a 20% da cabeça). 	<ul style="list-style-type: none"> - Região acrossomal fora do intervalo espectável; - Múltiplas cabeças; - Formais anormais: cabeça em forma de pera, amorfa, assimétrica, alongada, redonda e/ou pequena; - Múltiplos vacúolos; - Vacúolos na região pós-acrossomal.
Peça Intermédia	<ul style="list-style-type: none"> - Fina e regular; - Inserida longitudinalmente e centralmente com o eixo da cabeça; - Tamanho aproximadamente à cabeça. 	<ul style="list-style-type: none"> - Forma e/ou espessura irregulares; - Assimetria na inserção consoante eixo da cabeça; - Anomalias no comprimento.
Cauda	<ul style="list-style-type: none"> - Calibre uniforme ao longo de toda a sua extensão; - Mais fina que a peça intermédia; - Comprimento de $\approx 45 \mu\text{m}$ ou 10 vezes o comprimento da cabeça; - Não quebrada nem enrolada. 	<ul style="list-style-type: none"> - Cauda ausente, curta ou partida; - Grossura e/ou comprimento irregulares; - Múltiplas caudas; - Cauda enrolada e/ou com dobras.
Resíduos citoplasmáticos	<ul style="list-style-type: none"> - Sem resíduos citoplasmáticos superiores a $\frac{1}{3}$ do tamanho da cabeça. 	<ul style="list-style-type: none"> - Resíduos de grandes dimensões ($> \frac{1}{3}$ do tamanho da cabeça) acoplados na cauda e/ou peça intermédia.

² Kit de coloração rápida para uso no método Diff-Quik. Composição: Solução 1: Solução aquosa de metanol, que fixa e estabiliza os componentes celulares; Solução 2: Solução aquosa de eosina Y, cujo objetivo se baseia em corar estruturas celulares catiónicas; Solução 3: Solução de azul de metileno e azure B, cuja função se baseia em corar estruturas carregadas negativamente como o DNA. A interação entre ambas as soluções de corantes provoca uma coloração de gradiente azul/violeta claro/escuro ao longo da cabeça do espermatozoide, assim como uma tonalidade vermelha/rosada na peça intermédia e cauda (Sigma-Aldrich, 2020).

Sempre que possível foram contabilizados 200 espermatozoides, de preferência explorando vários pontos distintos da lâmina, para obter um resultado mais representativo. Quando aplicável, registou-se a presença de células imaturas e leucócitos, expressos em proporção por cada 100 espermatozoides analisados. Registou-se também o valor percentual dos espermatozoides com morfologia normal atendendo a todos os critérios, pelo que o limite de referência para um espermatozoide normal corresponde a $\geq 4\%$ de formas normais, sendo que perante valores inferiores, o indivíduo foi diagnosticado com teratozoospermia (World Health Organization, 2010).

O índice de teratozoospermia foi outro parâmetro analisado e anotado no relatório, refletindo a quantidade média de anomalias por espermatozoide anormal. Este é calculado através da divisão entre o número total de anomalias contabilizadas pela percentagem de espermatozoides anormais. Está compreendido entre 1 e 3, considerando as anomalias ao nível da cabeça, peça intermédia e cauda, sendo que valores ≤ 1.60 são considerados normais (World Health Organization, 2010).

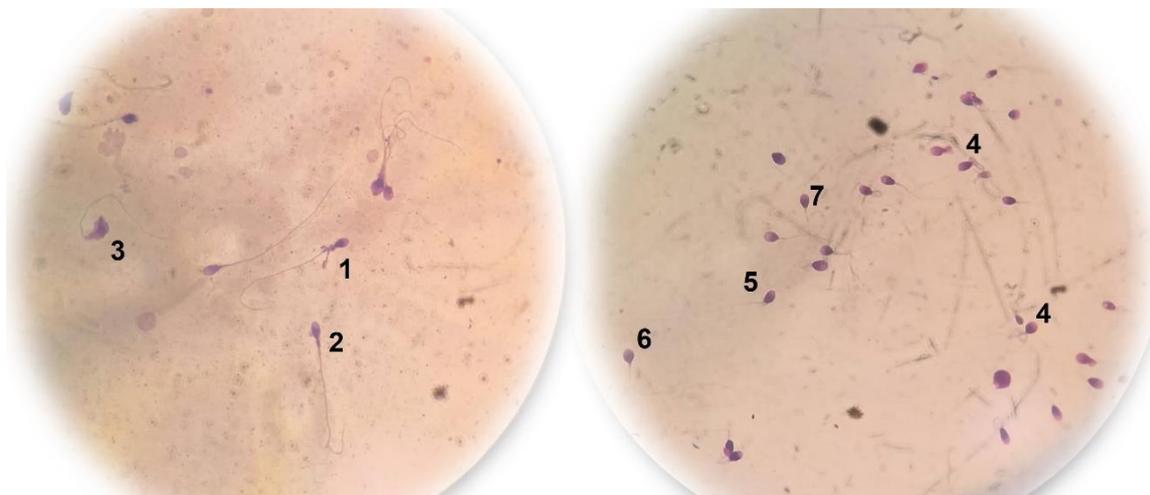


Figura 12: Observação microscópica a 1000x com óleo de imersão de uma amostra espermática após coloração com a metodologia Diff-Quik. **1:** Espermatozoide com peça intermédia amorfa. **2:** Espermatozoide com a cabeça alongada e a peça intermédia grossa. **3:** Espermatozoide com cabeça amorfa. **4:** Espermatozoides com a cauda enrolada. **5:** Espermatozoide com peça intermédia amorfa com inserção assimétrica na cabeça. **6:** Espermatozoide com cabeça redonda. **7:** Espermatozoide normal. Imagens capturadas na clínica Ferticentro e obtida com autorização.

1.2.2.4. Vitalidade

A vitalidade é um parâmetro que permite distinguir espermatozoides vivos de mortos, em amostras com pouca motilidade, através da análise da integridade da membrana celular. Como tal, a avaliação deste parâmetro foi efetuada apenas em ejaculados que possuíam uma motilidade total inferior a 40%, tendo sido realizada o mais breve possível após a liquefação. Existem vários métodos para analisar a vitalidade celular, pelo que durante o estágio a metodologia aplicada baseou-se na adição de uma solução aquosa de eosina A. Numa lâmina foram colocados 10 μL de amostra, aos

quais foi adicionado o mesmo volume da solução aquosa de eosina A³. Após homogeneização, foi adicionada uma lamela e a amostra foi visualizada a uma ampliação de 400x em contraste de fase negativo como forma de permitir uma melhor distinção dos espermatozoides. Procedeu-se à contagem e distinção de 200 espermatozoides corados e não corados (brancos ou incolores). Foi identificado o valor percentual, sendo que o valor mínimo de referência para a vitalidade espermática corresponde a 58% de espermatozoides vivos numa amostra. Esta análise permite uma melhor precisão na avaliação da motilidade, visto que o número de espermatozoides mortos numa amostra não se pode sobrepor à percentagem de espermatozoides imóveis. Quando a quantidade de espermatozoides imóveis vivos foi inferior ao valor mínimo de referência, identificou-se a condição de necrozoospermia, que pode ser indicativa de anomalias flagelares (World Health Organization, 2010).

Tabela 4: Nomenclatura de variações nos parâmetros de qualidade espermática (World Health Organization, 2010).

Nomenclatura	Descrição
Aspermia	Ausência de ejaculação ou ejaculação retrógrada.
Astenozoospermia	Percentagem de espermatozoides móveis progressivos inferior ao limite de referência (32% de espermatozoides tipo A+B e/ou 40% de espermatozoides tipo A+B+C).
Azoospermia	Ausência de espermatozoides na amostra.
Criptozoospermia	Ausência de espermatozoides na amostra a fresco, mas observados após centrifugação.
Hematospermia	Presença de eritrócito no ejaculado.
Hiperespermia	Volume de ejaculado excedido (>6mL).
Hipospermia	Volume de ejaculado reduzido (<1.5mL).
Leucospermia	Presença de leucócitos em concentrações superiores ao valor de referência (1x10 ⁶ milhões de leucócitos/mL de ejaculado).
Necrozoospermia	Reduzida percentagem de espermatozoides vivos (<58%) e elevada percentagem de espermatozoides imóveis no ejaculado (>60%).
Normozoospermia	Todos os parâmetros espermáticos iguais e/ou acima dos limites de referência.
Oligozoospermia	Concentração de espermatozoides inferior ao limite de referência (15x10 ⁶ espermatozoides/mL e/ou $\geq 39 \times 10^6$ /ejaculação).
Teratozoospermia	Espermatozoides normais abaixo do valor mínimo de referência (4% formas normais).

