



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Daniela Simões Morais

TÉCNICAS DE PROcriação MEDICAMENTE ASSISTIDA

Relatório de estágio no âmbito do Mestrado em Bioquímica, orientado pela Doutora Ana Catarina Correia da Silva, apresentado ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Julho de 2021

Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra

Técnicas De Procriação Medicamente Assistida

Daniela Simões Morais

Relatório de estágio no âmbito do Mestrado em Bioquímica, orientado pela Doutora Ana Catarina Correia da Silva, apresentado ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Julho de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Agradecimentos

Primeiramente, um especial agradecimento à clínica Ferticentro, notadamente ao Dr Vladimiro Silva e à Dr^a Inês Cerdeira por me terem possibilitado a realização de um estágio laboratorial na área da Medicina da Reprodução, apesar do momento atípico que estamos a viver, motivado por uma pandemia a nível mundial causada pelo Sars-Cov-2, e que apesar de todos os obstáculos foi concedida a oportunidade para a realização deste trabalho.

Agradeço igualmente aos restantes membros da equipa laboratorial, nomeadamente à Dr^a Inês Couceiro, Dr^a Ana Sofia Rodrigues, Dr Bruno Barauna e ao Dr Elisson Souza pelo conhecimento transmitido, ajuda, disponibilidade e simpatia com que me acolheram.

Agradeço à minha orientadora Dr^a Ana Catarina Correia da Silva pela ajuda, conhecimento transmitido e disponibilidade.

Agradeço à minha família, principalmente aos meus pais, o meu grande pilar, por constituírem as fundações nas quais se apoia este trabalho e pelo apoio incondicional mesmo nas alturas mais desafiantes.

Resumo

O presente relatório tem como objetivo expor o conhecimento adquirido resultante do estágio laboratorial de regime observacional na área da Medicina da Reprodução na clínica Clinimer com a colaboração da Ferticentro, em Coimbra.

Durante o período de estágio estabelecido, sendo que só foi possível a sua realização por um período de 2 meses dada a condição pandémica gerada pelo Sars-Cov-2, tive a possibilidade de estabelecer contacto com as práticas laboratoriais aplicadas na área da Medicina da Reprodução. Desta forma, este estágio laboratorial permitiu-me adquirir conhecimento teórico e prático das técnicas laboratoriais praticadas num laboratório de Procriação Medicamente Assistida (PMA).

Observei desde a preparação de amostras seminais à sua aplicação nas técnicas de Inseminação Intrauterina (IIU), Fertilização *in vitro* (FIV), Microinjeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI), transferência embrionária e criopreservação e desvitrificação de gâmetas e embriões.

Tendo por base este estágio, foi possível desenvolver um estudo retrospectivo para avaliar os efeitos dos poluentes ambientais na função espermática.

Há décadas que inúmeros estudos científicos têm vindo a relatar uma diminuição da qualidade espermática de indivíduos expostos a poluentes presentes no meio ambiente, mesmo que em pequenas concentrações, nomeadamente devido ao aumento de emissões de gases poluentes associados ao excessivo tráfego automóvel, que tem impacto direto na reprodução masculina.

Com o objetivo de quantificar o impacto resultante do intenso tráfego rodoviário na função espermática, foram selecionadas duas regiões críticas da cidade de Lisboa: Avenida da Liberdade e Entrecampos. Segundo o relatório anual da qualidade do ar na Europa, os poluentes mais nocivos à saúde humana e, claro, na função reprodutiva são o material particulado (MP_{2,5} e MP₁₀) e o dióxido de nitrogénio (NO₂).

Em Portugal, a rede de monitorização da qualidade do ar é operada pela Agência Portuguesa do Ambiente (APA), sendo responsável pela validação dos dados registados pelos equipamentos de monitorização dos poluentes ambientais de uma determinada região. Assim, através do acesso à plataforma da APA foram obtidos os dados dos poluentes relevantes, disponibilizados pela base de dados da QualAr. Posteriormente, foram calculadas as concentrações mensais dos respetivos poluentes, durante os 12 meses do ano de 2019.

A Diretiva Qualidade do Ar Ambiente (Diretiva QAA da UE, 2008) define normas de qualidade do ar relativas às concentrações de poluentes presentes no ar ambiente. Desta forma, comparei com os dados obtidos resultantes do cálculo das concentrações mensais dos respetivos poluentes. Posteriormente, através da sustentação de bibliografia disponível, foi possível prever o impacto na saúde reprodutiva destes indivíduos.

Os resultados obtidos mostram que é expectável que se verifique uma diminuição da qualidade espermática dos indivíduos expostos nos meses de maior afluência rodoviária.

Tendo em conta estes resultados, há a necessidade de adotar medidas preventivas de modo a não prejudicar a fertilidade dos indivíduos expostos.

Abstract

This report aims to transmit the knowledge acquired resulting from the observational laboratory internship in Reproductive Medicine at the Clinimer clinic with the collaboration of Ferticentro, in Coimbra.

During the established internship period, it was only possible to carry it out for a period of 2 months given the pandemic condition generated by Sars-Cov-2, I had the opportunity to establish contact with the laboratory practices applied in Human Reproduction. Thus, this laboratory internship allowed me to acquire knowledge of laboratory techniques practiced in a Medically Assisted Procreation (PMA) laboratory.

I observed from the preparation of seminal samples to its application in the techniques of Intrauterine Insemination (IUI), In Vitro Fertilization (IVF), Intracytoplasmic Microinjection (ICSI), embryo transfer and cryopreservation and devitrification of gametes and embryos.

Based on this stage, it was possible to develop a retrospective study to assess the effects of environmental pollutants on sperm function.

For decades, numerous scientific studies have been reporting the decrease in sperm quality of individuals exposed to pollutants present in the environment, even in small concentrations, namely due to the increase in the emission of pollutant gases associated with excessive car traffic, which has a direct impact on male reproduction.

To quantify the impact resulting from intense road traffic on spermatoc function, two critical regions of Lisbon were selected: “Avenida da Liberdade” and “Entrecampos”. According to the annual report on air quality in Europe, the pollutants most harmful to human health and, of course, reproductive function are particulate matter (PM_{2.5} and PM₁₀) and nitrogen dioxide (NO₂).

In Portugal, the air quality monitoring network is operated by the Portuguese Environment Agency (APA), which is responsible for validating the data recorded by the monitoring equipment for environmental pollutants in each region. Thus, through access to the APA platform, data on relevant pollutants were obtained, made available by the QualAr database. Later the monthly concentrations of the respective pollutants were calculated, for the 12 months of the year 2019.

The Ambient Air Quality Directive (EU QAA Directive, 2008) defines air quality standards regarding the concentrations of pollutants present in the environment. In this way I compared with the data obtained from the calculation of monthly concentrations of the respective pollutants. Subsequently, through the support of the available bibliography, it was possible to predict the impact on the reproductive health of these individuals.

The results obtained show that a decrease in the sperm quality of exposed individuals is expected in the months of greater traffic flow.

Considering these results, there is a need to adopt preventive measures in order to not harm the fertility of exposed individuals.

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
Índice de Figuras e Tabelas.....	xi
Parte I – Introdução.....	I
1.1. Espermatogénese.....	3
1.2. Espermatozoide Humano.....	7
1.3. Etiologia da Infertilidade Masculina.....	9
Parte 2 – Laboratório de Andrologia.....	11
2.1. Parâmetros Seminais (Espermograma).....	13
2.1.1. Análise Macroscópica.....	14
2.1.2. Análise Microscópica.....	15
2.2. Valores de Referência e Classificação das Patologias Associadas.....	19
2.3. Testes Complementares à Análise Seminal de Importância Diagnóstica.....	21
2.3.1. Métodos Para Avaliar a Integridade da Cromatina / ADN nos Espermatozoides.....	21
2.3.2. Teste Baseado na Coloração Diff-Quick.....	22
2.3.3. Teste de Vitalidade.....	23
2.3.3.1. Teste de Vitalidade dos Espermatozoides pela Eosina-Nigrosina.....	23
2.3.3.2. Teste Hiposmótico.....	24
2.4. Técnicas Clássicas de Preparação de Esperma.....	26
2.4.1. Processamento Seminal.....	27
2.4.2. Gradiente de Densidade Descontínuo (GDD).....	27
2.4.3. Migração Ascendente (Swim-up).....	29
2.5. Inseminação Intrauterina (IIU).....	31
Parte 3 – Laboratório de Embriologia.....	33
3.1. Estimulação Ovária e Punção Folicular.....	35
3.2. Técnicas de Procriação Medicamente Assistida (PMA).....	39
3.2.1. Fertilização in vitro (FIV).....	40
3.2.1.1. Preparação de Ovócitos.....	40
3.2.1.2. Inseminação.....	41
3.2.2. Microinjeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI).....	41
3.2.2.1. Preparação dos Ovócitos - Desnudação.....	42
3.2.2.1.1. Avaliação da Maturidade e da Qualidade Ovocitária.....	44
3.2.2.2. Preparação dos Micromanipuladores do Equipamento de Micromanipulação.....	45
3.2.2.3. Injeção Intracitoplasmática – Preparação da Placa de ICSI.....	46
3.2.2.4. Seleção e Imobilização dos Espermatozoides.....	47
3.2.2.5. Microinjeção do Espermatozoide.....	48

3.2.3. Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides Fisiologicamente Seleccionados (PICSI).....	49
3.3. Avaliação da Fertilização e do Desenvolvimento Embrionário.....	50
3.4. Transferência Embrionária.....	51
Parte 4 – Criopreservação e Desvitrificação de Gâmetas e de Embriões.....	53
4.1. Criopreservação de Gâmetas Masculinos.....	55
4.1.1. Metodologia para a Realização da Congelação de Esperma.....	55
4.1.2. Metodologia para a Realização da Descongelação de Esperma.....	56
4.2. Criopreservação e Desvitrificação de Ovócitos (MII) e Embriões.....	57
Parte 5 – Efeitos da Poluição Ambiental na Função Espermiática.....	59
5.1. Impacto da Poluição Ambiental na Fertilidade Masculina.....	61
5.2. Metodologia.....	65
5.3. Resultados.....	66
5.4. Discussão.....	68
5.5. Conclusão.....	70
Bibliografia.....	71

Índice de Figuras e Tabelas

Figura 1 - Esquema representativo do processo da espermatogénesis.....	5
Figura 2 - Representação esquemática de um espermatozoide humano. Retirado de (Buscar, 2014)	7
Figura 3 - Realização do esfregaço da preparação de eosina com espermatozoides para visualização ao microscópio.....	24
Figura 4 - Esfregaço pronto para ser visualizado ao microscópio.....	24
Figura 5 - Visualização do esfregaço para avaliar a vitalidade de uma amostra seminal. É possível observar espermatozoides vivos (rodeados por um círculo) e mortos (delimitados por um quadrado).....	24
Figura 6 - Visualização de espermatozoides após incubação com a solução hipoosmótica. Espermatozoides com a cauda enrolada (possuem a membrana intacta) estão rodeados por um círculo; espermatozoides com a cauda não enrolada (possuem algum defeito na sua membrana) estão delimitados por um quadrado.....	25
Figura 7 - Amostra seminal após centrifugação, sendo visível os diferentes constituintes separados.....	28
Figura 8 - Amostra preparada para o SU, onde é visível o pellet.....	29
Figura 9 - Amostra em incubação na estufa a 37°C num suporte com uma inclinação de 30°, durante o SU.....	29
Figura 10 - Punção folicular (à esquerda). Retirado de: http://www.fertilityhandbook.com/pages/mini-ivf-minimal-stimulation-ivf/mini-ivf-procedural-overview.php , acessado no dia 14/08/2021. Vista ecográfica de um ovário com vários folículos prontos a serem aspirados (à direita). Cada formação preta é um folículo (circundado a azul). Retirado de: http://www.fertilityhandbook.com/pages/mini-ivf-minimal-stimulation-ivf/mini-ivf-procedural-overview.php , acessado no dia 14/08/2021.....	36
Figura 11 - Recolha do líquido folicular dos ovários de uma paciente. A fotografia é propriedade da Ferticentro e foi reproduzida com permissão.....	37
Figura 12 - Líquido folicular pronto a ser analisado à lupa para a pesquisa de ovócitos. A fotografia é propriedade da Ferticentro e foi reproduzida com permissão.....	37
Figura 13 - Ovócitos (circundado a azul) em meio flushing, após punção.....	37
Figura 14 - Ovócitos são armazenados na placa de cultura com meio próprio (fertilization), onde vão ser armazenados na incubadora pelo menos 2 horas.....	38
Figura 15 - Bancada aquecida (zona mais clara) e lupa, onde se realiza a desnudação dos ovócitos.....	43
Figura 16 - Placa de desnudação de ovócitos e pipetas Stripper para a desnudação de ovócitos.....	43
Figura 17 - Ovócito em vesícula germinativa (VG) (seta indica a VG). Imagem retirada de Rienzi et al. (2012).....	44
Figura 18 - Ovócito em Metafase I (MI), pela ausência de VG e do primeiro glóbulo polar (GP). Imagem retirada de Rienzi et al. (2012).....	44

Figura 19 - Ovócito em Metafase II (MII), pela ausência de VG e pela presença do primeiro GP (seta indica o primeiro GP) no espaço perivitelino. Imagem retirada de Rienzi et al. (2012).....	44
Figura 20 - Microscópio invertido para micromanipulação de gâmetas e embriões. Este equipamento é propriedade da Ferticentro e foi reproduzido com permissão.....	45
Figura 21 - Placa de ICSI.....	47
Figura 22 - Placa de PICSI que possui 3 micro pontos de Ácido Hialurónico em sua base (ORIGIO).....	49
Figura 23 - Pré-zigoto com 2 PN (circundado a vermelho) e 2 GP (setas a vermelho). A fotografia é propriedade da ferticentro e foi reproduzida com permissão.....	50
Figura 24 - Transferência de embriões. A - aspiração do embrião da placa de transferência para o cateter; B - cateter inserido no útero; C - visualização ecográfica do cateter (circundado a azul); D - deposição do embrião no útero, durante a qual é visível uma pequena gota brilhante na ponta do cateter, através do controlo ecográfico. Retirado de: http://myselfishgenes.blogspot.pt/2013/02/embryo-transfer.html , acedido a 17/08/2021.....	52
Figura 25 - Entrega do embrião na cavidade uterina (seta a vermelho). A fotografia é propriedade da Ferticentro e foi reproduzida com sucesso.....	52
Figura 26 - Variação dos níveis dos contaminantes ambientais correspondentes ao ano de 2019.	66
Tabela 1 - Valores de Referência dos Parâmetros Seminais Convencionais Avaliados no Espermograma (WHO, 2010).....	19
Tabela 2 - Patologias Associadas à Qualidade dos Parâmetros Seminais Convencionais (WHO, 2010).....	20

Parte I – Introdução

I.1. Espermatogênese

A espermatogênese é um processo celular extraordinário e de extrema complexidade, que resulta na produção dos gametas masculinos maduros, os espermatozoides.

A regulação endócrina da espermatogênese depende de um sistema de feedback negativo que envolve interações entre o hipotálamo, a hipófise e os testículos (eixo hipotálamo-hipófise-gônadas) (O'Donnell et al., 2006).

Os principais reguladores endócrinos da espermatogênese são as gonadotrofinas hormona luteinizante (LH) e a hormona folículo-estimulante (FSH), que são produzidas pela hipófise anterior e libertadas para a corrente sanguínea em resposta ao estímulo da hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH), segregada pelo hipotálamo (Buscar, 2014).

A espermatogênese é um processo que ocorre nos testículos, em unidades denominadas túbulos seminíferos e envolve a diferenciação de espermatozoides a partir de células estaminais germinativas, que são posteriormente conduzidos até à rede testicular que faz a conexão com o epidídimo.

Os túbulos seminíferos são constituídos por células da linha germinal e por células somáticas, as células de Sertoli. Entre os túbulos seminíferos existem vasos capilares, células mioepiteliais e células de Leydig. As células de Leydig são células somáticas que têm como principal função a produção de testosterona (hormona essencial para o processo da espermatogênese) em resposta à estimulação da hormona luteinizante (LH), libertada pela hipófise anterior (O'Donnell et al., 2006).

A contração das células mioepiteliais, localizadas na parede externa do túbulo seminífero, permite a "expulsão" dos espermatozoides do túbulo seminífero para o epidídimo, fazendo com que estes subam no epitélio, isto porque quando os espermatozoides saem do túbulo seminífero ainda não têm mobilidade, competência esta que só adquirem ao longo do trânsito epididimal (Smith & Walker, 2014).

As células de Sertoli, células grandes, poliédricas, têm um papel crucial na sobrevivência, nutrição e desenvolvimento das células da linha germinal. Estas são estruturas celulares dinâmicas e complexas, unidas entre si por ligações muito fortes (junções apertadas), que mantêm uma interação cíclica com as células germinativas (encontram-se em diferentes estados de maturação desde a membrana basal, células menos maduras, até ao lúmen, células mais maduras, do túbulo seminífero) (Flickinger & Fawcett, 1967) (Griswold, 2018).

As células mióides peritubulares e as células de Sertoli, auxiliam-se mutuamente para formarem a membrana basal do túbulo seminífero. O citoplasma das células de Sertoli estende-se desde a membrana basal até ao lúmen do túbulo seminífero, envolvendo as células germinativas, e têm como função transmitir sinais externos e fornecer fatores necessários para a proliferação e diferenciação das células germinativas (Smith & Walker, 2014).

Para além disso, as células de Sertoli controlam a libertação dos espermatozoides para o lúmen (processo designado espermiação), e têm capacidade de fagocitose e endocitose do excesso de citoplasma, que ocorre nas últimas etapas da espermatogénese (França et al., 2016).

A divisão celular das células de Sertoli termina aquando da primeira divisão meiótica das células germinativas, dando origem à formação da barreira hemato-testicular (BHT), que separa o lúmen do túbulo da circulação sanguínea, e à criação de dois compartimentos: o compartimento basal, junto à parede do túbulo, e o compartimento adluminal, na direção do lúmen. A BHT é uma barreira física, flexível e permeável, que permite que as células germinativas se dividam por meiose e subam no epitélio em direção ao lúmen (Smith & Walker, 2014).

A BHT é uma barreira muito importante no controlo de substâncias que passam para o compartimento adluminal e tem também a função de proteger as células germinativas do ataque autoimune (Mruk & Cheng, 2015).