Após análise espermática, o relatório do espermograma foi redigido e o diagnóstico atribuído consoante a terminologia fornecida pela OMS, como apresentado na Tabela 4. Posto isto, um indivíduo que possua um exame físico e espermograma normais dispensa de estudos andrológicos

³ Solução aquosa pré-preparada contendo eosina A a 0.5%. A eosina A consiste num corante ácido, com afinidade para estruturas celulares básicas carregadas positivamente como o citoplasma e as mitocôndrias. Espermatozoides com a integridade da membrana celular comprometida permitem a entrada do corante na cabeça, corando esta de rosa-avermelhado (Sigma-Aldrich, 2021).

adicionais. É importante salientar que em alguns casos a realização de um único espermograma não se considera suficiente para uma determinação inequívoca do diagnóstico de um indivíduo, uma vez que parâmetros como a concentração e motilidade podem alterar-se ao longo do tempo. Assim, perante um espermograma com um resultado diferente dos parâmetros normais estabelecidos, o exame deve ser repetido 2 a 3 meses após a data de realização do primeiro espermograma, como forma de permitir que ocorra uma renovação completa do ciclo da espermatogénese. Em casos de azoospermia, o exame foi repetido sem aguardar esse período, para confirmar a ausência de espermatozoides na amostra.

1.2.3. Teste de Fragmentação do DNA

O propósito essencial do espermatozoide baseia-se na transmissão do seu genoma haploide ao ovócito para originar o futuro embrião, pelo que a integridade do DNA espermático deve ser encarada como um parâmetro importante na avaliação do esperma.

Homens com diagnóstico de infertilidade possuem uma maior tendência para possuir espermatozoides com DNA fragmentado, no entanto, é importante referir que mesmo indivíduos com um espermograma normal podem possuir elevados níveis de células com a integridade do DNA comprometida. Esta fragmentação pode ser despoletada por diversos processos, como defeitos durante a espermiogénese, processos apoptóticos e stress oxidativo. Estudos realizados com amostras usadas em tratamentos de FIV e ICSI demonstraram que perante amostras com elevado DNA fragmentado, coexistiram casos de reduzida taxa de fertilização, reduzida taxa de implantação, reduzida probabilidade de formação de blastocisto e uma menor probabilidade de eventual gravidez (Fernández et al., 2003, 2011; Hemández-Silva et al., 2021; Ramalho-Santos, 2014; Volpes et al., 2016; World Health Organization, 2021).

O teste de Dispersão da Cromatina Espermática corresponde a um método simples, rápido e preciso com o objetivo de determinar a fragmentação do DNA espermático. Baseia-se no princípio de que espermatozoides com DNA fragmentado não produzem o *halo* característico observado em espermatozoides com DNA intacto, fruto da dispersão e desenrolamento das cadeias duplas de DNA após desnaturação e remoção das proteínas nucleares, especialmente das protaminas (Fernández et al., 2011).

Mediante espermogramas em que foi solicitada a avaliação da integridade da cromatina, fez-se uso de um kit⁴, em que se começou por adicionar 50 µL da amostra de esperma a 100 µL de

⁴ Kit Halosperm – G2, Halotech ®: Solução 1: Solução ácida que desnatura apenas o DNA fragmentado, criando aberturas na cadeia dupla (o tempo de incubação desta solução não é suficiente para desnaturar as cadeias duplas dos espermatozoides contendo DNA intacto). Solução 2: Solução de lise que remove as proteínas nucleares, causando o desempacotamento da cromatina e a expansão das cadeias duplas de DNA dos espermatozoides viáveis, produzindo *halos* resultantes das cadeias duplas de DNA desenroladas ainda ligadas à estrutura nuclear residual. Solução 3: Corante aniónico vermelho à base de eosina. Solução 4: Solução catiónica azul com corante à base de tiazina (Halotech DNA S.L., 2019).

agrose previamente derretida. Após cuidadosa homogeneização, foram colocados 8 μL da solução numa lamela designada para o efeito, com posterior cobertura com uma lâmina. A lamela foi levada ao frigorífico a 4°C por 5 minutos para a agarose solidificar. Perante amostras com elevada concentração espermática, estas foram previamente diluídas até uma concentração máxima de 20 milhões/ mL, impedindo que os espermatozoides se sobrepusessem na lamela. Após solidificação, a lâmina foi removida da lamela à temperatura ambiente e a solução 1 foi aplicada e incubada por 7 minutos. Após drenar, a solução 2 foi adicionada e a lamela ficou em repouso por 20 minutos. A lamela foi lavada com água destilada por 5 minutos, e consequentemente desidratada, primeiramente com etanol a 70% por 2 minutos e com etanol a 100% por outros 2 minutos. A lamela foi deixada à temperatura ambiente numa posição horizontal até secar. Após secagem, a solução 3 foi adicionada, seguida de repouso por 7 minutos, e a solução 4, com uma incubação de 7 minutos.

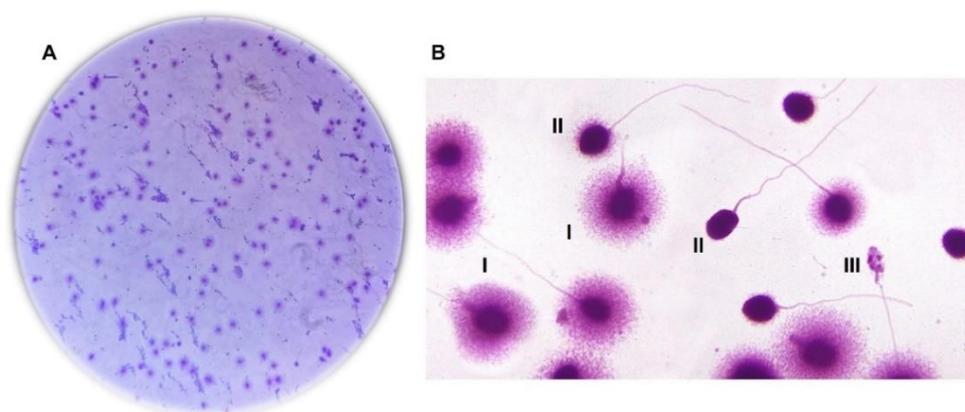


Figura 13: Avaliação da integridade do DNA espermático. **A:** Observação microscópica a 200x de espermatozoides após realização do teste de Dispersão da Cromatina Espermática. **B.I:** Espermatozoides com *halo* evidente e demarcado, característicos de espermatozoides com DNA intacto. **B.II:** Espermatozoides sem *halo* ou com pequenas dimensões, indicadores de espermatozoides com DNA fragmentado. **B.III:** Espermatozoide sem *halo* e com o núcleo corado de forma suave e irregular, evidenciado em espermatozoides degradados com danos no DNA e nas proteínas nucleares. I 3A: Imagem capturada na clínica Ferticentro e obtida com autorização; I 3B: Imagem obtida por (Fernandez et al., 2005).

Após seca, a lamela foi visualizada ao microscópio ótico a 200x e 400x, tendo-se contabilizado cerca de 200 espermatozoides, evidenciando: espermatozoides com *halo*, e portanto, com o DNA intacto; espermatozoides sem *halo* ou com *halo* de pequenas dimensões, característicos de espermatozoides com DNA fragmentado; e espermatozoides degradados, quando o *halo* era inexistente e a coloração nuclear pouco demarcada (Figura 13). A percentagem de fragmentação foi calculada através da soma dos espermatozoides com DNA fragmentado e espermatozoides degradados a dividir pelo número total de espermatozoides observados, pelo que valores $\geq 30\%$ de fragmentação do DNA espermático foram relatados no relatório de análise como patológicos (Evenson & Wixon, 2006; World Health Organization, 2021).

1.2.4. Teste de Ligação ao Ácido Hialurónico

Para que ocorra uma fertilização natural, é necessário que os espermatozoides interajam com a matriz extracelular do *cumulus oophorus* que rodeia o ovócito, essencialmente composta por

ácido hialurónico (AH). A ligação dos espermatozoides ao AH reflete uma correta maturação durante a espermiogénese, visto que é nessa etapa que os gâmetas sofrem uma remodelação da membrana plasmática, adquirindo locais de ligação à zona pelúcida e ao ácido hialurónico (Rashki Ghaleno et al., 2016). Espermatozoides que possuam dificuldade nesta ligação costumam apresentar diversos sinais de imaturidade, como uma retenção do citoplasma e histonas, uma maior frequência de anormalidades morfológicas e uma menor integridade da cromatina, comparativamente aos gâmetas capazes de fazer essa ligação (Lin et al., 1994; Origio, 2016; Yokoo & Sato, 2004).

Desta forma, o teste de ligação dos espermatozoides ao ácido hialurónico pretende analisar a maturidade espermática e é realizado com o auxílio de um kit que contém lâminas revestidas com AH. Através da contagem do número de espermatozoides que se ligam a este tipo de lâminas é possível calcular a percentagem de espermatozoides maduros numa amostra de esperma. É considerado um método útil em várias situações, como em casos de infertilidade idiopática, ou mesmo no auxílio da determinação do tipo de tratamento de PMA a adotar.

Para a realização deste teste foram colocados 10 µL de amostra na lâmina, sendo esta coberta com uma lamela à temperatura ambiente, contendo uma grelha de 100 quadrados (0.1mm x0.1mm). Após 10 a 20 minutos de repouso, os espermatozoides foram observados ao microscópio com ampliação de 200x. Mais de 20 minutos de repouso pode provocar perda de motilidade espermática. Foram contabilizados 200 espermatozoides evidenciando: a classe dos espermatozoides móveis ligados ao AH que perdem o movimento progressivo mas mantém batimento ativo das caudas; os espermatozoides mortos e sem motilidade; e os espermatozoides não ligados que se movem progressivamente. A percentagem de espermatozoides ligados foi calculada através da divisão entre os espermatozoides dotados de motilidade ligados e a soma dos espermatozoides dotados de motilidade ligados com os espermatozoides dotados de motilidade não ligados. Acima de 80% de espermatozoides ligados pode inferir-se que a amostra possui espermatozoides maduros e funcionais.

1.3. Processamento dos gâmetas masculinos para tratamentos de PMA

Embora os espermatozoides necessitem do plasma seminal para atravessar o muco cervical presente no trato genital da mulher, alguns dos seus componentes possuem características decapacitantes que prejudicam a motilidade dos espermatozoides, o que dificulta a obtenção de uma gravidez natural. Desta forma, para uso do esperma em técnicas de PMA, torna-se essencial utilizar técnicas de processamento espermático que promovam a remoção dos constituintes do líquido seminal desnecessários à fertilização como p.e.: leucócitos, células germinativas imaturas e espermatozoides não funcionais produtores de ROS. Níveis elevados de ROS provocam uma redução da motilidade, uma maior apoptose espermática e um enfraquecimento da membrana do espermatozoide, podendo até inibir o processo de capacitação dos gâmetas (Agarwal et al., 2014; Simon et al., 2019). Tais técnicas devem também ser capazes de mimetizar o processo de capacitação espermática *in vitro*, através da seleção dos espermatozoides mais funcionais e móveis, que por sua vez terão o mínimo de danos genéticos e produção de ROS, aumentando as probabilidades de conseguirem alcançar o ovócito e fecundá-lo.

Existem diversas técnicas de preparação de espermatozoides que visam separar as células espermáticas viáveis do plasma seminal e estimular a capacitação, pelo que foi dada ênfase a três técnicas frequentemente executadas durante o estágio curricular, recomendadas pela OMS, sendo: a Lavagem Simples; a técnica de Migração Ascendente de Espermatozoides ou *Swim-Up* (SU); e a separação espermática por Centrifugação de Gradientes Descontínuos de Densidades (CGD).

A Lavagem Simples corresponde a um método que faz uso da adição de meio de cultura ao ejaculado liquefeito seguido de centrifugação, com o objetivo de remover o plasma seminal da amostra. Este procedimento possui a vantagem de se obter uma elevada concentração de espermatozoides se as amostras forem de boa qualidade, no entanto os espermatozoides obtidos não são selecionados consoante a sua motilidade, pelo que detritos e outras células inviáveis não são removidas da amostra, porque permanecerão no *pellet* após centrifugação (Agarwal et al., 2014).

O método de *Swim-Up* ou *Migração Ascendente de Espermatozoides* baseia-se na migração ascendente dos espermatozoides móveis ao longo do meio de cultura, pelo que espermatozoides com melhor motilidade dirigem-se contra a corrente e migram para a superfície do meio, havendo maior probabilidade de estar capacitados e serem morfológicamente normais (Figura 14). Apesar de ser uma técnica em que se obtém um menor rendimento de concentração comparativamente à lavagem simples, o *Swim-Up* seleciona os gametas pela sua motilidade, sendo uma técnica muito utilizada quando a percentagem de espermatozoides móveis na amostra é reduzida. É considerado um método relativamente simples e não muito dispendioso, daí a sua aplicação ser comum a nível mundial (Marzano et al., 2020). Não obstante, apresenta algumas desvantagens tais como: o rendimento espermático obtido é reduzido (\approx 5 a 10% dos espermatozoides no total da amostra); em processamentos de amostras com elevado volume ou concentração espermática, é necessário uma repartição da amostra em múltiplos tubos, como forma de manter grande a área de contacto do meio para migração; ocorre produção de ROS fruto da centrifugação e da consequente proximidade dos leucócitos e células inviáveis com os espermatozoides móveis no *pellet* após centrifugação; poderá obter-se uma concentração de espermatozoides móveis reduzida no caso da adição do meio de cultura na camada superior for elevada, uma vez que os espermatozoides podem não conseguir migrar eficientemente; e perante um período de incubação superior a 60 min, o rendimento de espermatozoides obtido pode reduzir devido aos efeitos da gravidade (Agarwal et al., 2014; Agarwal & Sharma, 2020; Baldini et al., 2021).

Na técnica de Centrifugação por Gradiente Descontínuo de Densidades, os espermatozoides são separados dos outros componentes do esperma com base na sua densidade. Espermatozoides morfológicamente normais apresentam uma ligeira maior densidade comparativamente aos espermatozoides anormais e imaturos, pelo que ao fazer passar o esperma por um gradiente de densidades é possível obter várias camadas contendo diferentes tipos celulares (Figura 14). Os espermatozoides móveis e funcionais migram ativamente contra o gradiente e são espectáveis de se concentrar na fração mais densa, no fundo do tubo. A amostra é centrifugada e o *pellet* é

aproveitado, sofrendo várias lavagens com meio suplementado. Consiste numa metodologia que permite obter um elevado rendimento de espermatozoides móveis livres de resíduos e células geradoras de ROS (Agarwal et al., 2014; Marzano et al., 2020).

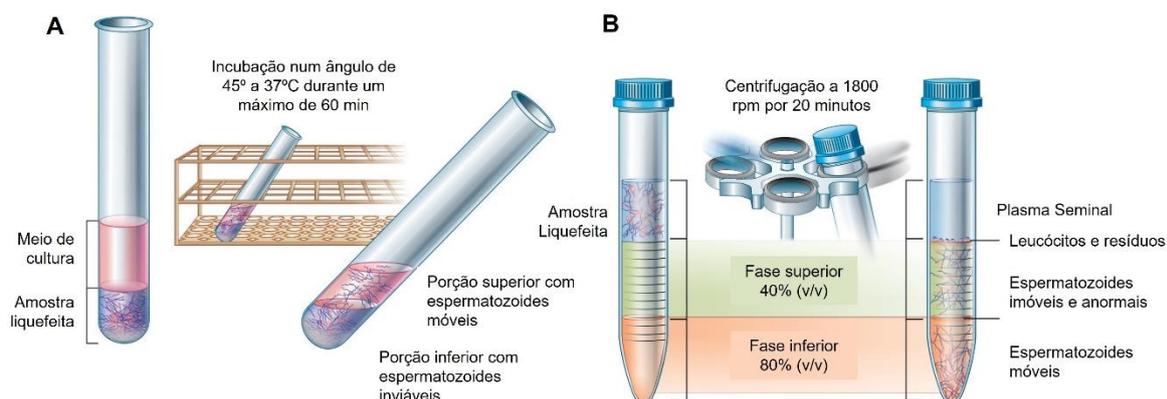


Figura 14: Técnicas de processamento espermático. **A:** Metodologia-padrão da técnica de Swim-up. **B:** Representação da técnica de Centrifugação por Gradiente Descontínuo de Densidades. Adaptado de (Agarwal et al., 2014).

Quando se comparam ambas as técnicas para determinar qual delas se apresenta como mais eficiente, os resultados são contraditórios. Apesar de estar estudado que a técnica de CGD possui um rendimento espermático superior comparativamente ao SU, alguns estudos afirmam que perante amostras viscosas o rendimento obtido por CGD se apresenta mais baixo, produzindo uma maior quantidade de ROS devido ao stress mecânico gerado, visto que a técnica requer mais etapas de centrifugação. Referem consecutivamente que a integridade do DNA recuperado por CGD não é tão elevada quanto após uma recuperação espermática por SU (Agarwal et al., 2014; Marzano et al., 2020). No entanto, outro estudo referiu que foram encontrados níveis de zinco superiores em amostras tratadas por SU comparativamente à CGD, o que permite inferir que a recuperação e isolamento do espermatozoides do plasma seminal por SU não é tão eficaz, podendo influenciar a produção de ROS (World Health Organization, 2010). Um estudo realizado com amostras normozoospémicas demonstrou que a técnica de CGD apresentou, comparativamente ao SU: maior hiperativação, mais oscilações de cálcio e uma maior fosforilação de tirosinas, permitindo inferir que os espermatozoides processados por este método apresentaram uma melhor capacitação (Hernández-Silva et al., 2021).