Como a espermatogénese começa na puberdade e nesta altura o sistema imunitário já está formado ao aparecerem as células germinativas poderia desencadear uma resposta autoimune e, por isso, a BHT é fundamental.

As células germinativas primordiais (CGPs) dão origem às células estaminais testiculares, que permanecem em "silêncio" até à puberdade. Quando se inicia a puberdade, as células estaminais testiculares chamadas espermatogónias começam a proliferar, ao longo da membrana basal do túbulo seminífero, por sucessivas mitoses (proliferação mitótica) e diferenciam-se por meiose - a espermatogénese inicia-se. As espermatogónias podem dividir-se até ao final da vida do indivíduo. As CGPs começam o seu processo de migração durante a 5ª semana de gestação, desde o saco vitelínico até à crista gonadal. Neste percurso, as CGPs multiplicam-se (expandem-se) para colonizarem a crista gonadal. É durante a 5ª semana de gestação que há o desenvolvimento da crista gonadal, sendo que nesta altura ainda é indiferenciada. Portanto, olhando para a crista gonadal nesta fase ainda não é possível determinar o sexo do embrião.

Na 6ª à 8ª semana de gestação há a diferenciação da crista gonadal, que no homem é determinado pelo fator Testis Determining Factor (TDF), implicado na formação do testículo, e começam a aparecer as células de Sertoli. As células de Sertoli produzem nesta fase já algumas hormonas importantes para a manutenção da genitália interna masculina e para a regressão da genitália interna feminina.

Na 8ª semana de gestação, aparecem as células de Leydig responsáveis pela secreção da hormona testosterona, importante para a manutenção da genitália masculina e para a regressão da genitália feminina.

As subdivisões da espermatogénese dividem-se em quatro fases principais: proliferação mitótica e a diferenciação espermatogonial em espermatócitos pré-leptóteno (espermatogoniogénese); divisão meiótica dos espermatócitos em espermátides (meiose); maturação dos espermátides redondos em espermátides adultos (espermiogénese); e a libertação dos espermátides alongados para o lúmen do túbulo seminífero pelo processo designado de espermiação (Babakhanzadeh et al., 2020) (Figura 1).

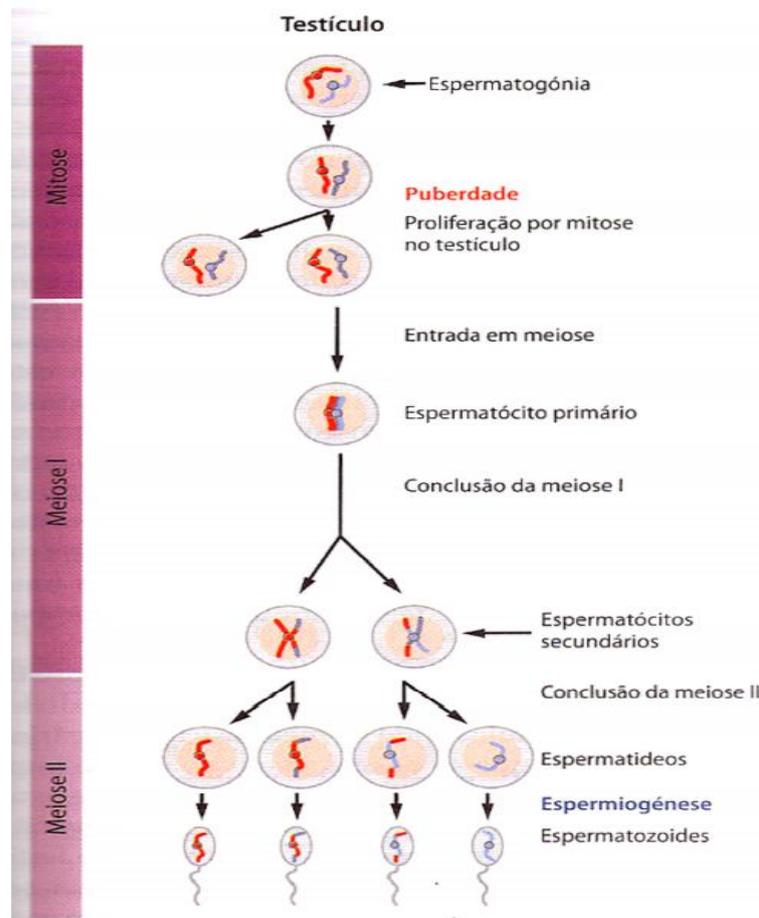


Figura 1 - Esquema representativo do processo da espermatogênese.

A espermatogênese começa com as células estaminais testiculares designadas espermatogônias que através de um processo denominado de espermatogoniogênese, começam as sucessivas divisões mitóticas das espermatogônias indiferenciadas. É nesta subdivisão da espermatogênese que começam as sucessivas divisões mitóticas das espermatogônias indiferenciadas que ocorrem de forma sincronizada ao longo do epitélio seminífero, ou seja, sempre que estas se dividem ficam ligadas por pontes citoplasmáticas, formando cadeias de espermatogônias. Assim, a partir do momento que uma espermatogonia entra em divisão, entram todas que é para garantir que estão todas no mesmo estado de desenvolvimento, permitindo, assim, uma coordenação metabólica e da expressão gênica. Quando as cadeias de espermatogônias atingem um comprimento de 16 células ou 32 células, sofrem diferenciação para se tornarem espermatogônias diferenciadas (Smith & Walker, 2014).

Depois da multiplicação das espermatogônias, inicia-se a fase de crescimento em que as espermatogônias sofrem a 1ª divisão de meiose originando dois espermátócitos pré-leptóteno, os espermátócitos primários (espermátócitos I) (Babakhanzadeh et al., 2020).

Durante o estado inicial dos espermátócitos pré-leptóteno da meiose (estado de maturação), movem-se do compartimento basal para o compartimento adluminal. Depois de passarem a BHT

e entrarem no compartimento edluminal, as células germinativas continuam o seu processo de diferenciação num microambiente protegido (Smith & Walker, 2014) (Holstein et al., 2003).

Por sua vez, na meiose I os espermatócitos I sofrem a 2ª divisão da meiose originando dois espermatócitos secundários (espermatócitos II), sendo de difícil observação uma vez que esta é uma fase de divisão celular rápida.

Na meiose II, os espermatócitos II sofrem novamente meiose, originando-se quatro células haploides, os espermatídeos maduros redondos haploides, que vão sofrer transformação celular para formar os espermatozoides.

Cada espermatócito I origina, desta forma, quatro espermatídeos idênticos que permanecem unidos por pontes citoplasmáticas. Esta citocinese incompleta que permanece desde a divisão mitótica das espermatogónias permite que haja uma sincronização de todo o processo de meiose e maturação celular.

Após a meiose estar concluída, inicia-se a espermiogénese. Na espermiogénese ocorre a transição de uma célula madura redonda para uma célula madura alongada e bastante aerodinâmica, o espermatozoide, onde a maioria do citoplasma celular é eliminado, e forma-se o flagelo (centríolos, mitocôndrias, axonema e fibras acessórias). Nesta etapa, o núcleo sofre diversas modificações: o núcleo alonga-se e a cromatina condensa-se, devido à substituição parcial das histonas, proteínas nucleares presentes nas células somáticas, por proteínas de transição e, posteriormente, por proteínas específicas dos espermatozoides, as protaminas (Balhorn, 1982). As protaminas formam um complexo ácido desoxirribonucleico (ADN)-protamina que é estabilizado por pontes dissulfeto, aumentando, assim, o grau de compactação da cromatina e, por conseguinte, o aerodinamismo da célula, característica esta específica desta célula altamente especializada.

Durante este processo há também a formação da vesícula acrossómica. Uma vez concluída a espermatogénese, os espermatozoides, ainda imóveis e imaturos, são libertados para o lúmen do testículo pelo processo designado de espermição. Posteriormente, os espermatozoides são transportados ao longo do túbulo seminífero até à rede testicular que faz a conexão com o epidídimo, onde os espermatozoides são armazenados até à ejaculação.

É ao longo do trânsito epididimal, que dura cerca de duas semanas (Babakhanzadeh et al., 2020), que os espermatozoides altamente diferenciados sofrem o processo de maturação epididimal, nomeadamente em termos de mobilidade (Heller & Clermont, 1963).

É na passagem do corpo do epidídimo para a cauda que os espermatozoides adquirem maior mobilidade (Babakhanzadeh et al., 2020) (Heller & Clermont, 1963).

Assim, os espermatozoides saem imóveis dos túbulos seminíferos e adquirem mobilidade ao longo do trânsito epididimal.

1.2. Espermatozoide Humano

Os espermatozoides são células altamente diferenciadas, especializadas e condensadas que têm a capacidade de transmitir a informação genética paterna ao oócito. Desta forma, os espermatozoides são compostos por três regiões principais: a cabeça, peça intermédia e a cauda ou flagelo (Sutovsky & Manandhar, 2006) (Figura 2).

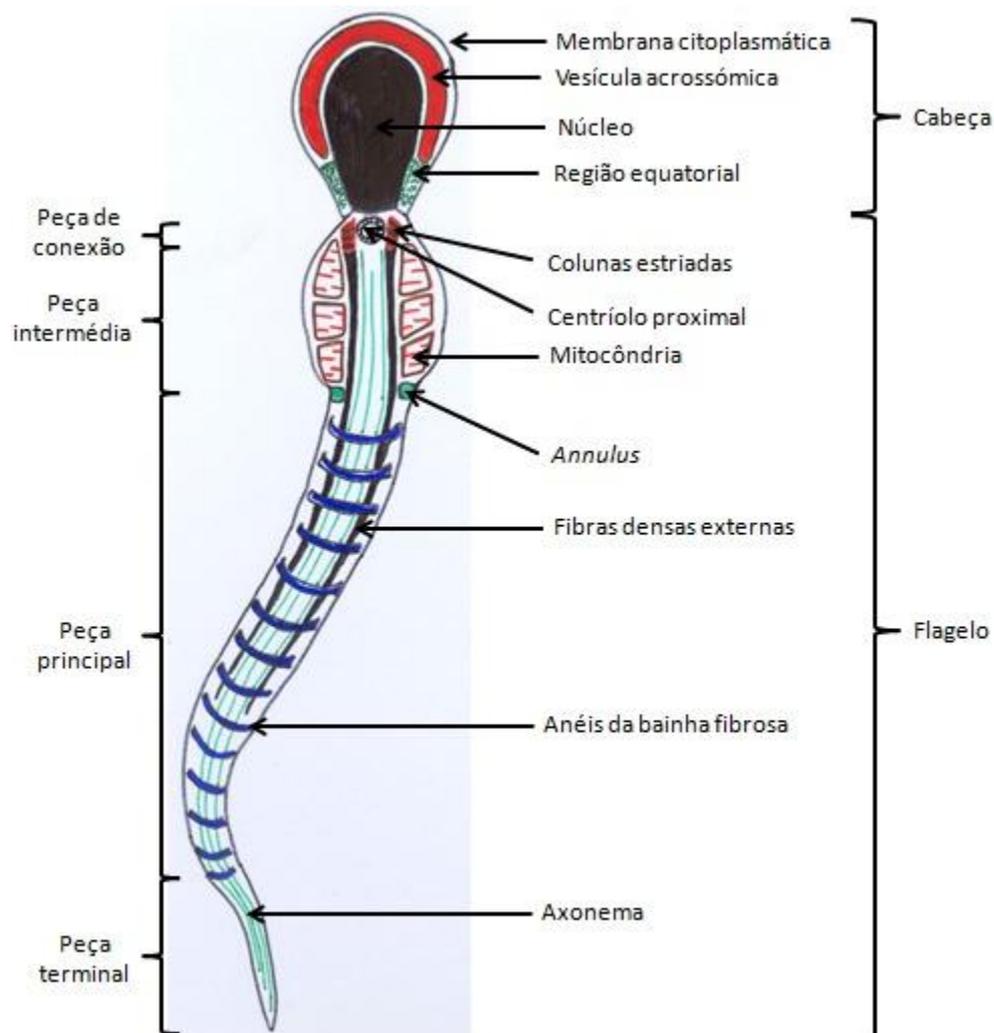


Figura 2 - Representação esquemática de um espermatozoide humano. Retirado de (Buscar, 2014)

Como os espermatozoides são células móveis, estes sofrem modificações estruturais e moleculares durante a espermatogénese, na espermiogénese, para aumentar as propriedades hidrodinâmicas características destas células especializadas. Estas propriedades hidrodinâmicas que os espermatozoides adquirem na fase final da espermatogénese são cruciais para que estes consigam alcançar e fertilizar o oócito (Sutovsky & Manandhar, 2006).

A cabeça do espermatozoide humano é oval, de maneira a facilitar a movimentação e a penetração nos ovócitos e é composta pelo núcleo, que está rodeado pela teca perinuclear, e pela vesícula acrossômica (localizada na região anterior da cabeça). A vesícula acrossômica possui

enzimas hidrolíticas, nomeadamente hialuronidase e acrosina, que são libertadas por exocitose (reação acrossómica) aquando o contacto com a zona pelúcida do ovócito, hidrolisando-a, permitindo, assim, ao espermatozoide penetrar a parede do ovócito, a zona pelúcida (Sutovsky & Manandhar, 2006).

As enzimas hidrolíticas são libertadas pelo processo designado de reação acrossómica. Os espermatozoides humanos só são capazes de sofrer reação acrossómica e fecundar o ovócito após sofrerem capacitação, competência esta que adquirem no trato reprodutor feminino e que consiste numa série de modificações fisiológicas e bioquímicas que ocorrem durante a capacitação.

Na peça intermédia, localizada entre a cabeça e a cauda, encontram-se as mitocôndrias que são cruciais para a produção de adenosina trifosfato (ATP), que ocorre por reação da via da fosforilação oxidativa. Assim, o ATP mitocondrial é essencial para a maturação dos espermatozoides (mobilidade) no epidídimo, que dependem de processos de transformação membranar dependentes de ATP, para a capacitação e para o processo de fertilização.

A cauda é constituída por um axonema que contém o típico arranjo microtubular 9+2 de um flagelo eucariótico (9 pares de microtúbulos que rodeiam 2 microtúbulos centrais), que se divide em peça principal e peça terminal (R. M. Turner, 2003). A peça principal é constituída por dímeros microtubulares, rodeados pela bainha fibrosa. As dineínas, ATPases associadas aos microtúbulos, hidrolisam o ATP para gerar movimento flagelar, responsável pela mobilidade do espermatozoide (R. M. Turner, 2003).

1.3. Etiologia da Infertilidade Masculina

A infertilidade masculina tem inúmeras causas e, portanto, para além dos contaminantes ambientais existem inúmeros fatores que deterioram o epitélio germinativo, levando à infertilidade masculina. Assim, anomalias genéticas, distúrbios endócrinos, patologias testiculares, infeções urogenitais, fatores imunológicos, fatores de estilo de vida, exposição a agentes tóxicos (destacam-se a exposição a radiação e quimioterapia, calor intenso e a utilização de substâncias químicas como determinadas drogas, medicamentos, solventes, pesticidas e metais pesados), declínio da qualidade espermática com a idade e a infertilidade idiopática podem exacerbar os efeitos deletérios da exposição a poluentes tóxicos, ou que só por si podem levar à infertilidade masculina.

As lesões genéticas mais frequentes são as anomalias cromossómicas (numéricas e estruturais-translocações), microdeleções da região AZF do cromossoma Y (causadoras de oligozoospermia severa e oligozoospermia severa funcional) e as mutações no gene da Fibrose Quística (causadoras de agenesia congénita bilateral dos canais deferentes, que levam a casos clínicos de oligozoospermia severa obstrutiva) (Babakhanzadeh et al., 2020) (Barratt et al., 2017)

Os distúrbios endócrinos afetam a regulação endócrina da espermatogénese, dependente do normal funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (Corradi et al., 2016).

Desta forma, qualquer distúrbio na regulação deste eixo pode levar à infertilidade masculina (Babakhanzadeh et al., 2020) (Costanzo et al., 2014).

No que diz respeito às doenças testiculares e entre as várias patologias testiculares conhecidas, a criptorquidia e o varicocele são as mais relevantes no estudo da infertilidade masculina. A criptorquidia também conhecida como testículos mal descidos é reconhecida como sendo uma anomalia no posicionamento testicular. A migração testicular acontece no final do primeiro trimestre de gestação no qual os testículos migram da posição perirrenal para uma posição inguinal. Assim, esta patologia testicular é caracterizada pela permanência dos testículos na cavidade abdominal ou no canal inguinal.

Desta forma, quando a migração das gónadas para a bolsa escrotal não ocorre, pode comprometer a espermatogénese (podendo levar à infertilidade) devido à temperatura ser ligeiramente superior na cavidade abdominal do que na bolsa escrotal.

O varicocele é uma patologia testicular altamente prevalente na população masculina (cerca de 15% de toda a população masculina; 21-39% em homens com alterações no espermograma) (Sun et al., 2018) e, portanto, é uma das doenças testiculares mais relevantes no estudo da infertilidade masculina. O varicocele é definido como dilatação anormal das veias do plexo pampiniforme testicular, que pode provocar atrofia testicular, com redução da testosterona e alterações na quantidade e qualidade dos espermatozoides. Sendo que, o varicocele é a dilatação anormal das veias do plexo pampiniforme testicular, esta patologia testicular pode prejudicar a fertilidade masculina (apesar do mecanismo pelo qual o varicocele influencia a fertilidade ainda não esteja completamente compreendido) por meio do aumento da temperatura escrotal (um dos vários

mecanismos que explica a influência nefasta desta patologia testicular na fertilidade), que está associado ao aumento do stress oxidativo (SO) e à fragmentação do ADN genómico paterno. Importante reconhecer que a sua etiologia é multifatorial e, portanto, o varicocele pode resultar da combinação de vários fatores deletérios, que levam à infertilidade masculina.

As infeções no trato urogenital desencadeiam a inflamação e, por conseguinte, levam ao aumento do número de leucócitos na região inflamada. Desta forma, os leucócitos polimorfonucleares presentes no plasma seminal bem como a presença de células espermáticas imaturas (anormais) induzem a sobreprodução de espécies reativas de oxigénio (ERO), que pode levar ao aumento da taxa de fragmentação do ADN dos espermatozoides (Depuydt & Comhaire, 1996).

As infeções genitais são uma das principais causas de oligozoospermia severa obstrutiva.