1.3.1. Amostra para uso na técnica de ICSI

Após análise espermática das amostras recolhidas por masturbação, as mesmas foram processadas de acordo com a técnica de SU para uso na técnica de ICSI. Inicialmente foi adicionado meio SPM, previamente aquecido, ao tubo contendo a amostra 1:1 (v/v). Após homogeneização, o tubo foi centrifugado a 2100 rpm por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 0.1 a 0.5mL de SPM. Após ressuspensão, foi adicionado lentamente 0.1 a 1mL de SPM, de forma a criar uma distinção entre ambas as fases do tubo. A amostra foi incubada a 37°C com 6% CO₂ por 30 a 60 minutos, pelo que o tubo foi colocado no interior da estufa com a tampa semiaberta para permitir a troca gasosa e posicionado diagonalmente a 45° para aumentar área de

contacto no seu interior, facilitando a migração ascendente dos espermatozoides móveis. O volume utilizado de SPM variou consoante o *pellet* obtido após centrifugação e o tempo disponível para incubação. Após incubação da amostra, ≈ 0.1 mL da porção superior do tubo foi aproveitada e analisada, para posterior utilização durante a ICSI.

Perante amostras de esperma criopreservadas, o procedimento realizado foi semelhante, à exceção de que numa fase inicial a palheta contendo o esperma foi deixada a descongelar à temperatura ambiente na câmara de fluxo laminar por 10 minutos. Casos excecionais em que as amostras descongeladas eram oligozoospermicas e a motilidade espectral não foi recuperada, procedeu-se apenas à lavagem simples da amostra, através da adição de SPM na proporção 1:1 (v/v), e sequente centrifugação por 7 minutos a 2100 rpm. O *pellet* foi ressuscitado em 0.1 mL de SPM de forma a obter uma maior concentração espermática para uso posterior.

1.3.2. Amostra para uso na técnica de IUI

Para uso em inseminações intrauterinas, a técnica de processamento utilizada foi a CGD. Foi preparado um tubo contendo duas suspensões coloidais de partículas de sílica revestidas com silano pré-aquecidas a 37°C, tendo sido adicionado primeiramente a suspensão de 80% (v/v) e posteriormente a de 40% (v/v). O volume adicionado de ambas as suspensões em conjunto correspondeu sempre ao volume total da amostra de esperma a processar. Mediante casos em que o volume do ejaculado foi superior a 2 mL, a técnica foi realizada paralelamente em dois tubos.

Após adição do esperma na porção superior, os tubos foram centrifugados a 1800 rpm por 20 minutos. Resultante da centrifugação inicial, apenas a porção presente na suspensão de 80% (v/v) foi aproveitada, pelo que todo o sobrenadante remanescente, contendo leucócitos, resíduos e espermatozoides inviáveis, foi descartado. Seguidamente, a amostra foi ressuscitada em SPM 1:1 (v/v) e centrifugada a 1300 rpm por 10 minutos. Esta etapa foi repetida e o *pellet* resultante ressuscitado em 0.5 mL de SPM. Transferiu-se a amostra processada para uma seringa pré-aquecida a 37°C e colocou-se a mesma no interior da estufa a 37°C e 6% CO₂, para ser posteriormente realizada a IUI.

1.3.3. Amostra obtida por metodologias cirúrgicas

No decorrer do estágio, todas as amostras obtidas cirurgicamente foram criopreservadas, não tendo sido usadas a fresco para tratamento. Após recolha, os fragmentos testiculares foram transportados para o laboratório em placas de Petri contendo 1 mL de SPM, onde foram macerados com o auxílio de duas lamelas, sob microscópio ótico, em placas aquecidas a 37°C (Figura 15). Após homogeneizar o tecido macerado com 1 mL de SPM, procedeu-se à observação no microscópio ótico de 10 μ L do fluído resultante numa lâmina, para verificar a presença de espermatozoides ou células germinativas imaturas. É importante que a pesquisa dos gâmetas seja realizada o mais breve possível após a biópsia dos fragmentos, para avaliar a necessidade de continuidade da biópsia.

Com uma pipeta de Pasteur, transferiu-se a totalidade do meio de preparação de gâmetas com tecido macerado para um tubo de fundo cônico estéril e guardou-se na estufa a 37 °C com 6% CO₂. Repetiu-se o processo para todos os fragmentos recolhidos, tendo o cuidado de identificar os tubos com tecido macerado em que tivesse sido confirmada a presença de gâmetas nas lâminas observadas, assim como o testículo no qual se procedeu à extração. As amostras foram centrifugadas a 1300 rpm por 10 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* foram ressuspensos em 0.5mL de SPM, tendo sido posteriormente criopreservados.

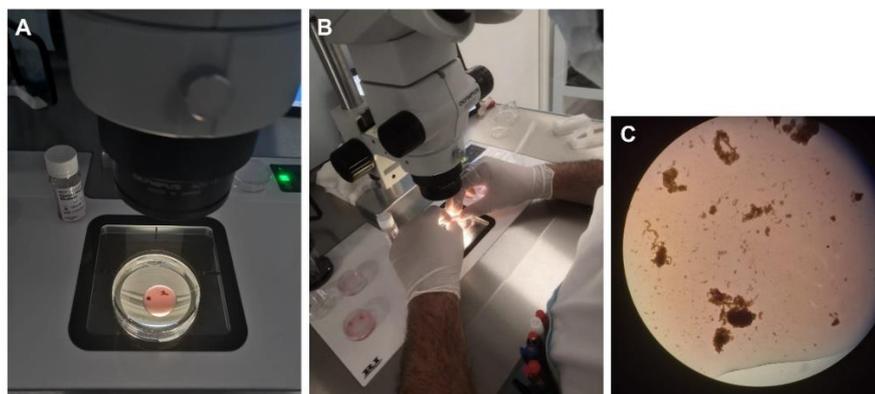


Figura 15: Processamento fragmentos obtidos por biópsia testicular. **A:** Placa de Petri contendo os fragmentos testiculares após extração. **B:** Dispersão mecânica dos túbulos seminíferos com o objetivo de soltar os espermatozoides presentes no seu interior. **C:** Túbulos seminíferos aquando maceração. Imagens capturadas na clínica Ferticentro e obtidas com autorização.

1.4. Criopreservação de gâmetas masculinos

O processo de criopreservação de esperma permite o armazenamento prolongado de amostras em azoto líquido, a -196°C, podendo ser efetuado por diversos motivos, nomeadamente: no ramo da preservação da fertilidade em casos de pacientes com problemas oncológicos que necessitem de realizar tratamentos gonadotóxicos como radioterapia e quimioterapia; indivíduos que tenham que se submeter a cirurgias que levem a disfunção ejaculatória ou falência testicular; no uso de tratamentos de PMA, seja por impossibilidade de poder realizar a recolha a fresco no dia da ICSI/ IIU, ou mediante a dinâmica do banco de doação de gâmetas (Raad et al., 2018; Rios & Botella, 2019).

Os espermatozoides humanos são células que toleram de forma razoável a diferença de temperatura, não sendo muito sensíveis ao choque térmico, possivelmente devido à elevada fluidez membranar e ao pouco teor de água intracelular que apresentam. No entanto sabe-se que expor estas células a temperaturas negativas baixas causa alterações morfológicas que poderão comprometer o caráter funcional dos gâmetas, nomeadamente a destruição de alguns organelos celulares resultantes da formação de cristais de gelo. Tal acontecimento culmina na oxidação de compostos celulares e consequente geração de ROS, com danificações na membrana plasmática, no acrossoma ou mesmo na integridade do DNA espermático (Hezavehei et al., 2018). Para além disso, sabe-se que a criopreservação possui efeitos deletérios na motilidade espermática, pelo que a percentagem de espermatozoides móveis pode decrescer entre 30-50% comparativamente aos valores da amostra de esperma antes de ser congelada (World Health Organization, 2021).

Sabendo que a integridade espermática é essencial para garantir a transferência do material genético paterno durante a fertilização, o meio utilizado na congelação possui substâncias crioprotetoras, cuja finalidade reside em proteger as estruturas celulares do stress mecânico e osmótico causado durante todo o procedimento. O glicerol é um dos crioprotetores permeáveis mais utilizado nos meios de congelamento, sendo capaz de penetrar na célula e aumentar a permeabilidade membranar. Ao possuir a capacidade de ligação com a água, este diminui o seu ponto de solidificação, impedindo a formação de cristais de gelo. Simultaneamente, os crioprotetores impermeáveis são compostos de elevado peso molecular que criam um aumento de osmolaridade no meio extracelular, promovendo a saída de água do interior dos espermatozoides, resultando na sua desidratação. É importante ter em conta que a presença de crioprotetores também pode refletir stress osmótico e toxicidade para os gâmetas, perante níveis superiores à sua concentração ideal de ação (Rios & Botella, 2019; Sieme et al., 2016).

Ao longo do estágio curricular, o processo de criopreservação baseou-se no uso de uma solução de congelamento contendo glicerol e sacarose, de acordo com o protocolo do fabricante através da técnica de congelamento rápido. Esta metodologia difere da congelação lenta na medida em que é um processo mais rápido, não requer equipamentos de arrefecimento específicos e envolve apenas a colocação das amostras sob vapores de azoto, seguidas de imersão em azoto líquido. Estudos permitiram inferir que o congelamento rápido reduz as mudanças ultra estruturais dos gâmetas masculinos durante o processo de criopreservação e a integridade do DNA é mantida, comparativamente ao congelamento lento (Hu et al., 2020; Rahiminia et al., 2017; Rios & Botella, 2019; Sieme et al., 2016; Tao et al., 2020).

Num tubo estéril de fundo cónico, após liquefação e avaliação espermática, o esperma foi diluído em meio de congelação⁵ 1:1 (v/v), à temperatura ambiente. Perante amostras previamente processadas, o volume de amostra de esperma correspondeu ao volume capacitado após a técnica de processamento. O meio foi adicionado gota a gota de forma cuidadosa, para impedir que tal mudança osmótica causasse plasmólise e turgescência sucessivas nos espermatozoides, que poderiam afetar a integridade dos organelos celulares (Tao et al., 2020). A solução foi misturada após adição da solução crioprotetora. Após 10 minutos de repouso no interior da câmara de fluxo laminar, recorreu-se à contagem da concentração e motilidade espermática, tendo-se posteriormente distribuído 0.5 mL da solução por cada palheta de criopreservação. Estas foram seladas por calor e suspensas horizontalmente a vapores de azoto líquido, por 30 minutos. Após esse período, as palhetas foram submersas em azoto líquido e armazenadas nos tanques de criopreservação.

⁵ Sperm Freezing Medium, Origio ®: Meio utilizado no congelamento de gâmetas masculinos. Contém entre outros componentes glicerol e sacarose (agentes crioprotetores); glicina (melhora a motilidade dos espermatozoides após o descongelamento); sêrum sintético de substituição (suporta a viabilidade espermática) (Origio, 2006a).

III. Exposição e Discussão de Atividades Realizadas

I. Laboratório de Andrologia

No período inicial do estágio curricular, após um período observacional de execução das técnicas de andrologia, fez-se uso de amostras seminais excedentes do respetivo dia, como forma de treinar a execução dos protocolos de avaliação espermática estabelecidos na Ferticentro. Após obtenção de parecer positivo por parte de todos os embriologistas, os protocolos começaram a ser realizados na íntegra, envolvendo todo o procedimento de análise espermática, incluindo a receção da amostra, análise macroscópica e microscópica, e elaboração do relatório de espermograma com o diagnóstico final. A garantia de qualidade dos resultados esteve sempre assegurada, através de análises complementares inter-observador por parte dos embriologistas da clínica, em simultâneo e quando necessário, nomeadamente para a avaliação da morfologia espermática. De forma autónoma, foram analisadas cerca de 70 amostras de esperma a fresco, o que permitiu, de uma forma generalizada, não só consolidar os conhecimentos teóricos inerentes à análise seminal, bem como estabelecer ferramentas práticas na execução de análise das mesmas. Relativamente aos testes complementares de avaliação espermática, o protocolo seguido foi de acordo com o estabelecido pela Ferticentro e pelo fabricante dos kits utilizados nas respetivas técnicas, tendo sido realizados cerca de 10 testes de integridade do DNA espermático.

No que diz respeito à criopreservação de gâmetas masculinos, após desenvolvimento de autonomia na realização do protocolo foram executadas cerca de 90 criopreserções de esperma, 20 delas no contexto de doações para o banco de gâmetas, sendo as restantes relativas a amostras espermáticas cujo objetivo da congelação estaria relacionado com a preservação da fertilidade e situações em que não foi possível conciliar o momento da recolha de esperma com o momento da utilização da amostra. Em 3 biópsias testiculares observadas e mediante supervisão dos embriologistas, procedeu-se à pesquisa de gâmetas masculinos, bem como ao processamento da amostra e posterior criopreservação. A posterior descongelação e recuperação das amostras para uso em ciclos de IIU e ICSI permitiu comprovar a proficiência do respetivo protocolo.

Em ciclos de IIU, procedeu-se à execução do protocolo cerca de 60 vezes, englobando 57 amostras para Inseminações Artificiais de Dador (IAD's) e 3 amostras para Inseminações Artificiais Conjugais (IAC's). Destes 60 ciclos, 13 resultaram em gravidez bioquímica, sendo que 11 foram comprovadas clinicamente com ecografia transvaginal, permitindo inferir que 9 mulheres apresentaram 1 saco gestacional e 2 mulheres apresentaram uma gravidez evolutiva gemelar.

Relativamente aos ciclos de ICSI, foram processadas aproximadamente 180 amostras, sendo 76 referentes a amostras espermáticas criopreservadas provenientes do banco de gâmetas da Ferticentro e de bancos externos (Tabela 5).

Tabela 5: Quadro sumário dos procedimentos realizados relativamente ao tratamento de amostras espermáticas EP ou ECD para utilização em ciclos de ICSI. EP – Esperma próprio; ECD – Esperma criopreservado de dador.

	EP	ECD
Ciclo próprio	24 ciclos	36 ciclos
Ciclo de doação de Ovócitos	82 ciclos	40 ciclos
Total		182 ciclos

Tabela 6: Quadro sumário dos protocolos realizados e competências desenvolvidas no laboratório de andrologia durante o período do estágio curricular: ● – protocolo executado com autonomia; ● – protocolo realizado com supervisão; ● – protocolo apenas observado.

Autonomia na execução do protocolo			
Análise Espermática	Avaliação Macroscópica	Liquefação	●
		pH	●
		Volume	●
		Viscosidade	●
		Aspeto	●
		Cheiro	●
	Avaliação Microscópica	Concentração	●
		Motilidade	●
		Morfologia	●
		Vitalidade	●
	Avaliação Complementar	Teste de Fragmentação de DNA espermático	●
		Teste de ligação ao Ácido Hialurónico	●
Processamento dos gâmetas masculinos	Processamento de amostras obtidas por ejaculação		●
	Processamento de amostras criopreservadas		●
	Processamento de amostras testiculares obtidas por biópsia		●
	Processamento de amostras para Inseminação Intrauterina		●
	Processamento de amostras pra ICSI		●
	Criopreservação de espermatozoides		●

2. Laboratório de Embriologia

No laboratório de embriologia, a componente foi totalmente observacional, não tendo sido desenvolvida autonomia na execução dos protocolos, no entanto, sempre que possível foram preparados meios e placas necessários para as variadas técnicas, com o objetivo de estabelecer um

melhor contacto com os respetivos protocolos. Durante a realização das punções foliculares, auxiliou-se o embriologista na distribuição dos tubos contendo líquido folicular pelas placas de Petri presentes na placa aquecida no interior da câmara de fluxo laminar, com o máximo de rapidez e condições de assepsia possível. Por vezes, foram avaliadas ao estereoscópio placas de Petri contendo líquido folicular, para analisar células da granulosa e pesquisar CCO, recorrendo à sua extração com uma pipeta de vidro, se aplicável. Sempre que possível após punção, como forma de adquirir habilidade técnica de execução, treinou-se a clivagem de células do *cumulus* e *corona radiata* com agulhas, através de restos celulares já extraídos.

Durante todo o período de estágio na Ferticentro nunca foi observado o protocolo de FIV convencional, visto ser um procedimento apenas utilizado quando a equipa médica o indica, pelo que a ICSI foi a técnica-padrão utilizada. O protocolo de ICSI, apesar de observado, não foi executado na íntegra, no entanto, recorreu-se por vezes à manipulação de ovócitos degenerados e imaturos em placas de 4 poços, como forma de iniciar um contacto com as micropipetas de desnudação de diferentes diâmetros (entre 135 e 200 μm), permitindo adquirir um treino e habituação a tal material, visto que é necessária uma elevada precisão na manipulação destes gâmetas.

A avaliação da fertilização e desenvolvimento embrionário foram sempre responsabilidade dos biólogos residentes, pelo que não foi adquirido treino suficiente para desenvolver autonomia para proceder com esta avaliação. No entanto, foi possível assistir à observação e avaliação dos embriões através da tecnologia *time-lapse imaging*, permitindo, ainda que poucas vezes, o treino de avaliação da fertilização e primeiros dias de desenvolvimento embrionário, recorrendo a embriões já avaliados em ciclos anteriores, onde foi possível observar a evolução do embrião e a ocorrência de alterações frequentes no padrão de divisão embrionária.