A presença de determinados autoanticorpos na superfície dos espermatozoides, interfere severamente com a função espermática, podendo levar à infertilidade imunológica (Cui et al., 2015).

Fatores associados ao estilo de vida afetam negativamente a fertilidade masculina. O consumo excessivo de álcool (La Vignera et al., 2013), tabaco (Kovac et al., 2015), obesidade (Oliveira et al., 2015) e o consumo de drogas e anabolizantes (Fronczak et al., 2012) afetam a qualidade espermática em termos de concentração, mobilidade, morfologia, vitalidade bem como podem induzir danos no ADN dos espermatozoides.

Variações na temperatura escrotal notadamente a exposição ao calor intenso, designadamente nas profissões que exigem o contacto prolongado com temperaturas elevadas e nos motoristas de longo curso (permanência prolongada na posição sentada), são também deletérios para a espermatogénese (Shiraishi et al., 2010).

Do mesmo modo, a exposição à radiação pode levar à redução da produção espermática, sendo que a exposição a quantidades elevadas pode mesmo levar à infertilidade masculina (Kesari et al., 2018).

Vários estudos relatam que a capacidade reprodutora masculina também é ameaçada pela exposição a metais pesados (Benoff et al., 2000) (Jamalan et al., 2016).

Da mesma forma, a idade masculina também tem um impacto negativo na qualidade dos espermatozoides, principalmente a partir dos 40 anos de idade, em que há um declínio da qualidade espermática (Kühnert & Nieschlag, 2004).

Como referido, a infertilidade masculina tem inúmeras causas conhecidas, contudo cerca de 15% dos indivíduos inférteis são diagnosticados com infertilidade idiopática (Hamada et al., 2012).

Parte 2 – Laboratório de Andrologia

2.1. Parâmetros Seminais (Espermograma)

Um dos exames laboratoriais mais utilizados no diagnóstico da infertilidade masculina é o espermograma. Este exame é solicitado numa fase inicial de avaliação quando há suspeita de infertilidade no casal e para despistar algum problema de infertilidade masculina.

Desta forma, o espermograma é um exame específico não invasivo que fornece informações importantes relativamente à espermatogénese, função das glândulas acessórias (próstata e vesículas seminais) e a permeabilidade do trato reprodutivo (WHO, 2010).

Este exame tradicional de análise espermática não é um exame de fertilidade e, portanto, não permite prever se um indivíduo poderá ou não ser pai biológico, isto porque apenas nos diz a probabilidade de obtenção de uma gravidez num dado período de tempo. Desta forma, o espermograma apenas avalia os parâmetros seminais clássicos, como a concentração, mobilidade e morfologia dos espermatozoides, que indicam apenas a qualidade espermática de um indivíduo e não a capacidade do espermatozoide fertilizar o ócito.

Assim sendo, o espermograma em si não permite prever o potencial de fertilidade masculina para o processo de conceção natural nem para o sucesso das técnicas de procriação medicamente assistida (PMA) (Wang & Swerdloff, 2014).

Os parâmetros seminais clássicos são avaliados segundo as orientações estabelecidos pela OMS, como o número total de espermatozoides (parâmetro de avaliação da capacidade de produção dos testículos e da desobstrução do sistema de canais pós testiculares), volume do líquido seminal (parâmetro de avaliação da atividade secretora das glândulas anexas), mobilidade, morfologia e vitalidade dos espermatozoides (WHO, 2010).

Desta forma, o espermograma é um exame que analise duas vertentes da qualidade espermática, sendo a primeira delas a análise macroscópica e a segunda a análise microscópica.

Antes de se proceder à recolha da amostra do ejaculado, o indivíduo é advertido para a prática de abstinência sexual nos três a sete dias que antecedem o exame. A prática da abstinência sexual nos dias anteriores que antecedem o exame é de extrema importância para garantir a qualidade do esperma, e para as análises poderem ser comparáveis (WHO, 2010).

Para uma avaliação mais fidedigna da espermatogénese é recomendável no mínimo a realização de duas colheitas de sémen com um intervalo de tempo entre as colheitas de aproximadamente quinze dias (WHO, 2010).

Se os resultados provenientes do espermograma diferirem muito entre si é recomendável a repetição de uma nova análise seminal com um intervalo de duas a oito semanas (WHO, 2010).

A colheita do sémen é obtida através da masturbação do indivíduo sendo a amostra recolhida para um recipiente estéril e não tóxico para os espermatozoides. O recipiente esterilizado é identificado com os dados pessoais do indivíduo, são anotados os dias de abstinência sexual e a hora da colheita. O recipiente que contém a amostra do ejaculado deve ser armazenado à temperatura ambiente, entre os 20°C e 37°C, para manter a integridade da colheita (WHO, 2010).

A colheita deve ser realizada na clínica para que se possa proceder à análise da colheita assim que possível, para não comprometer a integridade da mesma. Caso o indivíduo não possa fazer a colheita na clínica ou não se sinta confortável, a amostra deve ser entregue até uma hora após a colheita garantindo assim a sua integridade.

Para a realização da colheita e da análise seminal, recorre-se ao manual de laboratório da OMS que fornece de forma padronizada todos os procedimentos a serem executados na colheita e análise do sémen. Por razões de padronização e para que os resultados obtidos em locais diferentes sejam comparáveis e confiáveis, o estudo feito relativamente a uma determinada amostra deve ser realizado de acordo com as diretrizes estabelecidas pela OMS (Wang & Swerdloff, 2014).

Assim sendo, os diferentes locais devem seguir as diretrizes estabelecidas pela OMS ou pela Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia (ESHRE) de forma que, seja garantido que os parâmetros de análise do sémen, utilizando o manual de laboratório da OMS, avaliados num determinado local são comparáveis e confiáveis ao realizado num outro local (Wang & Swerdloff, 2014).

2.1.1. Análise Macroscópica

A análise macroscópica analisa a qualidade do líquido seminal. Neste tipo de análise são considerados parâmetros, tais como o tempo de liquefação, a aparência do ejaculado (cor e aspeto de líquido seminal), volume, pH e viscosidade.

A liquefação do sémen é um processo fisiológico que demora normalmente 20 minutos após a ejaculação embora possam existir casos em que demore 30 a 60 minutos, ou até mais (WHO, 2010).

Sendo assim, o tempo de liquefação é o tempo que a amostra demora até se tornar completamente líquida, isto é, até perder a sua viscosidade.

Após a liquefação completa do sémen procede-se à análise dos parâmetros macroscópicos.

Na avaliação da aparência macroscópica do ejaculado é avaliado o aspeto e a cor do líquido seminal, devendo apresentar uma aparência homogénea e uma cor cinza e opalescente, parecida com a cor da clara de ovo (WHO, 2010).

Se o líquido seminal revelar uma coloração avermelhada ou amarelada, pode ser indicador de alguma infeção do trato masculino ou pode ser indicador de algo mais grave, como é o caso do cancro da próstata (WHO, 2010).

O volume da amostra seminal é medido com uma seringa estéril e não tóxica para os espermatozoides, sendo o valor limite de referência de 1,5 ml por ejaculado (WHO, 2010). Caso o volume total da amostra seja inferior ao valor de referência, o diagnóstico é de hipospermia.

Este diagnóstico é indicador da obstrução do ducto ejacatório ou da ausência congênita bilateral dos ductos deferentes.

O baixo volume de sémen na amostra pode derivar, em alguns casos, da perda de uma parte do ejaculado durante a colheita, deficiência androgénica do envelhecimento masculino ou ejaculação retrógrada parcial (WHO, 2010).

Por outro lado, um volume elevado do ejaculado (acima de 6 ml) pode ser indicador de inflamação uma vez que há um aumento secretório por parte das glândulas anexas.

Importante referir, que caso estejamos perante um quadro clínico de oligospermia ou de hipospermia, estes são indicadores de parâmetros diferentes. Casos clínicos de oligospermia revelam que estamos perante uma amostra de sémen em que não há pelo menos 15 milhões de espermatozoides por ml de sémen enquanto a hipospermia é indicador que o volume total ejaculado de sémen é inferior a 1,5ml.

O pH do sémen é um parâmetro indicador que reflete o equilíbrio entre os valores de pH das diferentes secreções das glândulas acessórias, maioritariamente da secreção da vesícula seminal (alcalina) e a secreção da vesícula prostática (ácida). O pH deve ser medido até 1 hora após a colheita, idealmente após a liquefação da amostra seminal, uma vez que é influenciado pela perda de CO₂ que ocorre após a produção (WHO, 2010). O pH é avaliado com recurso às tiras de teste de pH. Uma gota da amostra é depositada uniformemente na tira de pH e ao fim de 30 segundos compara-se a cor obtida na tira de pH com a escala de cores da tira de pH. O limite inferior de referência para o pH é e 7,2 (WHO, 2010), sendo que o valor de pH de uma amostra normal encontra-se entre 7,2 e 8,0.

A determinação da viscosidade de uma amostra seminal consiste em aspirar a amostra para uma seringa estéril e não tóxica para os espermatozoides, e permitir que cuidadosamente o sémen caia no frasco de colheita pela ação da gravidade para observar o comprimento dos filamentos. Desta forma, a viscosidade é considerada anormal quando se verifica que a amostra forma filamentos com mais de 2 centímetros de comprimento (WHO, 2010).

Alterações na viscosidade da amostra podem indicar disfunções das glândulas acessórias e podem influenciar a determinação correta de outros parâmetros seminais, tais como a concentração e a motilidade.

2.1.2. Análise Microscópica

A análise microscópica é mais precisa que a análise macroscópica e mede a concentração de espermatozoides num mililitro de sémen, a concentração total de espermatozoides contidos no ejaculado (volume), morfologia, mobilidade ou motilidade e a vitalidade dos espermatozoides.

Consoante o resultado da avaliação microscópica é definido o tratamento de PMA a aplicar, sendo que há tratamentos de primeira (FIV, ICSI) e segunda linha (IIU).

Através da concentração de espermatozoides, parâmetro indicador da capacidade testicular, podemos prever se o homem é ou não infértil. Como já mencionado, quando a concentração é inferior a 15 milhões de espermatozoides por ml de amostra, estamos perante um quadro de oligozoospermia ligeira. Desta forma, recorre-se, numa primeira instância, à técnica de PMA mais simples e menos invasiva, a IIU. Caso se verifique o insucesso desta técnica após 2-3 inseminações, recorre-se à FIV. Por outro lado, caso estejamos perante um quadro clínico de oligozoospermia moderada (10 a 20 milhões por ml) a técnica de PMA a ser empregue depende do resultado do teste de migração. Caso pós tratamento da amostra existir menos de 5 milhões de espermatozoides por ml de amostra, estamos perante um quadro clínico de oligozoospermia severa e, portanto, a técnica de PMA a ser empregue é a ICSI. Sob o ponto de vista genético, indivíduos com oligozoospermia severa apresentam um elevado risco (7-10%) para anomalias genéticas (Thomas, 2019).

Indivíduos que sejam diagnosticados com oligozoospermia severa podem apresentar anormalidades testiculares estruturais/obstrutivas ou funcionais. Caso estejamos perante um quadro de oligozoospermia severa obstrutiva, ausência de espermatozoides no sémen ejaculado, mas há produção espermática no testículo, devido a obstruções que impeçam o transporte dos espermatozoides (obstrução dos canais deferentes e epidídimo) ou problemas ao nível da ejaculação, procede-se à aspiração percutânea do epidídimo para a recolha de espermatozoides. Por outro lado, a oligozoospermia severa funcional é mais grave uma vez que implica uma ausência da espermatogénese e, portanto, não há produção de espermatozoides. Desta forma, recorre-se à biópsia testicular (biópsia com retirada de fragmento do testículo para a obtenção de espermatozoides). Por sua vez, neste quadro clínico em específico depende das células da linha da espermatogénese que foram afetadas para que se consiga proceder ao tratamento.

Importante reconhecer que apenas 20-30% dos indivíduos com azoospermia ou com oligozoospermia severa são diagnosticados com anormalidade genética, enquanto a maioria das causas genéticas que levam à infertilidade permanecem desconhecidas (Thomas, 2019). Desta forma, é fundamental diagnosticar a condição genética dos pacientes que apresentem anomalias congénitas estruturais severas idiopáticas ou com oligozoospermia severa porque a maioria destes casos podem ser causados por mutações transmitidas paternalmente, ou estar associados a um risco elevado de aborto espontâneo ou anomalia fetal (Thomas, 2019).

Deste modo, os testes genéticos são solicitados em pacientes diagnosticados com azoospermia e oligozoospermia severa com o intuito de descobrir alguma anormalidade genética. Caso exista alguma anormalidade genética, o paciente é direcionado para a consulta de aconselhamento genético antes de se proceder à técnica de fertilização assistida, pois é necessária averiguar se há risco de transmissão à descendência, ocorrência de abortos espontâneos ou qualquer anormalidade fetal. Assim, após a identificação do problema genético procede-se ao tratamento de fertilização assistida mais apropriado.

Tendo em consideração que a espermatogénese é um processo de baixa eficiência (Holstein et al., 2003), e que o número de espermatozoides malformados presentes no ejaculado é extremamente elevado (a morfologia da maior parte dos espermatozoides é anormal), a avaliação deste parâmetro é essencial na análise rotineira da amostra do ejaculado.

Desta forma, a morfologia avalia o formato dos espermatozoides, e apenas são contados para a concentração espermática os espermatozoides intactos, que devem conter uma cabeça com um formato oval e com a parte intermédia e a cauda sem danos. Espermatozoides com morfologia espermática normal superiores ou igual a 4% são consideradas amostras normais ao nível da morfologia (WHO, 2010).

Quando as amostras revelam uma morfologia espermática menor que 4%, estamos perante um quadro clínico designado Teratozoospermia. Espermatozoides com anomalias da cabeça estão associadas a lesões no ADN genómico paterno enquanto as anomalias detetadas no flagelo estão associadas com a capacidade de locomoção dos espermatozoides. As anomalias dividem-se em quatro categorias: anomalias na cabeça, anomalias na peça intermédia, anomalias na cauda e a presença de restos citoplasmáticos. Um espermatozoide que apresente anomalias em cada região (cabeça, peça intermediária e cauda) é registado como apresentando anomalias nas três regiões (3 anomalias) mas é contado apenas como sendo espermatozoide anormal e, por isso, um espermatozoide anormal pode possuir mais que uma anomalia.

Assim, o número de anomalias será sempre superior ao número de espermatozoides anormais, excepto se todos os espermatozoides contados apresentarem apenas uma anomalia.

O índice de teratozoospermia refere-se à média do número de defeitos por espermatozoide anormal, e é calculado através da divisão do número total de anomalias contadas pela percentagem de espermatozoides anormais.

A mobilidade é um parâmetro que avalia a locomoção de espermatozoides. Para a classificação da mobilidade dos espermatozoides recorre-se a um sistema de classificação. Este sistema de classificação de motilidade abrange os seguintes critérios: Mobilidade progressiva (rápida e lenta) mobilidade não progressiva ou *in situ* e imobilidade ou nula.

A mobilidade progressiva é dividida em mobilidade progressiva rápida ou lenta, e é caracterizada por espermatozoides que se movem num sentido direcional e de forma ativa, independentemente do trajeto que façam ao longo do seu percurso, linear ou em círculos (WHO, 2010).

A mobilidade não progressiva ou *in situ* é caracterizada pela presença de espermatozoides que movem a cauda mas não se deslocam.

A imobilidade, como o próprio nome indica, é a ausência de mobilidade.

Assim, segundo os critérios atuais da OMS, a amostra seminal deve apresentar pelo menos 32% de espermatozoides com mobilidade progressiva (rápida e lenta) ou pelo menos 40% de espermatozoides com mobilidade progressiva e não progressiva (mobilidade total) (WHO, 2010).

Segundo as recomendações da OMS, os resultados de vitalidade devem ser avaliados em conjunto com os resultados de mobilidade da mesma amostra de sémen (WHO, 2010).

Desta forma, o teste de vitalidade tem como objetivo avaliar a percentagem de espermatozoides vivos presentes na amostra. Este teste pode ser feito rotineiramente em todas as análises de amostras de sêmen, mas é de extrema importância a sua realização em amostras que apresentam menos de 40% de espermatozoides com mobilidade progressiva (MP) e *in situ* (MP+C \geq 40%) (WHO, 2010). Deste modo, é clinicamente importante avaliar se os espermatozoides imóveis estão vivos ou mortos. Desta forma, a vitalidade dos espermatozoides é avaliada através da integridade da membrana dos mesmos.

Segundo a OMS, para a amostra de sêmen ser considerada normal tem de existir um número superior ou igual a 58% de espermatozoides vivos (WHO, 2010).

Caso hajam menos de 58% de espermatozoides vivos na amostra estamos perante um quadro de necrozoospermia e, portanto, exige um estudo mais profundo, uma biópsia testicular, para obter informação clínica relativamente à qualidade da espermatogénese, e para exclusão da possibilidade de cancro do testículo.

2.2. Valores de Referência e Classificação das Patologias Associadas

Os valores de referência dos parâmetros seminais clássicos acima referidos, assim como a classificação das patologias associadas encontram-se representados nas tabelas abaixo.

Tabela 1 - Valores de Referência dos Parâmetros Seminais Convencionais Avaliados no Espermograma (WHO, 2010)

Parâmetro espermático	Valor de Referência
Liquefação	Completa aos 60 minutos
Cor	Cor cinza e opalescente
Cheiro	<i>Sui generis</i>
Volume (ml)	1,5 (1,4-1,7)
pH	$\geq 7,2$
Viscosidade	Normal
Concentração (10^6 espermatozoides/ml)	15 (12-16)
Número total de espermatozoides (10^6 espermatozoides/ejaculado)	39 (33-46)
Mobilidade total (progressiva e in situ, %)	40 (38-42)
Mobilidade progressiva (%)	32 (31-34)
Morfologia normal (%)	4 (3,0-4,0)
Vitalidade (%)	58 (55-63)
Hipoosmoloridade (%)	58 (55-63)

Tabela 2 - Patologias Associadas à Qualidade dos Parâmetros Seminais Convencionais (WHO, 2010).

Nomenclatura	Descrição
Normozoospermia	O número total e a percentagem de espermatozoides com mobilidade progressiva e morfologia normal são iguais ou superiores aos limites inferiores de referência.
Oligozoospermia	O número total de espermatozoides está abaixo do limite inferior de referência.
Azoospermia	Ausência de espermatozoides no ejaculado.
Oligoastenoospermia	O número total e a percentagem de espermatozoides com mobilidade progressiva estão abaixo dos limites inferiores de referência.
Teratoospermia	A percentagem de espermatozoides com morfologia normal está abaixo do limite inferior de referência.
Oligoteratoospermia	O número total e a percentagem de espermatozoides com morfologia normal estão abaixo do limite inferior de referência.
Astenoteratoospermia	A percentagem de espermatozoides com mobilidade progressiva e com morfologia normal está abaixo do limite inferior de referência.
Oligoastenoteratoospermia	O número total e a percentagem de espermatozoides com mobilidade progressiva e com morfologia normal estão abaixo do limite inferior de referência.

2.3. Testes Complementares à Análise Seminal de Importância Diagnóstica

Os testes de função espermática mostram claramente que um simples espermograma não permite prever o potencial de fertilidade masculina uma vez que este exame apenas avalia a qualidade da amostra seminal e não a capacidade de fertilização do espermatozoide.

Efetivamente, cerca de 15% dos pacientes inférteis têm uma análise espermática normal (Agarwal et al., 2020).

Os testes de função espermática empregues rotineiramente na clínica a par com o espermograma são: o teste de fragmentação de ADN espermático, teste de vitalidade e o teste de migração espermática. Apesar do espermograma ser o exame de primeira linha a ser solicitado, dependendo do resultado do espermograma, testes complementares devem ser solicitados para identificar qual o problema de infertilidade do paciente e, assim, indicar tratamentos e a técnica de PMA ideal a ser realizada.

Na realidade, o que dita a técnica de PMA a ser empregue é o fator de infertilidade diagnosticado. Isto é, caso o espermograma não indique qualquer anormalidade assim como os resultados adquiridos dos exames complementares, e sem causa feminina associada, o procedimento do tratamento consiste numa primeira instância na tentativa de sucesso recorrendo à técnica mais simples e menos invasiva de PMA, a Inseminação Intrauterina (IIU). Caso, após 2 a 3 ciclos de IIU não resulte no sucesso de tratamento, recorre-se à Fertilização in vitro (FIV) e, por fim, caso a FIV não resulte ao fim de 2 a 3 ciclos, procede-se à técnica mais invasiva a Microinjeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI).

2.3.1. Métodos Para Avaliar a Integridade da Cromatina / ADN nos Espermatozoides

Os métodos existentes para avaliar a integridade da cromatina/ADN nos espermatozoides (fragmentação do ADN espermático, sADNfrag) são, geralmente, classificados em ensaios diretos e em ensaios indiretos. De forma a melhorar o sucesso de conceção associada às técnicas de PMA, foram desenvolvidos vários métodos não invasivos que permitem selecionar espermatozoides livres de danos no ADN.

Os ensaios diretos visam medir a extensão do sADNfrag, recorrendo ao uso de corantes e sondas. Por outro lado, os ensaios indiretos avaliam as quebras do ADN e a suscetibilidade do ADN à desnaturação, que ocorre mais comumente no ADN fragmentado.

Existem diversas técnicas para avaliar a integridade do ADN nos espermatozoides, com diferentes especificidades e analisando diferentes aspetos, tais como, a presença de fragmentação do ADN, a presença de histonas, o grau de descondensação da cromatina ou uma associação destes (Sousa et al., 2010).

Tais técnicas podem basear-se em métodos de fluorescência (TUNEL, ISNT, COMET, SCSA, CMA3 e o teste de laranja de acridina), usados maioritariamente em laboratórios de pesquisa, ou métodos colorimétricos (azul de anilina, azul de toluidina, SCD e o teste baseado na coloração tipo Diff-Quick). Importante reconhecer que os métodos fluorescentes requerem equipamentos dispendiosos (tais como a citometria de fluxo, microscópio de fluorescência ou equipamento de eletroforese) e, portanto, a maioria dos laboratórios de andrologia não são providos destes equipamentos (Sousa et al., 2010).

Para além disso, tais técnicas exigem protocolos complexos (associados à dificuldade de execução) e, portanto, necessitam de investimento por parte das entidades responsáveis na formação de andrologistas para trabalhar com tais técnicas (Sousa et al., 2010).

Apesar das técnicas existentes para a avaliar sADNfrag, este trabalho apenas fará referência ao teste baseado na coloração tipo Diff-Quick, uma vez que este é o único teste empregue na clínica para avaliar a percentagem de fragmentação do ADN espermático.

O teste baseado na coloração Diff-Quick, em comparação com os outros testes, é empregue rotineiramente em vários laboratórios de andrologia pois para além de ser uma técnica simples é em termos de custos a mais acessível.

2.3.2. Teste Baseado na Coloração Diff-Quick

O método de coloração tipo Diff-Quick é um método simples, rápido e menos dispendioso que as restantes técnicas. Com o kit de coloração de morfologia existente num laboratório de andrologia, kit de coloração utilizado para avaliar a morfologia dos espermatozoides, também se pode avaliar a fragmentação do ADN. Este método não envolve a realização de técnicas adicionais, nem necessita de reagentes e equipamentos adicionais aos já existentes num laboratório de andrologia. Este método permite a detetar espermatozoides com quebras no ADN ou com a cromatina descondensada. Desta forma, espermatozoides com danos no ADN possuem núcleos que apresentam uma coloração mais escura (roxo escuro) enquanto os espermatozoides que possuem a cromatina íntegra apresentam núcleos com uma coloração normal (roxo claro).

2.3.3. Teste de Vitalidade

Como já referido anteriormente, o teste de vitalidade tem como objetivo avaliar a percentagem de espermatozoides vivos numa amostra de sémen. Este teste pode ser empregue rotineiramente na análise de todas as amostras de sémen, mas é de extrema importância a sua realização em amostras que apresentam menos de 40% de espermatozoides com mobilidade progressiva (MP) e *in situ* (MP+C \geq 40%) (WHO, 2010). Deste modo, é clinicamente importante avaliar se os espermatozoides imóveis estão vivos ou mortos. Segundo as diretrizes da OMS os resultados de vitalidade devem ser avaliados em conjunto com os de mobilidade da mesma amostra de sémen, sendo que a vitalidade deve ser igual ou superior à mobilidade (WHO, 2010). Desta forma, a vitalidade dos espermatozoides é avaliada através da integridade da membrana das células.

2.3.3.1. Teste de Vitalidade dos Espermatozoides pela Eosina-Nigrosina

O teste de vitalidade pelo método de coloração com eosina-nigrosina baseia-se na avaliação da integridade da membrana plasmática das células. Este teste deverá ser efetuado em toda amostra de sémen em que a mobilidade é igual ou inferior a 30% (WHO, 2010).

Caso a membrana celular esteja danificada, a eosina penetra na membrana celular dos espermatozoides mortos (coloração rosa-vermelho). Desta forma, conseguimos distinguir ao microscópico ótico os espermatozoides mortos (cabeça dos espermatozoides coram rosa-vermelho) dos espermatozoides vivos (espermatozoides com cabeça branca).

A nigrosina é usada com a finalidade de fornecer um fundo escuro (a lâmina fica preta) para ser mais fácil a interpretação do resultado. Assim sendo, ajuda a uma melhor visualização para a contagem dos espermatozoides vivos.

O procedimento para a realização do teste eosina envolve os seguintes passos:

1. Misturar uma alíquota da amostra de sémen com eosina na proporção de 1:1, e levar à incubadora por 30 segundos
2. Colocar uma gota na extremidade de uma lâmina e realizar uma distensão (esfregaço) para visualização da preparação ao microscópico em campo claro (Figuras 3 e 4)
3. Deixar secar ao ar e contar pelo menos 200 espermatozoides na objetiva de imersão (100 vezes) sem contraste de fase.
4. Espermatozoides não corados são considerados vivos, e os espermatozoides corados são considerados mortos (Figura 5).

Segundo a OMS, o limite inferior de referência para a vitalidade é de 58% (WHO, 2010).

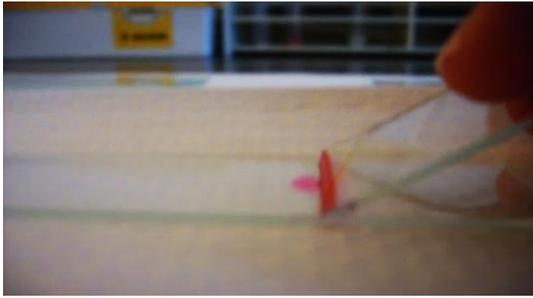


Figura 3 - Realização do esfregaço da preparação de eosina com espermatozoides para visualização ao microscópio.

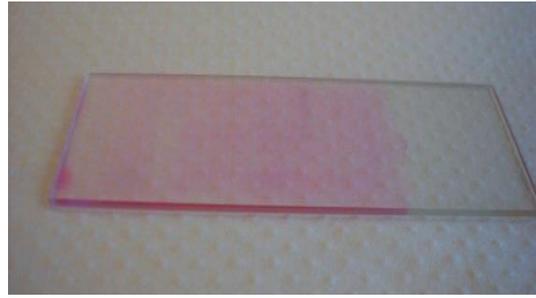


Figura 4 - Esfregaço pronto para ser visualizado ao microscópio.

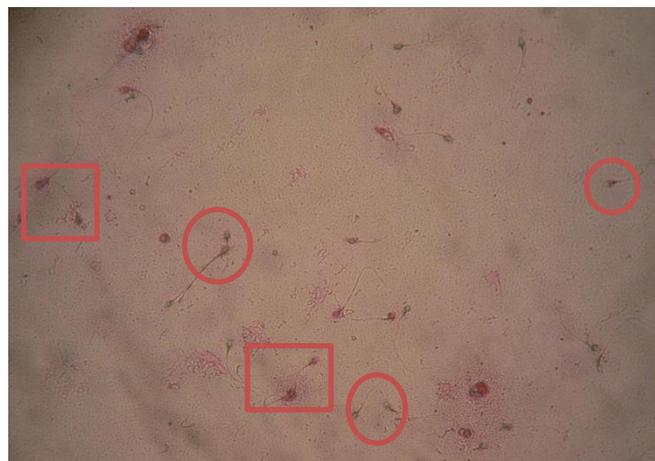


Figura 5 - Visualização do esfregaço para avaliar a vitalidade de uma amostra seminal. É possível observar espermatozoides vivos (rodeados por um círculo) e mortos (delimitados por um quadrado).

2.3.3.2. Teste Hiposmótico

O teste hiposmótico é um teste de vitalidade espermática que é aplicado em alternativa à exclusão de corantes. Importante mencionar que o teste de coloração não deve ser empregue caso se pretenda realizar uma ICSI, mas sim o teste hiposmótico na medida que a coloração dos espermatozoides pode afetar a fecundação (WHO, 2010).

O teste hiposmótico avalia a integridade funcional da membrana celular das células quando colocados numa solução hiposmótica. Neste caso, apenas as membranas das células intactas permitem a entrada de solução hiposmótica. A entrada de solução hiposmótica vai resultar numa expansão do volume celular. Os espermatozoides que possuem a membrana danificada (mortos) não há expansão do volume celular enquanto os espermatozoides que possuem uma membrana

íntegra (vivos) permitem a entrada de solução hiposmótica, incham, e verifica-se um enrolamento da cauda devido à entrada de água (Figura 6). Deste modo, os espermatozoides vivos são distinguidos pela expansão do volume celular e pelo enrolamento da cauda. Os espermatozoides que apresentam esta característica, representam a percentagem de células vivas (membrana intacta).

Este teste deve ser solicitado quando o paciente apresenta um quadro de astenozoospermia severa (mobilidade espermática inferior a 30%) ou em situações de ausência de mobilidade espermática e, portanto, a técnica de PMA a ser empregue é a ICSI e, por essa razão, temos que diferenciar os espermatozoides com ausência de mobilidade dos espermatozoides mortos.

Segundo as orientações da OMS uma amostra que possua mais de 58% dos espermatozoides com enrolamento da cauda é considerada normal.

Importante mencionar que o teste hiposmótico deve ser realizado em amostras frescas e não em amostras criopreservadas, devido ao procedimento de criopreservação, que pode levar à ilação de resultados não fidedignos (Esteves et al., 1996).

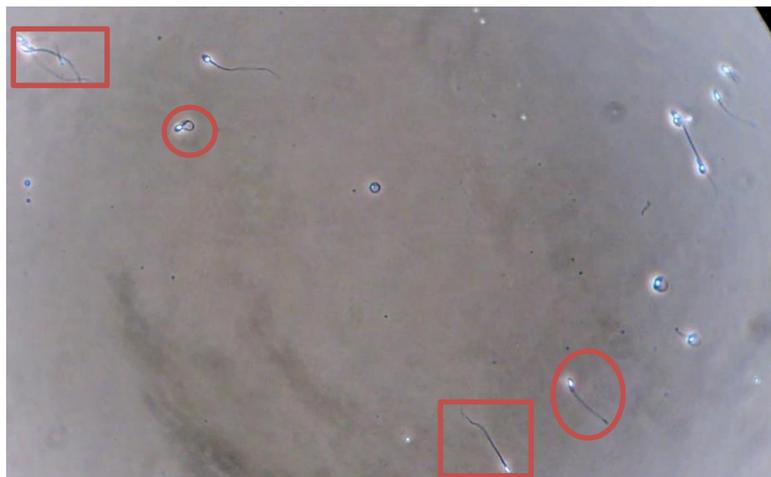


Figura 6 - Visualização de espermatozoides após incubação com a solução hipoosmótica. Espermatozoides com a cauda enrolada (possuem a membrana intacta) estão rodeados por um círculo; espermatozoides com a cauda não enrolada (possuem algum defeito na sua membrana) estão delimitados por um quadrado.

2.4. Técnicas Clássicas de Preparação de Esperma

Os espermatozoides quando saem do trato reprodutor masculino ainda não têm capacidade de fertilização. Na realidade, os espermatozoides adquirem a capacidade de fertilização naturalmente no trato reprodutor feminino, processo esse designado por capacitação. A capacitação é um processo que compreende mudanças na membrana plasmática dos espermatozoides, mudanças essas essenciais para a fusão do espermatozoide com o ovócito. Assim sendo, a capacitação dos espermatozoides tem de ser realizada em laboratório, de forma artificial. Deste modo, as técnicas de capacitação espermática têm como objetivo capacitar os espermatozoides a usar nas diversas práticas laboratoriais de PMA.

A seleção de uma técnica em detrimento de outra depende da qualidade da amostra seminal. Desta forma, o swim-up (SU) é usado maioritariamente em amostras normozoospermicas enquanto em situações de oligozoospermia severa, teratozoospermia ou astenozoospermia é realizada a técnica de centrifugação de gradientes de densidade.

As técnicas de preparação de espermatozoides, descritas neste trabalho, têm como objetivo selecionar espermatozoides morfolologicamente normais e com maior mobilidade, que supostamente são esses os espermatozoides, recuperados através destas técnicas, que são capazes de fertilizar o ovócito maduro.

Assim sendo, a fração recuperada através destas técnicas é a fração usada nas diversas técnicas de PMA.

O teste de migração espermática é um teste importante na medida que perante um quadro de oligozoospermia moderada, a técnica de reprodução assistida a ser empregue depende do resultado do teste de migração.

Caso a amostra seminal seja oligoastenozoospermica procede-se à recuperação de espermatozoides móveis através da técnica de centrifugação de gradientes de densidade. Nesta situação, o SU não é realizado porque perante uma amostra com uma percentagem de espermatozoides móveis baixa e concentração baixa, iríamos obter uma percentagem muito baixa de espermatozoides viáveis que conseguiriam ascender até à superfície.

Todavia, estas técnicas apresentam as suas limitações dado que tais técnicas não são capazes de selecionar os espermatozoides de acordo com a sua competência funcional ou qualidade genética.

2.4.1. Processamento Seminal

As técnicas utilizadas num laboratório de PMA consistem na: lavagem seminal (sperm wash), migração ascendente de espermatozoides (swim-up) e gradiente descontínuo de densidade (GDD). A técnica de processamento seminal ideal deve: selecionar o maior número de espermatozoides com melhor morfologia e mobilidade; não provocar alterações fisiológicas ou lesões à membrana dos espermatozoides e deve remover espermatozoides anormais, mortos e restos celulares (Henkel & Schill, 2003).

O processamento seminal tem como objetivo a remoção de líquido seminal e restos celulares através da centrifugação da amostra, que permite selecionar os espermatozoides com melhor morfologia e mobilidade para poderem ser utilizados nas técnicas de reprodução assistida.

Desta forma, assim que a amostra a fresco é entregue no laboratório, o primeiro passo é confirmar a identidade do paciente e colocar a liquefazer na platina, aquecida a 37°C, cerca de 30 minutos no interior da câmara de fluxo laminar. Após a completa liquefação da amostra, procede-se ao processamento da amostra.

Importante mencionar que na véspera da IIU, FIV ou ICSI ou pelo menos 2 horas antes de se realizar a preparação do esperma, os meios utilizados nas técnicas de capacitação devem ser preparados antecipadamente.

2.4.2. Gradiente de Densidade Descontínuo (GDD)

A técnica de GDD consiste na centrifugação da amostra para que esta passe por dois meios de densidades diferentes (um gradiente mais denso e outro menos denso). O volume total dos gradientes de densidade tem de ser igual ao volume da amostra e, portanto, assim estabelecido o volume de gradiente a usar, a amostra é colocada cuidadosamente no topo dos gradientes, sendo que o gradiente menos denso é o mais próximo do ejaculado e o mais denso está mais próximo do fundo do tubo.

Sendo assim, é adicionado o gradiente mais denso seguido do gradiente menos denso. Seguidamente, a amostra é colocada cuidadosamente no topo dos gradientes, e de seguida é sujeita a uma primeira centrifugação de 20 minutos a 1500 rpm.

Durante a centrifugação, os espermatozoides com melhor mobilidade deslocam-se ativamente em direção ao gradiente de sedimentação. Por outro lado, observa-se que os espermatozoides com pouca mobilidade ou imóveis não conseguem migrar em direção ao gradiente de sedimentação. Após o término da primeira centrifugação, com uma pipeta de Pasteur é retirado o sobrenadante (espermatozoides anormais, imaturos e senescentes, detritos celulares, células epiteliais, bactérias

e líquido seminal), sem interferir com o pellet. De seguida, e com uma nova pipeta de Pasteur, o pellet é retirado do tubo e colocado num tubo novo. Nesse tubo é adicionado 2 ml de meio de lavagem próprio de espermatozoides, e logo de seguida a amostra é homogeneizada.