Os protocolos de transferência e biópsia embrionária foram observados e realizados pelos embriologistas do laboratório, pelo que, apesar de não ter sido desenvolvida autonomia na sua execução, o contacto com estas técnicas que requerem formação específica permitiu uma aprendizagem na interpretação dos casos clínicos dos pacientes.

3. Laboratório de Criobiologia

O protocolo de congelamento e descongelamento de ovócitos e embriões foi observado em algumas ocasiões, no contexto de transferências de embriões criopreservados, doação de gâmetas e ciclos de ICSI que tenham originado ovócitos e/ou embriões supranumerários, com qualidade suficiente para serem criopreservados. Desta forma, não foi desenvolvido trabalho autónomo na realização destes protocolos, à exceção do protocolo de criopreservação de espermatozoides, anteriormente descrito na secção do laboratório de Andrologia.

IV. Considerações Finais

A reprodução humana consiste num fenómeno complexo, que engloba múltiplos processos passíveis de falha tornando assim evidente que a infertilidade conjugal seja considerada uma realidade tão preocupante na atualidade. Estamos perante um grave problema de saúde pública, na qual cada vez mais casais recorrem aos Serviços de Reprodução Humana e a Clínicas de Fertilidade com o objetivo de encontrar uma possível solução para as patologias associadas à reprodução.

Neste sentido, a investigação científica motivada pela constante busca de conhecimento nas mais variadas áreas como a fisiologia, o metabolismo e a genética, torna a Procriação Medicamente Assistida uma área em constante evolução e expansão, com o objetivo de oferecer mais e melhores opções de tratamento. A aplicação deste conhecimento permite tornar os gâmetas e embriões mais competentes, contornando algumas das adversidades que ocorrem *in vivo* e possibilitando maiores taxas de sucesso, nomeadamente através da implementação de técnicas inovadoras, cuja finalidade colmata na obtenção de uma gravidez e possibilidade de gerar descendência àqueles que tanto a desejam.

Trazendo para este capítulo final uma abordagem focada na Andrologia, sabe-se que o espermatozoide é um elemento obrigatório para que se garanta descendência, daí a sua importância e destaque nesta área científica. Assim sendo, além de garantir que existem espermatozoides disponíveis para utilizar em técnicas de PMA, é também de maior importância garantir que se seleciona os gâmetas considerados cientificamente mais viáveis. Para garantir a disponibilidade dos gâmetas masculinos, surge a necessidade de os armazenar.

A implementação e aperfeiçoamento dos protocolos de criopreservação constitui uma mais-valia para os atuais centros de PMA, através da aplicação corrente da criopreservação de gâmetas femininos e masculinos no ramo da preservação da fertilidade. Em indivíduos masculinos, esta temática revelou ser um enorme alívio no caso de necessidade da realização de tratamentos gonadotóxicos fruto de patologias oncológicas que possam colocar em risco a viabilidade dos espermatozoides. Desta forma, a congelação de esperma é realizada anteriormente ao tratamento gonadotóxico, não envolvendo custos para o doente e permitindo que este utilize no futuro o seu material genético livre da exposição a substâncias potencialmente mutagénicas.

Perante casos de impossibilidade de ejaculação e azoospermia obstrutiva, a criopreservação de tecido testicular por meio de biópsia garante uma alternativa à criopreservação de esperma após ejaculação. Crianças ou jovens pré-púberes na qual ainda não foi atingida a maturidade sexual, apenas conseguem preservar a sua fertilidade mediante a criopreservação de tecido testicular.

Os programas de doação de gâmetas femininos e masculinos têm beneficiado bastante com as metodologias de criopreservação, uma vez que constituem programas correntemente utilizados nos laboratórios de PMA atuais para uso em tratamentos de casais cujo homem possua azoospermia não obstrutiva, perante casos de falência ovárica precoce ou mesmo casais de mulheres.

No entanto, além de garantir a disponibilidade dos gâmetas masculinos é também importante garantir que os espermatozoides armazenados são os mais viáveis e prováveis de garantir sucesso num tratamento de PMA. Neste sentido, existe a elevada necessidade de analisar e processar estes gâmetas, quer seja para uso em tratamentos a fresco, quer em contexto de armazenamento. O processamento de esperma na Procriação Medicamente Assistida permite aos profissionais lavar, observar, tratar e selecionar aqueles que serão os gâmetas a utilizar nas técnicas de PMA. Este processamento consiste numa área da qual existe bastante investigação, em que o objetivo se baseia na obtenção de amostras com a melhor qualidade possível, utilizando técnicas que sejam cada vez mais eficazes na separação dos constituintes do esperma e menos nocivas para as células.

Esta investigação possui uma vigilância permanente por parte da Organização Mundial de Saúde, que de tempos em tempos quando a investigação evolui e se atinge consenso científico sobre as várias técnicas de processamento, emite manuais que se tomam referência a nível mundial. Como resultado, estas publicações permitem não só atualizar a comunidade científica e empresarial com o estado da arte na ciência, mas também, através da análise demográfica internacional, estabelecer aqueles que serão os critérios de classificação das amostras e dar aos especialistas ferramentas como os pontos de cisão e a nomenclatura de diagnóstico, garantindo a validade científica dos procedimentos bem como dos diagnósticos que são atribuídos em clínicas, centros e hospitais mundialmente.

Em suma, e fazendo uma análise retrospectiva desde o nascimento de Louise Brown, àquela que era a ciência na altura e tendo em conta a evolução desde então a nível de protocolos, materiais, equipamentos e demais consumíveis utilizados nos laboratórios de Reprodução Medicamente Assistida, é de especular que os próximos anos tragam consigo grandes descobertas nesta área da ciência. Também com o resultado do ultrapassar dos estigmas sociais associados à infertilidade, e do aumento da confiança na ciência e dos seus métodos, observar-se-á um aumento na procura dos tratamentos da infertilidade, situação já relatada nos dias de hoje. Estes fatores associados ao avanço da tecnologia estabelecerão sinergicamente a potencialização da investigação na área, da qual resultarão soluções sobre as quais algumas já se especula, e outras nem se imagina.

Como forma de encerrar este relatório, torna-se de extrema relevância lembrar, não só para aqueles que nesta área já exercem o seu caminho profissional como para aqueles que nele pretendem integrar, que com toda a responsabilidade e orgulho têm nas suas mãos a capacidade de trazer para o mundo a mais importante das posses, a Vida. E nada mais há de gratificante que isto.

V. Referências Bibliográficas

- Agarwal, A., Majzoub, A., & Esteves, S. C. (2021). *Manual of Sperm Retrieval and Preparation in Human Assisted Reproduction* (A. Agarwal, A. Majzoub, & S. C. Esteves (eds.); 1st ed.). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781108867245>
- Agarwal, A., & Sharma, R. (2020). Sperm Processing and Selection. In *Male Infertility* (pp. 647–659). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-32300-4_52
- Agarwal, A., Sharma, R., & Beydola, T. (2014). Sperm Preparation and Selection Techniques. In *Medical and Surgical Management of Male Infertility* (pp. 244–244). Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd. https://doi.org/10.5005/jp/books/11840_29
- Allahbadia, G. N., & Merchant, R. (2012). Intrauterine Insemination. In Z. P. Nagy, A. C. Varghese, & A. Agarwal (Eds.), *Practical Manual of In Vitro Fertilization* (1st ed., pp. 281–296). Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1780-5>
- Amaral, S., Tavares, R. S., Escada-Rebelo, S., Silva, A. F., & Ramalho-Santos, J. (2018). Mammalian Sperm Mitochondrial Function as Affected by Environmental Toxicants, Substances of Abuse, and Other Chemical Compounds. In *Mitochondrial Dysfunction Caused by Drugs and Environmental Toxicants* (pp. 185–203). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781119329725.ch11>
- Assumpção, C. R. L. de. (2014). Falência Ovárica Precoce. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 58(2), 132–143. <https://doi.org/10.1590/0004-2730000002991>
- Baldini, D., Ferri, D., Baldini, G. M., Lot, D., Catino, A., Vizziello, D., & Vizziello, G. (2021). Sperm Selection for ICSI: Do We Have a Winner? *Cells*, 10(12), 3566. <https://doi.org/10.3390/cells10123566>
- Beeder, L. A., & Samplaski, M. K. (2020). Effect of antidepressant medications on semen parameters and male fertility. *International Journal of Urology*, 27(1), 39–46. <https://doi.org/10.1111/iju.14111>
- Cardona-Maya, W., Berdugo, J., & Cadavid, A. (2008). Comparación de la concentración espermática usando la cámara de Makler y la cámara de Neubauer. *Acta Urológica Española*, 32(4), 443–445. https://doi.org/ISSN_0210-4806
- Carvalho, J. L. S., & Santos, A. (2009). *Estudo AFRODITE: Caracterização da Infertilidade em Portugal – Estudo na Comunidade*.
- Chen, S.-U., Ho, H.-N., Chen, H.-F., Huang, S.-C., Lee, T.-Y., & Yang, Y.-S. (1996). *Andrology*:

- Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for severe semen abnormalities: dissecting the tail of spermatozoa at the tip. *Human Reproduction*, 11(12), 2640–2644. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a019185>
- Chohan, K. R., Griffin, J. T., Lafromboise, M., De Jonge, C. J., & Carrell, D. T. (2006). Comparison of Chromatin Assays for DNA Fragmentation Evaluation in Human sperm. *Journal of Andrology*, 27(1), 53–59. <https://doi.org/10.2164/jandrol.05068>
- CNPMA. (2020). PMA em Portugal [Fact sheet]. In *Conselho Nacional De Procriação Medicamente Assistida*. <https://www.cnpma.org.pt/cidadaos>
- CNPMA. (2021). *Relatório de Atividade desenvolvida pelos centros de PMA em 2018*.
- Costa e Sousa, D. (2016). *Técnicas de Reprodução Humana Assistida para o Tratamento da Infertilidade*. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- Coward, R. M., & Mills, J. N. (2017). A step-by-step guide to office-based sperm retrieval for obstructive azoospermia. *Translational Andrology and Urology*, 6(4), 730–744. <https://doi.org/10.21037/tau.2017.07.15>
- Darszon, A., Nishigaki, T., Wood, C., Treviño, C. L., Felix, R., & Beltrán, C. (2005). Calcium Channels and Ca²⁺ Fluctuations in Sperm Physiology. *International Review of Cytology*, 243, 79–172. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(05\)43002-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(05)43002-8)
- De Geyter, C. (2019). Assisted reproductive technology: Impact on society and need for surveillance. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 33(1), 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2019.01.004>
- Deshmukh, R. K., & Siva, A. B. (2017). Sperm Capacitation: The Obligate Requirement for Male Fertility. In *Male Infertility: Understanding, Causes and Treatment* (1st ed., pp. 47–66). Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-4017-5>
- Deyhoul, N., Mohamaddoost, T., & Hosseini, M. (2017). Infertility-Related Risk Factors: A Systematic Review. *International Journal of Women's Health and Reproduction Sciences*, 5(1), 24–29. <https://doi.org/10.15296/ijwhr.2017.05>
- Dhole, B., & Kumar, A. (2017a). Spermatogenesis. In *Basics of Human Andrology* (pp. 135–160). © Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3695-8_10
- Dhole, B., & Kumar, A. (2017b). The Testis. In *Basics of Human Andrology* (pp. 3–15). © Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3695-8_1
- Direkvand-Moghadam, A., Delpisheh, A., & Khosravi, A. (2013). Epidemiology of Female Infertility; A Review of Literature. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 10(2), 559–567. <https://doi.org/10.13005/bbra/1165>

- Drobnis, E. Z., & Nangia, A. K. (2017). Psychotropics and Male Reproduction. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1034, 63–101. https://doi.org/10.1007/978-3-319-69535-8_8
- ESHRE. (2018). More than 8 million babies born from IVF since the world's first in 1978: European IVF pregnancy rates now steady at around 36 percent, according to ESHRE monitoring. *Science Daily*. www.sciencedaily.com/releases/2018/07/180703084127.htm
- ESHRE. (2022). *Assisted Reproductive Technologies - ART [Fact Sheet]* (p. 2). © European Society of Human Reproduction and Embryology.
- Evenson, D., & Wixon, R. (2006). Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reproductive BioMedicine Online*, 12(4), 466–472. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)62000-7](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)62000-7)
- Farquhar, C. M., Bhattacharya, S., Repping, S., Mastenbroek, S., Kamath, M. S., Marjoribanks, J., & Boivin, J. (2019). Female subfertility. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 7. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0058-8>
- Fernández, J. L., Cajjgal, D., López-Fernández, C., & Gosálvez, J. (2011). Assessing Sperm DNA Fragmentation with the Sperm Chromatin Dispersion Test. *Methods in Molecular Biology*, 682, 291–301. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-409-8_21
- Fernández, J. L., Muriel, L., Rivero, M. T., Goyanes, V., Vazquez, R., & Alvarez, J. G. (2003). The Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Method for the Determination of Sperm DNA Fragmentation. *Journal of Andrology*, 24(1), 59–66. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02641.x>
- Fernandez, J., Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosálvez, J., Enciso, M., Lafromboise, M., & Dejonge, C. (2005). Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertility and Sterility*, 84(4), 833–842. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.11.089>
- Ferreira, J. G. (2020). *Métodos de Seleção de Espermatozoides Viáveis para Reprodução Medicamente Assistida*. Universidade de Évora.
- Garolla, A., Pizzol, D., Carosso, A. R., Borini, A., Ubaldi, F. M., Calogero, A. E., Ferlin, A., Lanzone, A., Tomei, F., Engl, B., Rienzi, L., De Santis, L., Coticchio, G., Smith, L., Cannarella, R., Anastasi, A., Menegazzo, M., Stuppia, L., Corsini, C., & Foresta, C. (2021). Practical Clinical and Diagnostic Pathway for the Investigation of the Infertile Couple. *Frontiers in Endocrinology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.591837>
- Gilbert, S. F., & Barresi, M. J. F. (2020). Fertilization: Beginning a New Organism. In *Developmental Biology* (12th ed.). Oxford University Press.

- Gonçalves, J. (2005). Avaliação do casal infértil. *Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar*, 21(5), 493–503. <https://doi.org/https://doi.org/10.32385/rpmgf.v21i5.10173>
- Gupta, S., & Kumar, A. (2017). The Human Semen. In *Basics of Human Andrology* (pp. 163–170). © Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3695-8_11
- Hakim, R. B., Gray, R. H., & Zacur, H. (1998). Alcohol and Caffeine consumption and decreased fertility. *Fertility and Sterility*, 70(4), 632–637. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(98\)00257-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(98)00257-X)
- Halotech DNA S.L. (2019). *Halosperm G2 [Instructions for use]* (pp. 1–3). www.halotechdna.com
- Hao, S. L., Ni, F. Da, & Yang, W.-X. (2019). The dynamics and regulation of chromatin remodeling during spermiogenesis. *Gene*, 706, 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.05.027>
- Harris-Glocker, M., & McLaren, J. F. (2013). Role of female pelvic anatomy in infertility. *Clinical Anatomy*, 26(1), 89–96. <https://doi.org/10.1002/ca.22188>
- Hassold, T., & Hunt, P. (2009). Maternal age and chromosomally abnormal pregnancies: what we know and what we wish we knew. *Current Opinion in Pediatrics*, 21(6), 703–708. <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e328332c6ab>
- Hernández-Silva, G., López-Torres, A. S., Maldonado-Rosas, I., Mata-Martínez, E., Larrea, F., Torres-Flores, V., Treviño, C. L., & Chirinos, M. (2021). Effects of Semen Processing on Sperm Function: Differences between Swim-Up and Density Gradient Centrifugation. *The World Journal of Men's Health*, 39(4), 740. <https://doi.org/10.5534/wjmh.200115>
- Hezavehei, M., Sharafi, M., Kouchesfahani, H. M., Henkel, R., Agarwal, A., Esmaeili, V., & Shahverdi, A. (2018). Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive BioMedicine Online*, 37(3), 327–339. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012>
- Hu, H., Ji, G., Shi, X., Liu, R., Zhang, J., Zhang, H., Yuan, X., Zhang, G., Yuan, W., & Li, M. (2020). Comparison of rapid freezing versus vitrification for human sperm cryopreservation using sucrose in closed straw systems. *Cell and Tissue Banking*, 21(4), 667–673. <https://doi.org/10.1007/s10561-020-09860-1>
- INE. (2022a). *Indicadores de Fecundidade: Índice Sintético de Fecundidade e Taxa Bruta de Reprodução*. Instituto Nacional de Estatística, IP - Portugal. www.ine.pt
- INE. (2022b). *Índice de Envelhecimento em Portugal*. Instituto Nacional de Estatística, IP - Portugal. www.ine.pt
- Jonsson, M., Linse, S., Frohm, B., Lundwall, Å., & Malm, J. (2005). Semenogelins I and II bind zinc and regulate the activity of prostate-specific antigen. *Biochemical Journal*, 387(2), 447–453. <https://doi.org/10.1042/BJ20041424>

- Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2013). Aparelho Reprodutor Masculino. In Guanabara Koogan (Ed.), *Histologia Básica: Texto e Atlas* (12th ed., pp. 411–426). McGraw-Hill Medical.
- Kalmbach, K. H., Fontes Antunes, D. M., Dracxler, R. C., Knier, T. W., Seth-Smith, M. L., Wang, F., Liu, L., & Keefe, D. L. (2013). Telomeres and Human Reproduction. *Fertility and Sterility*, *99*(1), 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.11.039>
- Lampiao, F., & du Plessis, S. S. (2008). Insulin and leptin enhance human sperm motility, acrosome reaction and nitric oxide production. *Asian Journal of Andrology*, *10*(5), 799–807. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2008.00421.x>
- Lin, Y., Mahan, K., Lathrop, W. F., Myles, D. G., & Primakoff, P. (1994). A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *Journal of Cell Biology*, *125*(5), 1157–1163. <https://doi.org/10.1083/jcb.125.5.1157>
- Lourenço, B., Sousa, A. P., Almeida-Santos, T., & Ramalho-Santos, J. (2014). Relation of cumulus cell status with single oocyte maturity, fertilization capability and patient age. *Journal of Reproduction & Infertility*, *15*(1), 15–21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24696155>
- Marzano, G., Chiriaco, M. S., Primiceri, E., Dell'Aquila, M. E., Ramalho-Santos, J., Zara, V., Ferramosca, A., & Maruccio, G. (2020). Sperm selection in assisted reproduction: A review of established methods and cutting-edge possibilities. *Biotechnology Advances*, *40*, 107498. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107498>
- Mendes, M. F., Infante, P., Afonso, A., Maciel, A., Ribeiro, F., Tomé, L. P., & Freitas, R. B. de. (2016). *Determinantes da Fecundidade em Portugal* (Fundação Francisco Manuel dos Santos (ed.); 1st ed.). Guide – Artes Gráficas, Lda.
- Nandedkar, T. D. (2017a). Testicular Hormones. In *Basics of Human Andrology* (pp. 101–115). © Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3695-8_8
- Nandedkar, T. D. (2017b). Testicular Hormones. In *Basics of Human Andrology: A Textbook* (1st ed., pp. 101–116). © Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-3695-8>
- Neto, F. T. L., Bach, P. V., Najari, B. B., Li, P. S., & Goldstein, M. (2016). Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *59*, 10–26. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.04.009>
- Origio. (2006a). *Sperm Freezing Medium [Safety Data Sheet]* (pp. 1–3). Cooper Surgical.
- Origio. (2006b). *SPM - Sperm Preparation Medium [Safety Data Sheet]* (pp. 1–3). Cooper Surgical. https://fertility.coopersurgical.com/art_media/sperm-preparation-medium/
- Origio. (2016). *Instructions for Use: HBA® Sperm-Hyaluronan Binding Assay*. Cooper Surgical. www.hba-picsi.com

- Papale, L., Fiorentino, A., Montag, M., & Tomasi, G. (2012). The zygote. *Human Reproduction*, 27, 22–49. <https://doi.org/10.1093/humrep/des205>
- Pereira, N., & Palermo, G. D. (2018). Intracytoplasmic Sperm Injection: History, Indications, Technique, and Safety. In *Intracytoplasmic Sperm Injection* (pp. 9–21). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-70497-5_2
- Raad, G., Lteif, L., Lahoud, R., Azoury, J., Azoury, J., Tanios, J., Hazzouri, M., & Azoury, J. (2018). Cryopreservation media differentially affect sperm motility, morphology and DNA integrity. *Andrology*, 6(6), 836–845. <https://doi.org/10.1111/andr.12531>
- Rahiminia, T., Hosseini, A., Anvari, M., Ghasemi-Esmailabad, S., & Talebi, A. R. (2017). Modern human sperm freezing: Effect on DNA, chromatin and acrosome integrity. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 56(4), 472–476. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2017.02.004>
- Ramalho-Santos, J. (2014). Sins of the fathers: sperm DNA damage in the context of assisted reproduction. *Human Reproduction*, 29(11), 2356–2358. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu229>
- Rashki Ghaleno, L., Rezazadeh Valojerdi, M., Chehrazi, M., Sahraneshin Samani, F., & Salman Yazdi, R. (2016). Hyaluronic Acid Binding Assay Is Highly Sensitive to Select Human Spermatozoa with Good Progressive Motility, Morphology, and Nuclear Maturity. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 81(3), 244–250. <https://doi.org/10.1159/000439530>
- Rathke, C., Baarends, W. M., Awe, S., & Renkawitz-Pohl, R. (2013). Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1839(3), 155–168. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.08.004>
- Rios, A. P., & Botella, I. M. (2019). Description and Outcomes of Current Clinical Techniques for Sperm Cryopreservation. *European Medical Journal*, 7(1), 79–92.
- 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*, dmv050. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv050>
- Sadler, T. W. (2016). *Langman: Embriologia Médica* (Guanabara Koogan (ed.); 13th ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
- Santos, P. R. dos. (2013). *Laboratórios de Andrologia e Embriologia em Procriação Medicamente Assistida*. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- Sathananthan, A. H. (2013). Ultrastructure of human gametes, fertilization and embryos in assisted reproduction: A personal survey. *Micron*, 44, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2012.05.002>
- Sharma, & Kumar, A. (2017). The Sperm. In *Basics of Human Andrology* (pp. 171–204). © Springer

- Nature. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3695-8_12
- Sharma, S., Kumar, A., & Gupta, D. K. (2017). Development of the Male Gonad. In *Basics of Human Andrology* (pp. 67–76). © Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3695-8_6
- Sherwood, L., & Ward, C. (2019). The Reproductive System. In Nelson Education (Ed.), *Human Physiology: From Cells to Systems* (4th ed., pp. 723–778). Cengage Learning.
- Shier, D., Jackie, B., & Ricki, L. (2018). The Human Life Cycle. In *Hole's Essentials of Human Anatomy and Physiology* (13th ed., pp. 518–569). McGraw-Hill Education.
- Sieme, H., Oldenhof, H., & Wolkers, W. F. (2016). Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal Reproduction Science*, *169*, 2–5. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.004>
- Sigma-Aldrich. (2020). *Hemacolor® Rapid staining of blood smear*. EMD Millipore Corporation. www.microscopy-products.com.
- Sigma-Aldrich. (2021). *Eosin Y-solution 0.5% aqueous for microscopy [Safety Data Sheet]* (pp. 1–11). EMD Millipore Corporation.
- Silverthorn, D. U. (2019). Reproduction and Development. In *Human Physiology: An Integrated Approach* (8th ed., pp. 800–837). Pearson Education Inc.
- Simon, L., Emery, B., & Carrell, D. T. (2019). Sperm DNA Fragmentation: Consequences for Reproduction. In *Genetic Damage in Human Spermatozoa* (pp. 87–105). Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21664-1_6
- Siu, K. K., Serrão, V. H. B., Ziyat, A., & Lee, J. E. (2021). The cell biology of fertilization: Gamete attachment and fusion. *Journal of Cell Biology*, *220*(10). <https://doi.org/10.1083/jcb.202102146>
- Soares, S., Rodrigues, T., & Barros, H. (2011). Prevalência de Infertilidade na Cidade do Porto. *Acta Médica Portuguesa*, *24*(5), 699–706.
- Tao, Y., Sanger, E., Saewu, A., & Leveille, M.-C. (2020). Human Sperm Vitrification: the state of the art. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *18*(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s12958-020-00580-5>
- Tauber, P. F., Zaneveld, L. J. D., Propping, D., & Schumacher, G. F. B. (1975). Components of Human Split Ejaculates. *Reproduction and Fertility*, *43*(2), 249–267. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0430249>
- Thomas, N. S. (2001). Maternal sex chromosome non-disjunction: evidence for X chromosome-specific risk factors. *Human Molecular Genetics*, *10*(3), 243–250. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.3.243>
- Van Ahlen, H., & Kliesch, S. (2010). Disorders of Erection, Cohabitation, and Ejaculation. In

- Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction* (3rd ed., pp. 279–322). © Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-78355-8>
- Van den Bergh, M., Bertrand, E., Biramane, J., & Englert, Y. (1995). Importance of breaking a spermatozoon's tail before intracytoplasmic injection: a prospective randomized trial. *Human Reproduction*, *10*(11), 2819–2820. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a135798>
- Vander Borgh, M., & Wyns, C. (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical Biochemistry*, *62*, 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.CLINBIOCHEM.2018.03.012>
- Velaers, A., Paternot, G., Debrock, S., D'Hooghe, T., & Spiessens, C. (2012). Triple touch sperm immobilization vs. single touch sperm immobilization in ICSI - a randomised trial. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *10*(1), 65. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-65>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0696-2>
- WHO. (2020). *Infertility [Fact Sheet]*. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility>
- World Health Organization. (2010). *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen* (5th ed.). © World Health Organization 2021.
- World Health Organization. (2021). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen* (6th ed.). © World Health Organization 2021. http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547789_eng.pdf
- Yokoo, M., & Sato, E. (2004). Cumulus–Oocyte Complex Interactions During Oocyte Maturation. In *International Review of Cytology* (Vol. 235, pp. 251–291). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)35006-0](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)35006-0)
- 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. *Human Reproduction*, *32*(9), 1786–1801. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex234>