Seguidamente, a amostra é sujeita a uma segunda centrifugação de 10 minutos a 1300 rpm.

A etapa anterior é realizada novamente, ou seja, após finalizada a segunda centrifugação é retirado o sobrenadante, é adicionado 2 ml de meio de lavagem e homogeneizamos a amostra que vai novamente a centrifugar durante 10 minutos a 1300 rpm.

Como já referido anteriormente, a lavagem da amostra é de extrema importância na medida que, tem a finalidade eliminar o líquido seminal (contém componentes como as prostaglandinas e zinco, que interferem no sucesso da concepção recorrendo à reprodução assistida mas que são extremamente necessários na concepção natural para que os espermatozoides consigam penetrar o muco cervical) (Katz et al., 1980) e restos celulares. Após a separação dos espermatozoides do líquido seminal e dos restantes componentes celulares, obtemos uma amostra limpa com uma alta percentagem de espermatozoides morfológicamente normais e móveis (livre de espermatozoides anormais, imaturos e senescentes, detritos celulares, células epiteliais, bactérias e líquido seminal) (Mortimer, 1991) (Figura 7).

Assim que a terceira e última centrifugação termina é retirado o sobrenadante e de seguida é adicionado o meio de cultura próprio de espermatozoides e homogeneizamos a amostra. Este processo demoroso resulta num pellet rico em espermatozoides altamente móveis. Por último, é analisada a amostra com o objetivo de avaliar a concentração e mobilidade da mesma.

Comparativamente com a técnica de SU, esta técnica requer uma centrifugação lenta e mais demorada, para que os espermatozoides móveis consigam atravessar os diferentes gradientes e alcancem o fundo do tubo.

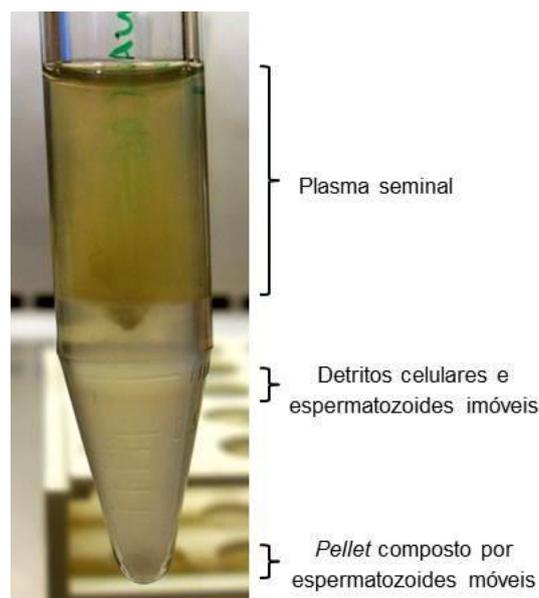


Figura 7 - Amostra seminal após centrifugação, sendo visível os diferentes constituintes separados.

2.4.3. Migração Ascendente (Swim-up)

O swim-up (SU) convencional é uma técnica de capacitação espermática que é baseado no movimento ativo dos espermatozoides através da adição de um meio de cultura próprio para espermatozoides, que promove a mobilidade dos espermatozoides.

Após se ter procedido à centrifugação da amostra, o sobrenadante é descartado, e adiciona-se novamente uma pequena quantidade do meio de cultura sobre a amostra, gota-a-gota, (dependendo se queremos uma amostra mais concentrada ou menos concentrada) (Figura 8).

Seguidamente, o tubo é colocado na estufa a 37°C num suporte com uma inclinação de 30° para os espermatozoides conseguirem ascender até à superfície (Figura 9). Os espermatozoides capacitados são aqueles que conseguiram nadar até à superfície, e é essa a fração utilizada nas técnicas.

Cerca de 20 minutos após incubação, o tubo é retirado da estufa e o sobrenadante (contém os espermatozoides capacitados) é colocado num outro tubo limpo e devidamente identificado. Por último, a fração SU é analisada em termos de concentração e mobilidade.

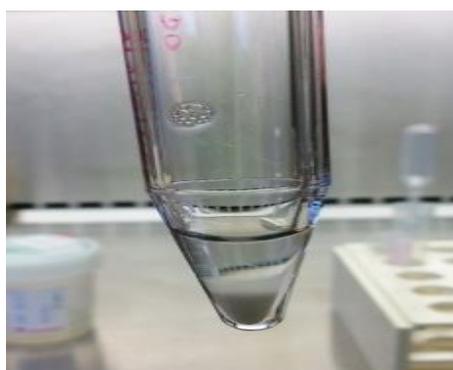


Figura 8 - Amostra preparada para o SU, onde é visível o pellet.



Figura 9 - Amostra em incubação na estufa a 37°C num suporte com uma inclinação de 30°, durante o SU.

2.5. Inseminação Intrauterina (IIU)

As principais indicações para a IIU incluem: fator masculino ligeiro (quadros clínicos de oligozoospermia ligeira), casais de mulheres (que necessitam de recorrer a esperma criopreservado de dador fértil), infertilidade idiopática, incompatibilidade muco-esperma, distúrbios ejaculatórios ou quando se pretende evitar o risco de transmissão de doenças genéticas pelo progenitor masculino.

A IIU é uma abordagem terapêutica de primeira linha que apenas é considerada para mulheres sem qualquer dano na fertilidade.

Dessa forma, é uma técnica limitada a mulheres com: endometriose avançada em que a endometriose alcançou as trompas de falópio e os ovários, afetando a qualidade ovocitária; patologia do fator tubário e idade materna. A partir dos 35 anos a fertilidade feminina diminui significativamente, diminuição da reserva ovárica e ovócitos envelhecidos, e aumentam o número de casos de abortos espontâneos, visto que a regulação da maturação ovocitária não é tão eficaz.

A IIU é a técnica de PMA que apresenta as taxas de gravidez mais baixas, com uma taxa de gravidez por ciclo de 10 a 20% (Allahbadia, 2017).

A IIU é um tratamento simples, rápido, minimamente invasivo e mais económico tendo em consideração outras técnicas mais dispendiosas de PMA.

Esta técnica pode ser realizada durante um ciclo natural ou com recurso à indução da ovulação, desencadeada artificialmente através de medicação hormonal. Caso seja necessário induzir a estimulação ovárica estão disponíveis diferentes terapêuticas médicas consoante a avaliação prévia da causa de infertilidade da paciente.

Quando se recorre à hiperestimulação controlada da ovulação, a gravidez múltipla é um risco possível e, portanto, em ciclos em que existam mais de três folículos em desenvolvimento não se deve proceder com esta técnica. Na verdade, para que a IIU resulte numa gravidez saudável é aconselhável que em ciclos estimulados se procure sempre o desenvolvimento monofolicular para reduzir complicações associadas à gravidez múltipla. Desta forma, durante todo o protocolo de estimulação o desenvolvimento folicular é monitorizado através da realização de ecografias, de modo a controlar o número de folículos em desenvolvimento.

Para realizar esta técnica, é necessário proceder primeiramente ao processamento da amostra seminal no laboratório de andrologia, através de técnicas de capacitação de espermatozoides. O limite mínimo para a eficácia desta técnica, pós-processamento seminal, são 5 milhões de espermatozoides móveis por ml de amostra que são concentrados num pequeno volume (0,5 ml). O sobrenadante é cuidadosamente aspirado para uma seringa e entregue ao médico, que depositará a amostra tratada na cavidade uterina da paciente.

Esta técnica exige apenas a introdução de um catéter fino e flexível, para fazer a introdução de uma quantidade otimizada de espermatozoides, na cavidade uterina.

Assim, no dia previsto para que a ovulação ocorra é introduzida uma quantidade otimizada de espermatozoides na cavidade uterina para que estes consigam ir ao encontro do ovócito maduro e fecundá-lo. A colocação dos espermatozoides é feita no interior do útero de modo a garantir que caso haja alterações no pH do muco cervical ou na viscosidade do mesmo, os espermatozoides consigam alcançar a extremidade uterina.

Duas semanas após o procedimento, realiza-se um teste de gravidez no qual é quantificada a hormona hCG.

Parte 3 – Laboratório de Embriologia

3.1. Estimulação Ovárica e Punção Folicular

Quando se faz referência a um ciclo induzido é necessário diferenciar as pacientes que apresentam ciclos anovulatórios das pacientes que serão submetidas à hiperestimulação controlada da ovulação, com o objetivo de promover o desenvolvimento multifolicular (Santos, 2018a).

Por outro lado, a hiperestimulação controlada da ovulação, também designada por estimulação folicular múltipla, destina-se a promover a maturação ovocitária, isto é, induzir o desenvolvimento de vários folículos maduros, estruturas que contêm o ovócito.

Existem vários tipos de protocolos de indução da ovulação e hiperestimulação controlada da ovulação consoante a técnica de PMA a ser empregue. Assim, a diversidade de fármacos indutores da ovulação permite, por um lado a individualização do tratamento de acordo com o perfil de cada paciente e reduz a possibilidade de complicações (Santos, 2018a).

Existem vários tipos de protocolos de estimulação ovocitária, que incluem diversos fármacos indutores da ovulação, cada um com as suas vantagens e indicações, em que a escolha de determinado fármaco em detrimento de outro e a respetiva dose a administrar dependem dos seguintes fatores: idade, reserva ovárica, resposta a estimulações prévias, índice de massa corporal e a causa de infertilidade.

As gonadotrofinas são a terapêutica médica aplicada na maioria dos ciclos de PMA para a indução controlada da ovulação. Para tal, estão disponíveis diferentes protocolos de estimulação ovocitária dos quais se destacam os protocolos longos com início na fase luteínica do ciclo precedente e os protocolos curtos, com início na fase folicular (Santos, 2018a). Por outro lado, também se pode optar pelo ciclo natural em que se aspira o folículo dominante no decurso de um ciclo menstrual natural, sem recurso a fármacos indutores da ovulação ou, então, após a estimulação da ovulação com a hormona gonadotrófica coriônica (hCG) para promover a maturação ovocitária final.

A indução controlada da ovulação pode, em alguns casos, induzir a hiperestimulação ovárica (SHO), que é uma síndrome da resposta exagerada ao tratamento de indução da ovulação. As mulheres com SHO possuem vários folículos maduros e níveis altos de estradiol, que levam a que a mulher desenvolva sintomas, consoante o grau de gravidade da SHO (ligeira, moderada ou grave), como o inchaço abdominal, náuseas, alterações na coagulação sanguínea, ganho de peso devido à acumulação de fluídos no abdómen/tórax ou alterações na função renal e/ou hepática que necessitem de hospitalização. Caso a paciente apresente SHO no dia da transferência, esta é adiada e recorre-se a freeze all.

A administração de fármacos para a estimulação dos ovários, pode durar cerca de 8 a 10 dias. Durante a estimulação ovárica são realizadas análises (2 a 3 vezes) e várias ecografias transvaginais (2 a 3 vezes), durante a fase folicular, que nos permite monitorizar o crescimento dos folículos.

O desenvolvimento folicular adequado verifica-se quando os folículos alcançam a dimensão e um número adequado para se dar início ao tratamento. Desta forma, efetua-se a medição dos diâmetros foliculares e os níveis de estradiol no sangue produzido nas células da granulosa dos folículos em crescimento. Assim que o clínico verifique que há um desenvolvimento folicular adequado, induz a maturação ovocitária final pela administração de hCG e agenda-se o procedimento para a punção folicular. A punção folicular realiza-se 34-36 horas depois da administração da hCG.

A colheita de ovócitos demora cerca de 10-15 minutos e é realizada com controlo ecográfico e sob sedação. Consiste na introdução por via vaginal de uma agulha muito fina (agulha de punção) que permite a recolha de ovócitos, a partir de cada um dos ovários, por aspiração (Figura 10). O processo de colheita de ovócitos não é doloroso, uma vez que a paciente está sob o efeito de anestesia, mas a estimulação ovárica, por outro lado, pode causar algum desconforto abdominal, geralmente ligeiro. Após a colheita, a paciente fica em recobro cerca de 30 minutos após o procedimento, e poderá retomar a sua atividade após o período de recobro. Importante salientar que a colheita de ovócitos não altera os ciclos menstruais posteriores.

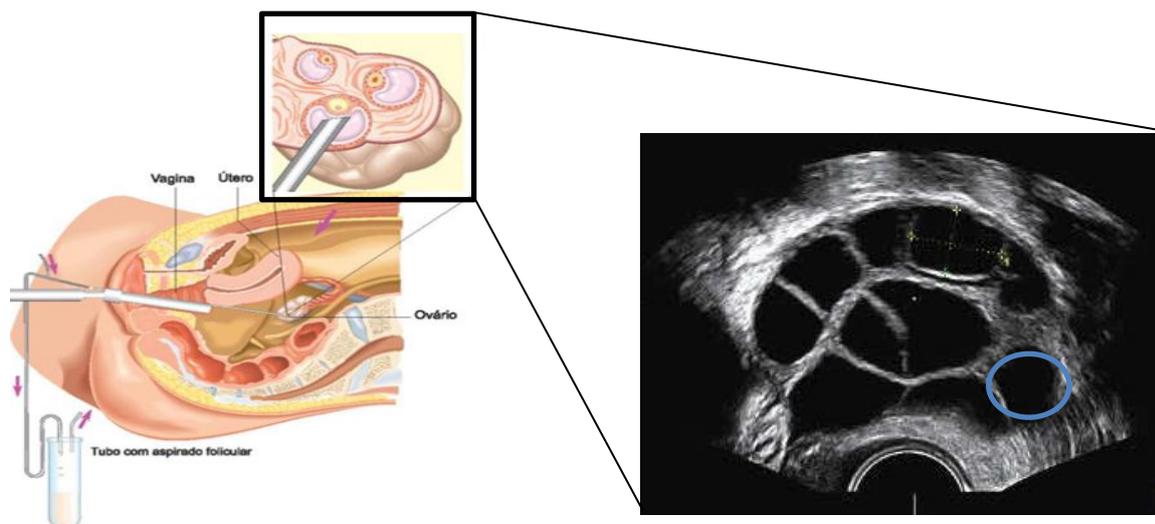


Figura 10 - Punção folicular (à esquerda). Retirado de: <http://www.fertilityhandbook.com/pages/mini-ivf-minimal-stimulation-ivf/mini-ivf-procedural-overview.php>, acedido no dia 14/08/2021. Vista ecográfica de um ovário com vários folículos prontos a serem aspirados (à direita). Cada formação preta é um folículo (circundado a azul). Retirado de: <http://www.fertilityhandbook.com/pages/mini-ivf-minimal-stimulation-ivf/mini-ivf-procedural-overview.php>, acedido no dia 14/08/2021

No decorrer da punção folicular, ocorre em simultâneo no laboratório de embriologia a recuperação dos ovócitos no líquido folicular (Figuras 11, 12, 13 e 14).



Figura 11 - Recolha do líquido folicular dos ovários de uma paciente. A fotografia é propriedade da Ferticentro e foi reproduzida com permissão.

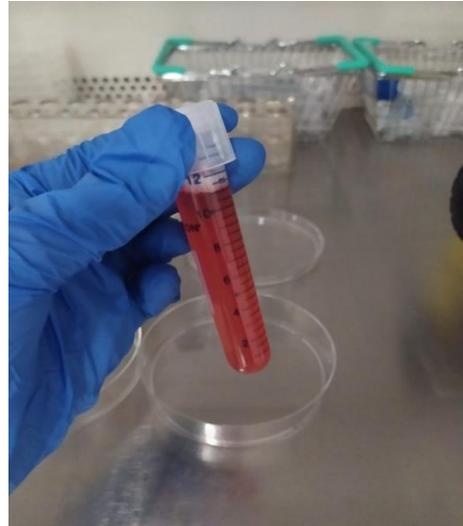


Figura 12 - Líquido folicular pronto a ser analisado à lupa para a pesquisa de ovócitos. A fotografia é propriedade da Ferticentro e foi reproduzida com permissão.

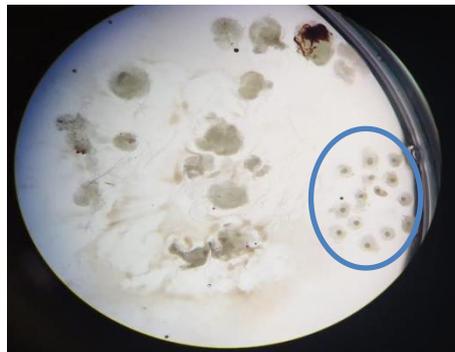


Figura 13 - Ovócitos (circundado a azul) em meio flushing, após punção.



Figura 14 - Ovócitos são armazenados na placa de cultura com meio próprio (fertilization), onde vão ser armazenados na incubadora pelo menos 2 horas.

3.2. Técnicas de Procriação Medicamente Assistida (PMA)

A concepção natural é um processo deslumbrante em toda a sua magnitude e extremamente complexo que depende do normal funcionamento de várias fases críticas que caracterizam o processo de concepção natural.

A OMS define a infertilidade “como a incapacidade de um casal em idade reprodutiva alcançar uma gravidez clínica após 12 meses ou mais de relações sexuais regulares e desprotegidas”.

Segundo dados recentes publicados pela OMS, a infertilidade é uma doença que afeta cerca de 10 a 15% dos casais em idade reprodutiva (Zegers-Hochschild et al., 2017).

A avaliação clínica inicial do casal é extremamente importante para dar a conhecer a história reprodutiva do casal, a sua sexualidade e fatores de risco que estejam associados à atividade profissional e/ou lazer, assim como outros parâmetros igualmente importantes que o médico considere essencial para uma melhor compreensão do historial clínico do casal. Após a entrevista, que permite recolher toda a informação necessária, são solicitados pelo médico a realização de vários exames e testes para avaliar a causa de infertilidade do casal. Tais exames compreendem análises sanguíneas para avaliação hormonal, exames físicos, espermograma e testes complementares ao estudo seminal (caso se justifique), análise genética e ecografias ginecológicas.

Ao identificar a causa de infertilidade é indicada a melhor terapêutica de PMA. Caso a etiologia da infertilidade seja de causa desconhecida, procede-se como tratamento de primeira linha à Injeção Intracitoplasmática dos espermatozoides (ICSI).

Apesar da taxa de sucesso das técnicas de PMA terem melhorado significativamente ao longo dos anos é importante reconhecer que são processos complexos e, portanto, não há uma garantia que a técnica de PMA resulte numa possível gravidez (K. A. Turner et al., 2020).

Importante reconhecer que a eficácia das técnicas de PMA não ultrapassa os 40% por ciclo, o que significa que a probabilidade de insucesso é superior à de êxito (Santos, 2018a).

Na Europa, estima-se que cerca de 50% dos casais inférteis recorram a técnicas de PMA e destes cerca de metade destes casais necessitará de uma técnica de microinjeção intracitoplasmática de espermatozoides (Santos, 2018b).

A idade materna é o fator mais importante na determinação do sucesso reprodutivo, mesmo com recurso a técnicas de Reprodução Humana Assistida (RHA), dado que a eficácia destas terapêuticas diminuem significativamente com a idade materna (Adamson et al., 2018).

Para a eficácia destas terapêuticas são realizados vários ciclos de FIV/ICSI, para que resulte numa futura gravidez e, dessa forma, pode ser muito dispendioso para o casal.

Para além disso, e uma vez que a eficácia das técnicas RHA diminuem com a idade, os tratamentos só são comparticipados pelo Sistema Nacional De Saúde (SNS) até aos 40 anos de idade no caso da FIV e da ICSI e até aos 42 anos de idade no caso da Inseminação Intrauterina (IIU), pelo que muitos casais têm de recorrer a clínicas privadas.

3.2.1. Fertilização in vitro (FIV)

As indicações para a FIV incluem: fator masculino ligeiro, fator imunológico, fator feminino (lesão ou obstrução das trompas de falópio, fator uterino, baixa reserva ovárica, idade materna avançada), infertilidade idiopática e falha em ciclos prévios de IIU.

O sucesso da FIV depende de uma adequada estimulação ovárica para que seja possível a recuperação de um número razoável de ovócitos.

Esta técnica consiste na estimulação controlada da ovulação com recurso a gonadotrofinas (hormona foliculoestimulante-FSH ou gonadotrofinas menopáusicas humanas-hMG) que têm a finalidade de induzir o desenvolvimento de vários folículos. Desta forma, a indução do crescimento folicular múltiplo com recurso a fármacos tem como objetivo a recuperação de ovócitos maduros capazes de serem fecundados in vitro pelos espermatozoides previamente selecionados.

Por outro lado, pode-se recorrer ao ciclo natural em que se aspira o folículo dominante no decurso de um ciclo menstrual espontâneo, sem recurso a fármacos.

A FIV consiste na união *in vitro* dos ovócitos maduros, sem desnudar os ovócitos (as células de cumulus oophorus são essenciais para a fecundação ocorrer), com os espermatozoides previamente selecionados (pós-processamento seminal), a fim de obter embriões fecundados. As células de cumulus oophorus são uma das barreiras que o espermatozoide tem de passar para que ocorra fertilização e possuem inúmeras funções, tais como a proteção e maturação do ovócito. Desse modo, as células de cumulus só são removidas (desnudação) para a confirmação da fecundação. Assim, é no terceiro ou quinta dia de cultura embrionário que é transferido apenas um único embrião para o útero, por via transcervical, que se espera que possa resultar numa gravidez. A taxa de sucesso da FIV calcula-se através de bebés saudáveis que nascem, e por isso é que normalmente só se transfere um único embrião.

3.2.1.1. Preparação de Ovócitos

Após a recuperação ovocitária, os ovócitos são colocados numa placa que contém meio de cultura próprio de ovócitos (meio fertilization) e são incubados a 37°C cerca de 1 a 2 horas. Seguidamente, é colocada na placa de cultivo 1 gota de cerca de 100 microlitros de meio de cultura próprio de ovócitos (para a lavagem dos ovócitos) e cerca de 8 gotas de cerca de 50 microlitros do mesmo meio de cultura (dependendo do número de ovócitos obtidos pois deve-se meter um ovócito por gota). Seguidamente, é adicionado óleo mineral de maneira a cobrir a placa na totalidade.

3.2.1.2. Inseminação

A amostra seminal processada é adicionada às respectivas gotas presentes na placa de cultura, cerca de 1 a 2 horas após a colheita dos ovócitos. Após a adição da amostra tratada, a placa é colocada na incubadora com 5% O₂ e 6% CO₂, a 37°C. No dia seguinte, cerca de 16 a 18 horas após inseminação procede-se à desnudação dos ovócitos para avaliação da fecundação. A fecundação é marcada pela presença de dois pronúcleos (PN) e de dois glóbulos polares (GP) (Balaban et al., 2011). Os pré-zigotos são mantidos em cultura até ao dia da transferência, que pode ser realizada ao terceiro ou ao quinto dia de desenvolvimento embrionário.

3.2.2. Microinjeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI)

A microinjeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) é uma variante da técnica de FIV, da qual apenas difere no processamento laboratorial dos gâmetas. As indicações para a ICSI, sem fator feminino associado, incluem: fator masculino grave, situações de insucesso em ciclos prévios de FIV, infertilidade idiopática, espermatozoides de biópsia testicular e epididimários, gâmetas criopreservados e biópsia embrionária para estudo genético.

Esta técnica de PMA está associada às elevadas taxas de fecundação que proporciona (superiores a 70%), em situações de degradação severa da espermatogénese, que sem a sua aplicação era praticamente impossível de obter fecundação (Santos, 2018a).

Como mencionado acima, o que difere esta técnica de PMA da técnica convencional de FIV é o processamento laboratorial dos gâmetas.

Esta técnica envolve os seguintes passos até à microinjeção: punção folicular para recolha dos ovócitos ou caso se recorra a ovócitos de dadora descongelar os ovócitos maduros, ou também pode ser a fresco e faz-se sincronia com a recetora (preparação dos ovócitos); preparação do equipamento especializado para micromanipulação; preparação da placa de ICSI; seleção e

imobilização dos espermatozoides; microinjeção do espermatozoide e, por fim, preparação da placa de cultura.

3.2.2.1. Preparação dos Ovócitos - Desnudação

Contrariamente à técnica de FIV convencional, antes de se proceder à microinjeção por aspiração do citoplasma do ovócito é feita a desnudação dos ovócitos. A desnudação é um passo essencial que consiste na remoção das células do complexo cumulus-corona para que, no momento de microinjetar o espermatozoide no citoplasma do ovócito, se consiga visualizar o posicionamento do primeiro glóbulo polar, e desta forma posicionar corretamente o ovócito (posicionamento do ovócito com o glóbulo polar às 00 horas ou às 6 horas). Como se sabe que o fuso maior se encontra por baixo do primeiro glóbulo polar e, como é óbvio não queremos que a microinjeção interfira com o fuso meiótico, a microinjeção do espermatozoide é feita o mais longe possível do fuso meiótico. Para além disso, a remoção incompleta das células da granulosa pode interferir com o procedimento de microinjeção na medida que pode bloquear a agulha de ICSI.

Primeiramente, procede-se à preparação da placa de desnudação com 500 microlitros de enzima hialuronidase (que se encontra armazenada no frigorífico) no primeiro poço e nos restantes 3 poços adicionar 500 microlitros de meio da punção de ovócitos (meio preparado no dia anterior e armazenado na estufa até ao momento da preparação da placa de desnudação) (Figura 15 e 16) . Seguidamente, a placa de poços (placa de desnudação) é coberta com óleo (para o meio não evaporar) e é armazenada na estufa a 37°C para ativação da enzima hialuronidase, por um período 15 minutos (recomendado pelo fornecedor). Seguidamente, retira-se a placa de desnudação da estufa assim como a placa de cultura de ovócitos da incubadora horizontal a 37°C (onde permaneceu cerca de 1 hora após o procedimento de punção folicular) para se proceder, então, à desnudação.

A desnudação ocorre em duas etapas: desnudação química ou enzimática e a desnudação mecânica.

A desnudação química é a primeira etapa da desnudação parcial dos ovócitos. Á lupa e na superfície aquecida (37°C) da câmara de fluxo laminar vertical, colocar os ovócitos no 1º poço da placa de desnudação (contém a enzima hialuronidase) com o auxílio de uma pipeta para a manipulação dos ovócitos, e ressuspender suavemente os ovócitos nesse meio. O tempo de exposição dos ovócitos à solução de hialuronidase deve obedecer às recomendações de tempo máximo do fornecedor. A hialuronidase é uma das enzimas libertadas durante o processo de reação acrossómica dos espermatozoides, no processo concepção natural, para despolimerizar o ácido hialurónico presente na matriz extracelular das células de cumulus oophorus (enfraquece as

ligações intercelulares, facilitando a sua remoção) permitindo, assim, que o espermatozoide alcance a zona pelúcida.

Seguidamente, procede-se à desnudação mecânica que consiste na remoção total das células do complexo cumulus-corona (células da granulosa) através de repetidas pipetagens, utilizando-se pipetas de Pasteur ou strippers de diâmetros decrescentes. Após a exposição dos ovócitos à solução de hialuronidase, com o auxílio de uma stripper de maior diâmetro procede-se à aspiração dos ovócitos para o 2º poço da placa de desnudação (aspirar e soltar cuidadosamente).

Seguidamente, passar os ovócitos para o poço 3 e 4, com o auxílio de uma stripper mais fina uma vez que a maior parte das células do cumulus e da corona já foram removidas e, para além disso, o uso de uma stripper mais fina permite uma maior fricção das restantes células que estão mais juntas à zona pelúcida dos ovócitos, fazendo com que estas sejam libertadas. À medida que os ovócitos são aspirados e expelidos da stripper, as restantes células do cumulus e da corona são libertadas até que os ovócitos ficam completamente desnudados.

Posteriormente, os ovócitos desnudados são avaliados à lupa de modo a observar o estado de maturação nuclear, assim como avaliar qualidade de cada um dos ovócitos (analisar cuidadosamente se os ovócitos não se encontram degenerados ou anormais).

Posteriormente, os ovócitos maduros são transferidos para uma outra placa, placa de cultura para fertilização, prepara no dia anterior e que fica armazenada na incubadora horizontal a 37°C. Antes de estes serem armazenados no 1º poço da placa de cultura (anotar o número de ovócitos maduros na placa), os ovócitos maduros passam pelos restantes poços com o objetivo de eliminar restos do meio da placa de desnudação. Em seguida, a placa de cultura é armazenada na incubadora horizontal a 37°C até à microinjeção (devem permanecer cerca de 2 horas na incubadora horizontal até à microinjeção).



Figura 15 - Bancada aquecida (zona mais clara) e lupa, onde se realiza a denudação dos ovócitos.



Figura 16 - Placa de desnudação de ovócitos e pipetas Stripper para a desnudação de ovócitos.

3.2.2.1.1. Avaliação da Maturidade e da Qualidade Ovocitária

Previamente à realização da ICSI e após a desnudação dos ovócitos, o estado de maturação nuclear é avaliado minuciosamente. Os ovócitos podem encontrar-se em diferentes fases de maturação nuclear: ovócitos em vesícula germinativa (Prófase I), ovócitos em metafase I e ovócitos em metafase II (maduro). Os ovócitos em vesícula germinativa (VG), a presença desta estrutura indica imaturidade ovocitária e, portanto, não devem ser utilizados em técnicas de PMA (Figura 17). Os ovócitos em metafase I (MI) não é visível a presença do primeiro GP no espaço perivitelino, que indica que a primeira divisão meiótica ainda não foi finalizada e, portanto, o ovócito é considerado imaturo (Figura 18). Caso se trate de ovócitos da própria paciente pode optar-se por deixar em meio de cultura próprio de ovócitos, na incubadora, até ao momento da microinjeção uma vez que podem vir a amadurecer. Caso os ovócitos em metafase I não amadureçam são, então, descartados.

Os ovócitos que libertaram o primeiro GP são classificados como maduros e, portanto, estão aptos a ser microinjetados (Figura 19).

Por outro lado, a avaliação da qualidade ovocitária é realizada de acordo com os consensos de Istambul (Balaban et al., 2011) que defende critérios e conceitos na avaliação da qualidade ovocitária. Assim, defendem que um ovócito ideal deve apresentar as seguintes características: estrutura esférica, delimitado por uma zona pelúcida uniforme, com um citoplasma uniforme, translúcido e livre de inclusões e com o primeiro GP de tamanho normal. Por outro lado, as anomalias ovocitárias são divididas em várias categorias de acordo com os consensos de Istambul.

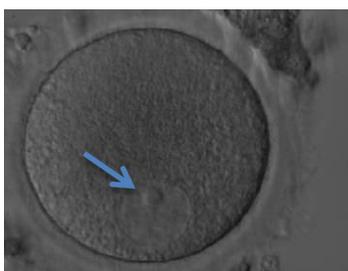


Figura 17 - Ovócito em vesícula germinativa (VG) (seta indica a VG). Imagem retirada de Rienzi et al. (2012).

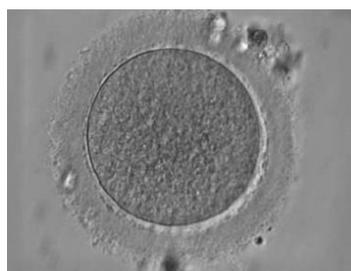


Figura 18 - Ovócito em Metafase I (MI), pela ausência de VG e do primeiro glóbulo polar (GP). Imagem retirada de Rienzi et al. (2012).

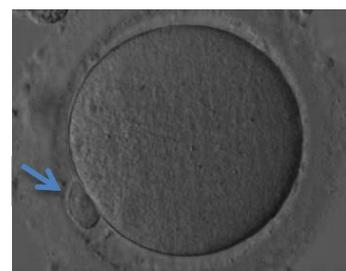


Figura 19 - Ovócito em Metafase II (MII), pela ausência de VG e pela presença do primeiro GP (seta indica o primeiro GP) no espaço perivitelino. Imagem retirada de Rienzi et al. (2012).

3.2.2.2. Preparação dos Micromanipuladores do Equipamento de Micromanipulação

Antes de se proceder à microinjeção é essencial verificar se o equipamento está pronto a ser utilizado (Figura 20). Desta forma, os seguintes passos são fulcrais para um correto procedimento:

- 1) Assegurar que a platina de aquecimento se encontra na temperatura adequada, que todos os controlos se encontram funcionais e que as escalas se encontrem no ponto zero (permite o máximo movimento nos vários planos);
- 2) Introduzir as pipetas Holding e ICSI nos respetivos suportes e apertar ligeiramente;
- 3) Alinhar as pipetas para que fiquem numa posição central e paralelas à platina;
- 4) Observar com a lente objetiva de menor ampliação e afinar o alinhamento para que as duas pipetas fiquem apontadas na direção uma da outra;
- 5) Colocar a ampliação com a qual é realizada a microinjeção;
- 6) Verificar se a pipeta Holding tem a ponta redonda e a dimensão adequada e se a pipeta ICSI tem a ponta afilada e se encontra com o bisel na posição adequada, isto é, com o lado aberto virado para baixo;
- 7) Focar as pontas de ambas as pipetas (caso a focagem não seja possível é sinal de que as pipetas não se encontram paralelas à platina e, portanto, é necessário ajustar o ângulo do suporte da pipeta desfocada até se conseguir a focagem adequada);
- 8) Subir as pipetas ligeiramente de forma a não tocarem no fundo da placa de ICSI, no momento que estiver na posição para microinjetar;
- 9) Inclinar a cabeça do manipulador para trás para permitir um acesso facilitado à placa de ICSI.

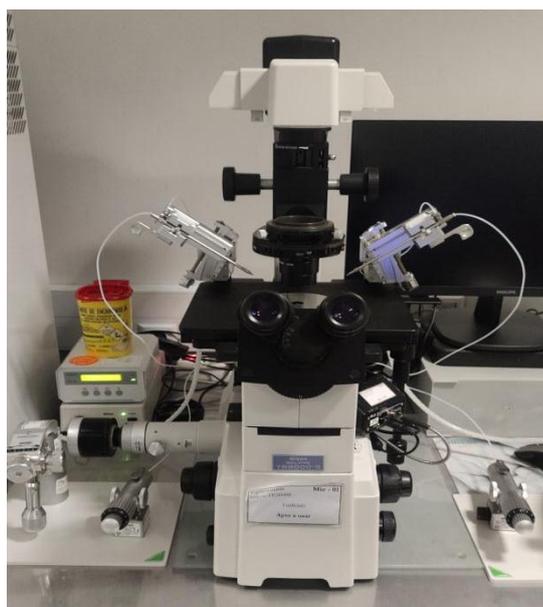


Figura 20 - Microscópio invertido para micromanipulação de gâmetas e embriões. Este equipamento é propriedade da Ferticentro e foi reproduzido com permissão.

3.2.2.3. Injeção Intracitoplasmática – Preparação da Placa de ICSI

O procedimento da técnica de ICSI é realizado numa placa de ICSI/microinjeção, através de um microscópio invertido equipado com micromanipuladores e microinjetores. Como tal, antes de se proceder à microinjeção do espermatozoide no citoplasma do ovócito, a placa de ICSI tem que ser preparada previamente.

Consoante o número de ovócitos a microinjetar, a placa de ICSI é preparada com gotas de meio de cultura de ovócitos (1 ovócito por gota) onde estes são, posteriormente, depositados (Figur 21). Desta forma, é colocada 1 gota de 10 microlitros de meio de cultura de fertilização por ovócito, evitando colocar mais de 6 a 8 gotas por placa, e 1 gota de 10 microlitros extra para lavar as duas pipetas. Adicionar 2 gotas de 10 microlitros de meio de cultura específico para espermatozoides (PVP, polivinilpirrolidona) no centro da placa, e com a ajuda da ponta da micropipeta distender cada uma das gotas em banda. A segunda linha com o meio PVP serve para lubrificar a microinjetora, antes de se proceder à aspiração dos espermatozoides, bem como serve para seleccionar os espermatozoides através da imobilização da cauda dos mesmos com a ponta da pipeta ICSI.

Seguidamente, a placa de ICSI é coberta com óleo mineral e armazenada na estufa por cerca de 10 minutos.

Seguidamente, retira-se a placa da estufa e é adicionada uma gota (1 a 5 microlitros), dependendo da concentração espermática, da amostra tratada no início de uma das linhas. Colocar novamente a placa na estufa a 37°C, para estabilização e migração dos espermatozoides.

O PVP é um polímero de alto peso molecular, altamente viscoso que atrasa a migração dos espermatozoides. Desta forma, este meio permite seleccionar e imobilizar os espermatozoides com excelente mobilidade e morfologia, através da manipulação com a microinjetora. Por outro lado, este meio previne também a adesão dos espermatozoides à parede interna da micropipeta de injeção e um melhor controlo no momento da libertação do espermatozoide no citoplasma do ovócito.

Em seguida, retira-se os ovócitos maduros da incubadora horizontal e reavalia-se os ovócitos imediatamente antes de os transferir para a placa de ICSI (utilizar unicamente os ovócitos maduros e morfologicamente normais), e procede-se à lavagem dos ovócitos em meio de cultura para fertilização estabilizado (colocar um ovócito por gota).



Figura 21 - Placa de ICSI.

3.2.2.4. Seleção e Imobilização dos Espermatozoides

Consoante o número de ovócitos a serem microinjetados, procede-se à seleção dos espermatozoides necessários. Os espermatozoides selecionados têm que ser aparentemente viáveis, e de preferência que tenham mobilidade progressiva rápida e devem apresentar morfologia normal. A facilidade deste procedimento está dependente da qualidade da preparação da amostra seminal. Deste modo, os passos seguintes são essenciais para uma correta imobilização dos espermatozoides:

- 1) Aspirar o espermatozoide selecionado com a pipeta ICSI e transportá-lo para a banda sem espermatozoides;
- 2) Imobilizar o espermatozoide com a ponta da pipeta ICSI, baixando e deslizando contra a placa, a pipeta sobre a cauda, perto da zona intermédia (se a cauda for imobilizada com demasiada força, o espermatozoide pode ficar preso ao fundo da placa dificultando, assim, a sua aspiração. Assim, estes espermatozoides não devem ser utilizados pois têm tendência a ficar presos dentro da pipeta. Este passo é importante não só para imobilizar o espermatozoide como também é importante para a descondensação da cabeça do mesmo, uma vez que destabiliza a membrana celular (por esta razão, independentemente do grau de motilidade do espermatozoide o procedimento é sempre o mesmo para todos os espermatozoides).
- 3) Aspirar o espermatozoide imobilizado pela cauda até uma distância da ponta da pipeta correspondente a aproximadamente duas vezes o seu comprimento;
- 4) Levantar ligeiramente a pipeta e deslocá-la para a gota que contém o primeiro ovócito.

3.2.2.5. Microinjeção do Espermatozoide

A microinjeção do espermatozoide no citoplasma do ovócito considera as seguintes etapas, que passo a descrever:

- 1) Rodar o ovócito com a pipeta Holding até que se consiga visualizar com clareza o posicionamento do primeiro glóbulo polar e, desta forma, posicionar corretamente o ovócito para que o glóbulo polar fique posicionado às 6 ou 00 horas relativamente à pipeta, de maneira a não interferir com o fuso meiótico. Nesta etapa é importante que o ovócito fique suficientemente preso para que não se solte no momento de microinjeção, mas ter a prudência de não danificar o citoplasma do ovócito.
- 2) Mover a pipeta ICSI para a posição 3 horas em relação ao glóbulo polar e confirmar a posição do espermatozoide.
- 3) Aproximar a pipeta ICSI do ovócito, assegurando que tanto a pipeta como o oolema estão bem focados e que o espermatozoide se encontra na ponta da pipeta.
- 4) Introduzir a pipeta ICSI através da zona pelúcida, no interior do ooplasma, em direção às 9 horas.
- 5) Aspirar ligeiramente o ooplasma a fim de assegurar que a membrana foi penetrada. Quando o rompimento ocorre, verifica-se uma súbita aceleração da entrada de ooplasma na pipeta e, portanto, é importante contrariar essa aspiração aplicando pressão positiva para que o ooplasma não entre excessivamente na pipeta e danifique o ovócito.
- 6) Injetar lentamente o espermatozoide com a menor quantidade de meio possível (verificar que a cabeça do espermatozoide atravessa a ponta da pipeta).
- 7) Retirar lentamente a pipeta confirmando que o espermatozoide fica dentro do ovócito e aspirar meio de cultura em excesso (caso o espermatozoide não fique dentro do ovócito a microinjeção deve ser repetida).

Visualiza-se, após a microinjeção, uma invaginação da membrana do ovócito, que rapidamente volta ao seu estado normal.

No final da microinjeção, retirar a placa de ICSI do micromanipulador e levar para uma superfície quente para se proceder às próximas etapas. Assim, antes de se transferir os ovócitos para placa de cultura estes são lavados e, posteriormente, a placa de cultura é armazenada no embryoscoope.

3.2.3. Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides Fisiologicamente Seleccionados (PICSI)

O método de microinjeção é igual ao da ICSI embora o que difere é que esta técnica permite seleccionar espermatozoides maduros e com menor índice de fragmentação para o procedimento de ICSI. Os espermatozoides são colocados na placa de PICSI (placa laboratorial) que possui micro pontos de Ácido Hialurónico em sua base, e apenas os espermatozoides maduros possuem recetores que se ligam ao Ácido Hialurónico (Figura 22). A hialurona está presente na camada externa dos ovócitos e é essencial para atrair os espermatozoides de melhor qualidade (a hialurona determina a capacidade de fecundação dos espermatozoides).

Os espermatozoides que se ligam à hialurona, ficam presos pela cabeça, e não têm à partida fragmentação de ADN. De seguida, esses espermatozoides agregados são retirados, e são esses que vão ser microinjetados.

É uma técnica laboratorial de primeira linha em situações de abortos espontâneos recorrentes, falhas de fecundação em FIV e má qualidade embrionária, que podem ser indicadores de fragmentação de ADN espermático.

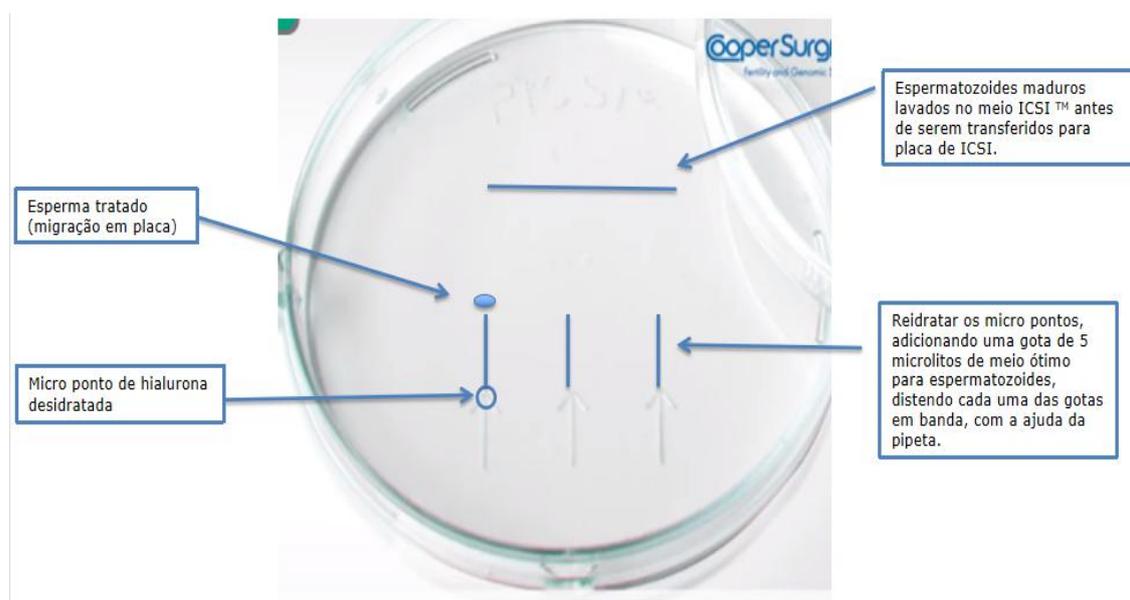


Figura 22 - Placa de PICSI que possui 3 micro pontos de Ácido Hialurónico em sua base (ORIGIO).

3.3. Avaliação da Fertilização e do Desenvolvimento Embrionário

A avaliação da fecundação é feita entre as 16h e as 18h de cultura, sendo o ideal avaliar às 17±1 horas após a inseminação (Balaban et al., 2011). Nesta fase, avaliamos se houve a extrusão do segundo GP e a presença de dois PN que confirmam o sucesso da fecundação (Figura 23). Estes eventos significam que ocorreu o reinício da meiose. Após confirmação da fecundação, os pré-zigotos são avaliados de acordo com os critérios de classificação de morfologia de ovócitos (Balaban et al., 2011).

Na clínica é usado o embryoscope, um sistema de monitoramento time-lapse que registra imagens dos embriões em cultivo, em intervalos de tempo específicos e que no final gera um vídeo onde é possível avaliar o desenvolvimento do embrião. Desta forma, este sistema de imagem time-lapse permite que o embriologista acompanhe em tempo real o desenvolvimento do embrião em cultivo, sem ser necessário retirar o embrião da incubadora para avaliar a sua morfologia, e permite também rentabilizar o tempo do embriologista na medida que não precisa de estar a uma determinada hora específica a avaliar o desenvolvimento.

Após a fecundação, os embriões permanecem em laboratório por um período de 3 a 5 dias antes de serem transferidos. Durante o período de cultura embrionário os embriões são observados diariamente e minuciosamente através do vídeo gerado pelo sistema de monitoramento time-lapse. Quando se verifica um bom desenvolvimento embrionário procede-se à transferência do embrião na cavidade uterina, preferencialmente um só embrião para evitar gravidez gemelar. A escolha do embrião de melhor qualidade depende de uma avaliação cuidada e minuciosa feita pelo embriologista, seguindo os critérios de avaliação morfológica de desenvolvimento embrionário (Balaban et al., 2011).



Figura 23 - Pré-zigoto com 2 PN (circundado a vermelho) e 2 GP (setas a vermelho). A fotografia é propriedade da ferticentro e foi reproduzida com permissão.

3.4. Transferência Embrionária

Antes da transferência embrionária é feita uma simulação da transferência, o cateterismo, com o objetivo de identificar o cateter mais apropriado para fazer a transferência do embrião.

O Conselho Nacional de Procriação Medicamente Assistida (CNPMA) recomenda que se transfira apenas um ou dois embriões, dependendo do quadro clínico de cada paciente. O número de embriões a transferir depende de vários fatores, tais como a idade da paciente, o número de embriões de boa qualidade obtidos, a receptividade do endométrio e depende também do historial dos ciclos anteriores da paciente. Por norma, transfere-se apenas um único embrião para evitar gestações múltiplas, ou em situações de patologias uterinas ou outras que tornem impossível uma gravidez gemelar.

Antes da transferência embrionária, é necessário preparar o útero da paciente para receber o embrião. Deste modo, na noite após a punção folicular é iniciada a administração de progesterona, hormona extremamente essencial para que ocorra a implantação e suporte da gravidez.

A maioria das transferências são realizadas com embriões em estado de blastocisto (dia quinto ou sexto de cultura embrionária), apesar que pode ser realizada a partir do terceiro dia de cultura embrionário. Importante reconhecer que a escolha do dia de transferência está também relacionada com o número e qualidade dos embriões. Antes de se proceder à transferência do embrião, é verificado primeiramente a espessura do endométrio (espessura mínima de 8 mm). Após este procedimento, a vagina da paciente é limpa com meio próprio, meio utilizado na punção de ovócitos.

Antes de se proceder à aspiração do embrião da placa de cultura, o cateter é lavado com meio de cultura embrionário.

Seguidamente, a médica posiciona a guia e espera que a embriologista carregue o cateter com o embrião, para posicionar o cateter na guia e proceder à entrega do embrião no útero da paciente.

Após a transferência, o cateter é entregue à embriologista que vai verificar se o embrião foi entregue com sucesso na cavidade uterina. Ao fim de 2 semanas confirma-se a ocorrência de implantação através da realização de um teste de gravidez, no qual é quantificada a hormona hCG.



Figura 24 - Transferência de embriões. A - aspiração do embrião da placa de transferência para o cateter; B - cateter inserido no útero; C - visualização ecográfica do cateter (circundado a azul); D - deposição do embrião no útero, durante a qual é visível uma pequena gota brilhante na ponta do cateter, através do controlo ecográfico. Retirado de: <http://myselfishgenes.blogspot.pt/2013/02/embryo-transfer.html>, acedido a 17/08/2021.



Figura 25 - Entrega do embrião na cavidade uterina (seta a vermelho). A fotografia é propriedade da Ferticentro e foi reproduzida com sucesso.

Parte 4 – Criopreservação e Desvitrificação de Gâmetas e de Embriões

4.1. Criopreservação de Gâmetas Masculinos

A criopreservação de espermatozoides é uma técnica bastante utilizada, já há várias décadas, que permite a conservação de esperma de dadores férteis em bancos para utilização nas seguintes situações de infertilidade masculina: preservação das células da linha gamética provenientes da biópsia testicular de indivíduos com oligozoospermia severa funcional; punção dos espermatozoides diretamente do epidídimo (aspiração do epidídimo) de indivíduos com oligozoospermia obstrutiva e em situações que o indivíduo seja doente oncológico e tenha que ser submetido a sessões de quimioterapia/radioterapia, dado que estes procedimentos podem lesar a fertilidade originando danos irreparáveis no tecido germinativo masculino.

Esta técnica também é aplicada em amostras com um volume reduzido e pouca concentração de espermatozoides. Neste caso, realizam-se colheitas múltiplas de forma a assegurar a disponibilidade de um número suficiente de espermatozoides no dia da punção folicular. Situações de ausência temporária do indivíduo no dia do tratamento, da punção folicular, recorre-se também à criopreservação dos espermatozoides.

Por outro lado, a criopreservação de espermatozoides disponibiliza a criação de bancos de esperma de dadores necessários para mulheres sem parceiro masculino, casais de mulheres que necessitem de recorrer a esperma dador e para os casais em que o elemento masculino é azoospérmico.

4.1.1. Metodologia para a Realização da Congelação de Esperma

Antes de se proceder à congelação da amostra é necessário, primeiramente, colocar meio de congelação de esperma à temperatura ambiente (volume de crioprotetor a adicionar é igual ao volume da amostra), no mínimo 2 horas antes do procedimento de congelação da amostra.

Após a liquefação da amostra, procede-se à avaliação dos parâmetros seminais da amostra de acordo com o manual de laboratório da OMS para o processamento de sémen humano.

Seguidamente, e após assegurar que o meio de congelação de esperma e a amostra estão à temperatura ambiente, adicionar gota a gota o meio de congelação à amostra, e homogeneizar cuidadosamente após cada adição. Após esta etapa estar concluída, a amostra permanece no mínimo 10 minutos à temperatura ambiente. Durante estes 10 minutos, é confirmado novamente a identidade do paciente e procede-se, então, à preparação das etiquetas de identificação do paciente para colar nas respetivas palhetas de armazenamento de esperma congelado.

Antes de adicionar a amostra nas respetivas palhetas, efetuar os devidos registos após a adição do crioprotetor, isto é, avaliar concentração e mobilidade da amostra.

Imediatamente, colocar numa seringa de 1 ml um adaptador apropriado que permita anexar a seringa à palheta. Aspirar a amostra pela extremidade afilada da palheta tendo o cuidado de não encher a palheta completamente, isto para que permita que haja expansão da amostra durante a congelação. Assim que se encher todas as palhetas com a amostra, a extremidade afilada é retirada e as palhetas são seladas em ambas as extremidades na seladora térmica.

Após todas as palhetas estarem devidamente seladas, suspender as palhetas horizontalmente logo acima da superfície de azoto líquido durante 30 minutos. Assim que os 30 minutos passarem, mergulhar as palhetas em azoto líquido e armazenar nos contentores de criopreservação de esperma, anotando o contentor, canister, margarida e visotubo respetivo. Este registo é armazenado no sistema informático da clínica e é de extrema importância para sabermos a posição da amostra de cada indivíduo para quando for preciso utilizar a amostra.

4.1.2. Metodologia para a Realização da Descongelação de Esperma

Após verificar o posicionamento da palheta (no sistema informático), armazenada nos contentores de criopreservação de esperma, retirar a respetiva palheta (efetuar registo de saída da amostra do respetivo contentor de azoto líquido) e deixar à temperatura ambiente, mínimo 5 minutos, antes de se proceder à sua utilização. Seguidamente, cortar a extremidade colorida e acoplar à seringa de 1 ml com o adaptador, e cortar com um bisturi estéril a outra extremidade e expelir o conteúdo para um tubo estéril. Após esta etapa, procede-se à avaliação da amostra. Na avaliação da amostra, colocar uma alíquota da amostra na câmara de Makler e avaliar ao microscópio ótico (efetuar os respetivos registos), de acordo com o manual de laboratório da OMS para o processamento de sémen humano.

4.2. Criopreservação e Desvitrificação de Ovócitos (MII) e Embriões

A vitrificação é uma técnica simples e recorrente em laboratórios de PMA, sendo a vitrificação de embriões a mais rotineira para preservar os embriões excedentários produzidos em cada ciclo de PMA. Existem diferentes protocolos de congelação de ovócitos (MII) e embriões. Na clínica é aplicada a técnica mais recente de vitrificação que consiste num processo de conservação de ovócitos (MII) e embriões pelo arrefecimento extremamente rápido dos mesmos cujo citoplasma adquire uma consistência vítrea, sem haver congelamento, impedindo, desta forma, a formação de cristais de gelo no citoplasma. Seguidamente, as palhetas contendo os ovócitos (MII) e os embriões são armazenados em contentores de azoto líquido.

A vitrificação de ovócitos e embriões engloba duas etapas cruciais para o sucesso desta metodologia: equilíbrio de ovócitos e embriões e vitrificação, sendo este último passo comum a ovócitos e embriões. A equilíbrio de ovócitos é um processo mais minucioso e mais demoroso na medida que a adição da solução equilibrante (ES) é feita gradualmente, dado que os ovócitos são mais sensíveis.

O congelamento de embriões pode ser feito nas seguintes situações: embriões excedentes de ciclos de PMA anteriores, recetividade do endométrio ao embrião inadequada e em casos de hiperestimulação ovárica. Por outro lado, o congelamento de ovócitos (MII) é realizado nas seguintes situações: doação de ovócitos para o banco de ovócitos, tratamentos oncológicos que possam lesar a fertilidade feminina e em casos de reserva ovárica reduzida.

A desvitrificação de ovócitos (MII) e embriões consiste em submergir rapidamente a palheta na solução de descongelação (TS) e passar as células pelos poços da microplaca que contém solução diluente (DS). Seguidamente, antes de passar as células para a placa de cultivo, temos que realizar a última etapa deste processo de desvitrificação, a lavagem das células para ter a certeza de que não há meio de desvitrificação. Após este processo, os ovócitos (MII) e os embriões estão prontos para serem utilizados nos ciclos de PMA.

Parte 5 – Efeitos da Poluição Ambiental na Função Espermática

5.1. Impacto da Poluição Ambiental na Fertilidade Masculina

O aumento da poluição ambiental devido à rápida industrialização e urbanização ao longo das últimas décadas, faz com que a poluição do ar seja a quarta maior ameaça à saúde humana a nível global, após a hipertensão, hábitos alimentares e tabagismo (Song & Song, 2019).

Atualmente, cerca de 91% da população mundial vive em lugares onde a qualidade do ar excede os limites das diretrizes da OMS (WHO, 2021). A poluição do ar é responsável pela morte prematura de 4,2 milhões de pessoas anualmente em todo o mundo, em grande parte como resultado do aumento da mortalidade associado a doenças cardíacas, acidentes vasculares cerebrais, doença pulmonar obstrutiva crónica, cancro do pulmão e infeções respiratórias agudas (WHO, 2021). Dados da OMS mostram que 9 em cada 10 pessoas respiram ar que excede os limites das diretrizes da OMS, contendo uma percentagem muito elevada de poluentes altamente tóxicos à saúde humana (WHO, 2021).

Por consequência, e sendo a poluição do ar uma das principais preocupações ambientais a nível mundial, esta tem vindo a ser associada ao longo das últimas décadas ao aumento da incidência de diversas patologias, nomeadamente a saúde reprodutiva (Carré et al., 2017)(Jurewicz et al., 2018)(Hansen et al., 2010)(Chiang et al., 2017).

Efetivamente, há décadas que se tem sugerido que a poluição do ar ambiente pode ter um impacto nefasto na saúde reprodutiva masculina, estando associada à diminuição da qualidade espermática, condição esta que causa infertilidade masculina (Jurewicz et al., 2018) (Hansen et al., 2010) (Chiang et al., 2017) (Rahban & Nef, 2020) (Nobles et al., 2018).

A etiologia da infertilidade masculina é diversificada, podendo dever-se a fatores tão variados como anomalias genéticas, distúrbios endócrinos, patologias testiculares, infeções urogenitais, fatores imunológicos, fatores de estilo de vida, exposição a agentes tóxicos (destacam-se a exposição a radiação e quimioterapia, calor intenso e a utilização de substâncias químicas como determinadas drogas, medicamentos, solventes, pesticidas e metais pesados), declínio da qualidade espermática com a idade e a infertilidade idiopática (Babakhanzadeh et al., 2020) (Barratt et al., 2017). Desta forma, a combinação de algum(ns) deste(s) fator(es) juntamente com a exposição a diversos contaminantes ambientais pode acelerar a destruição do epitélio germinativo.

Segundo a OMS a infertilidade é definida como "uma doença do sistema reprodutor que impede o casal de obter uma gravidez clínica após um ano ou mais de tentativas de relação sexual regular desprotegida". Atinge atualmente cerca de 15% dos casais em idade reprodutiva, existindo um componente masculino na infertilidade em cerca de 50% dos casos identificados (Bunting & Boivin, 2008) (Zegers-Hochschild et al., 2017).

Segundo o relatório anual da qualidade do ar na Europa, os poluentes mais tóxicos que a Europa enfrenta relativamente ao perigo que têm na saúde humana e, claro, na função reprodutiva, são o material particulado (MP2,5e MP10) e o ozono troposférico (O₃), seguido dos poluentes

benzo(a)pireno (BaP) (hidrocarboneto policíclico aromático, PAH), dióxido de nitrogénio (NO₂) e o dióxido de enxofre (SO₂) (EEA, 2020).

A alarmante emissão de numerosos poluentes atmosféricos resultantes da atividade humana são predominantemente resultado do aumento da circulação de veículos, principalmente nas grandes cidades, do setor da indústria (que dependendo do processo industrial envolvido pode contribuir para uma maior ou menor emissão de gases poluentes) e do setor da energia (a emissão de gases poluentes varia consoante a fonte energia primária utilizada, o que pode contribuir para uma maior ou menor emissão de gases atmosféricos).

Os compostos tóxicos libertados pelas diversas atividades humanas, nomeadamente do excessivo tráfego rodoviário característico das grandes cidades, incluem a libertação de MP (constituído por uma grande variedade de compostos químicos, notavelmente metais pesados e PAHs) e de NO₂, têm um impacto negativo na saúde reprodutiva, levando à diminuição da fertilidade.

Desta forma, têm sido propostos ao longo das últimas décadas os mecanismos de ação pelos quais os contaminantes ambientais prejudicam a função reprodutora masculina, apesar de ainda não serem bem detalhados e elucidados.

Deste modo, as descobertas dos vários estudos permanecem controversos e inconsistentes na medida que a maioria dos estudos são estudos retrospectivos, observacionais e/ou epidemiológicos, apesar da certeza do impacto nefasto dos contaminantes ambientais na fertilidade masculina.

Apesar de se acreditar que existam vários mecanismos de ação pelos quais os poluentes ambientais levam à infertilidade masculina, até ao momento apenas são conhecidos e relatados na literatura quatro possíveis mecanismos de ação.

Efetivamente, inúmeros estudos têm vindo a relatar que os contaminantes ambientais alteram, de facto, a funcionalidade dos espermatozoides por meio da: indução de danos no ADN nuclear e/ou modificações epigenéticas, aumento da produção ERO, SO e por meio da ação dos disruptores endócrinos (Carré et al., 2017).

Ao longo dos últimos anos, tem aumentando o interesse científico no estudo de substâncias exógenas conhecidas como disruptores endócrinos. Este interesse é incentivado pelos mais recentes resultados de diversos estudos que apontam os disruptores endócrinos como sendo uma das causas responsáveis pela incidência de diversos problemas de saúde, nomeadamente a infertilidade (Kizu et al., 2003).

Segundo a definição da OMS, “um disruptor endócrino é uma substância ou uma mistura de substâncias exógenas, que altera a função do sistema endócrino e, conseqüentemente, provoca efeitos adversos num organismo intacto, na sua descendência ou (sub)populações”.

De facto, inúmeros estudos têm vindo a associar os disruptores endócrinos ao surgimento de várias patologias, como é o caso da subfertilidade e a infertilidade masculina. Assim, as alterações hormonais induzidas pela ação dos disruptores endócrinos afetam negativamente a endocrinologia normal.

Variados estudos mostram que o MP libertado de veículos automotores, principalmente da combustão de motores a diesel, têm na sua constituição metais pesados (como Cu, Pb, Zn, etc.) e PAHs, que interferem com a endocrinologia normal (Carré et al., 2017) (Kizu et al., 2003).

As partículas libertadas da combustão de motores a diesel, notavelmente PAHs, contêm substâncias com atividades estrogénicas, anti-estrogénicas ou anti-androgénicas, podem afetar a esteroidogénese gonadal (evidenciam alterações significativas nos níveis circulantes de hormonas do eixo gonadal) e a gametogénese (Carré et al., 2017) (De Coster & Van Larebeke, 2012) (Han et al., 2010) (Yoshida et al., 2007).

Estudos *in vivo* relatam alterações significativas nos níveis circulantes de hormonas sexuais e gonadotrofinas em ratos expostos a poluentes resultantes da combustão de motores a diesel, associados à diminuição da produção diária de espermatozoides bem como alterações morfológicas nas células germinativas nos túbulos seminíferos (Jeng & Yu, 2008) (Watanabe & Oonuki, 1999) (Inyang et al., 2003).

Desta forma, os diversos estudos *in vivo* bem como estudos epidemiológicos em humanos corroboram as incertezas que até então pairavam na dubiedade, que os poluentes ambientais são efetivamente deletérios para a gametogénese, levando à diminuição da capacidade reprodutiva das populações expostas.

Do mesmo modo, estudos evidenciam que o aumento dos níveis de ERO no ejaculado, está diretamente associado à exposição de poluentes como o NO₂ e o MP (notavelmente metais pesados e PAHs), que levam à geração de stress oxidativo (SO) (Carré et al., 2017) (Arbak et al., 2004) (Sklorz et al., 2007).

Apesar das ERO desempenharem um papel crucial na espermatogénese e na fertilização, quando estas são produzidas em grandes quantidades, comprometem a integridade do ADN genómico paterno.

Diversos estudos relatam que a exposição ocupacional e ambiental a partículas geradas da combustão de veículos automotores, principalmente da combustão de motores a diesel, leva à produção de ERO (Arbak et al., 2004), e, por conseguinte, ao aumento do SO, que está associado a danos no ADN genómico paterno (Agarwal et al., 2020), peroxidação lipídica da membrana plasmática de espermatozoides, mobilidade reduzida e aumento da atividade apoptótica (Carré et al., 2017) (Wagner et al., 2018) (Agarwal et al., 2008).

Por outro lado, estudos têm relatado que a sobreprodução de ERO é responsável pela diminuição da produção de testosterona, e que baixos níveis de testosterona têm um efeito nefasto na espermatogénese e na fertilidade masculina (Darbandi et al., 2018) (Chen et al., 2020).

O terceiro mecanismo celular pelo qual os poluentes atmosféricos exercem os seus efeitos deletérios é através da produção de danos no ADN, capazes de alterar a molécula de ADN, que leva à modificação da expressão génica (Carré et al., 2017). As alterações na molécula de ADN podem ser induzidas pelo SO, como mencionado anteriormente. Na mesma medida, processos inflamatórios induzidos pela produção exacerbada de ERO, quer por células espermáticas

imaturas (anormais), quer por leucócitos polimorfonucleares pode levar à formação de danos no ADN dos espermatozoides (Agarwal et al., 2020) (Barth et al., 2017) (Aitken & Curry, 2011).

Por fim, o último mecanismo celular que explica os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na alteração da fertilidade masculina induzidos pela poluição do ar são as modificações epigenéticas, como a metilação do ADN e modificações nas histonas, que podem ser transmitidas às gerações futuras (Babakhanzadeh et al., 2020) (Gaspari et al., 2003) (GAO et al., 2007).

A metilação do ADN e a acetilação das histonas são modificações epigenéticas que alteram a expressão de diferentes genes, podendo levar à expressão génica anormal. Desta forma, as alterações epigenéticas desempenham um papel crítico na infertilidade masculina.

As modificações epigenéticas acontecem ao longo da espermatogénese podendo ocorrer, por exemplo, durante a protaminação espermática. A protaminação espermática é a substituição das proteínas nucleares presentes nas células somáticas (histonas) por protaminas, específicas dos espermatozoides, que acontece na espermiogénese. Desta forma, a protaminação defeituosa está associada à hipermetilação de certos genes. Vários genes nos testículos são regulados por mecanismos epigenéticos, o que mostra o impacto dos mecanismos epigenéticos na espermatogénese (Rajender et al., 2011).

Por outro lado, estudos *in vivo* em ratos expostos a MP_{2,5}, MP₁₀ e NO₂ relatam a hipermetilação e a hipometilação de certos genes (Ding et al., 2016).

A exposição a poluentes ambientais induz alterações epigenéticas, que podem comprometer a fertilidade masculina. Desta forma, são vários os estudos que relatam a reprogramação dos estados epigenéticos, em particular durante períodos de desenvolvimento essenciais no processo da espermatogénese, induzidos pela exposição a poluentes ambientais, induzem modificações epigenéticas anormais, e interferem negativamente com a qualidade espermática (Rajender et al., 2011).

De igual modo, a fragmentação do ADN dos espermatozoides, causado pelo SO pode facilitar a metilação aberrante do ADN (Tunc & Tremellen, 2009).

Vários estudos têm vindo a relatar uma alteração na função epigenética em espermatozoides de indivíduos com oligozoospermia e oligoastenoteratozoospermia (Babakhanzadeh et al., 2020).

Para além disso, associam a hipermetilação em vários genes à diminuição da qualidade espermática ou à infertilidade masculina (Babakhanzadeh et al., 2020).

5.2. Metodologia

Apesar de haver, ao longo das últimas décadas, uma maior consciencialização e, por consequente, um maior controlo pelas autoridades responsáveis relativamente às emissões dos poluentes atmosféricos, principalmente em zonas urbanas de maior densidade populacional que apresentam os maiores focos de poluição, continua a existir em Portugal e em outros países europeus, determinadas zonas com níveis de poluição superiores ao permitido pela Diretiva Qualidade do Ar Ambiente da UE (Diretiva QAA da UE 2008).

Segundo a Agência Europeia do Ambiente, cerca de 90% dos cidadãos europeus estão expostos a poluentes em concentrações superiores ao limite definido pela legislação da UE.

Vários estudos têm vindo a estabelecer, ao longo dos últimos anos, uma relação direta entre a poluição ambiental e a infertilidade masculina. Na realidade, a exposição a poluentes presentes no ambiente é reconhecida como sendo uma importante causa da redução da fertilidade masculina e, desta forma, decidiu-se estudar neste trabalho o efeito de 3 poluentes relevantes que estão associados à diminuição da qualidade espermática e que, desta forma, têm um impacto direto na reprodução masculina.

Os principais poluentes presentes nas grandes cidades, caracterizadas pelo intenso tráfego rodoviário, são: MP (MP_{2,5} e MP₁₀) e o NO₂. Desta forma, estes três poluentes vão ser alvo de estudo.

Efetivamente, as maiores e mais habitadas cidades de Portugal são as que apresentam maiores focos de poluição, caracterizadas pelo excessivo tráfego automóvel de veículos rodoviários, e que excedem regularmente os valores-limite da Diretiva da Qualidade do Ar Ambiente da UE (Diretiva QAA da EU 2008).

Com o objetivo de quantificar o impacto do excessivo tráfego automóvel na saúde reprodutiva masculina, através do acesso à plataforma da Agência Portuguesa do Ambiente (APA) que é provida de um sistema de informação online, a QualAr, que disponibiliza na sua base de dados toda a informação relativa à monitorização dos poluentes ambientais de uma determinada região. Deste modo, vou avaliar os níveis diários dos 3 poluentes relevantes durante o ano de 2019. Sendo que a espermatogénese tem a duração de 90 dias, tendo em consideração fases críticas da espermatogénese, como o processo de armazenamento epididimal e de desenvolvimento de aquisição de mobilidade dos espermatozoides, este estudo tem em consideração os efeitos dos contaminantes ambientais 90 dias antes da ejaculação. Após a recolha dos dados, o passo seguinte é calcular as concentrações mensais dos respetivos poluentes, tendo em consideração os valores-limite da Diretiva Qualidade do Ar Ambiente (Diretiva QAA da EU, 2008). A Diretiva QAA da EU define normas de qualidade do ar relativas às concentrações de poluentes presentes na atmosfera, tendo por base as orientações da OMS, que define valores-limite para os poluentes atmosféricos. Deste modo, após obter as concentrações mensais dos respetivos poluentes, e através da sustentação de bibliografia disponível irei prever o impacto que estes poluentes podem ter na saúde reprodutiva destes indivíduos.

5.3. Resultados

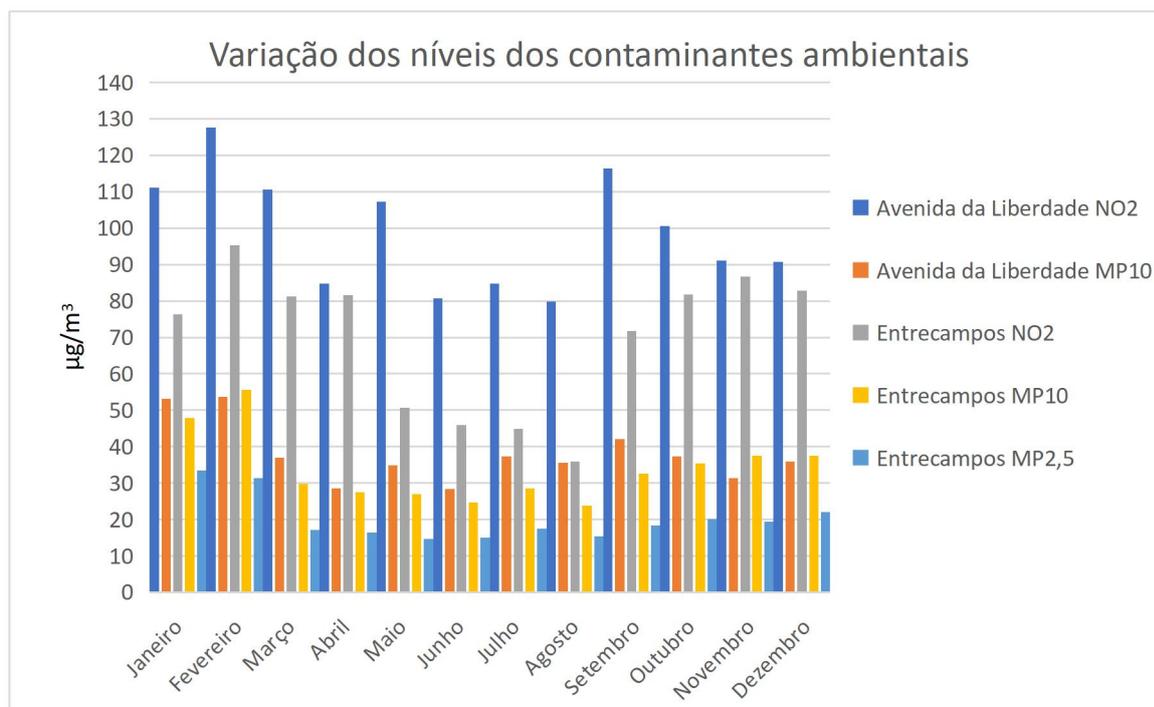


Figura 26 - Variação dos níveis dos contaminantes ambientais correspondentes ao ano de 2019.

Os meses que se destacam e que, portanto, é provável que haja variação da qualidade espermática correspondem aos meses de Fevereiro, Maio e Setembro.

Desta forma, é expectável que no mês de Maio (valores relativos a Fevereiro), Agosto (valores relativos a Maio) e Dezembro (valores relativos a Setembro) os parâmetros seminais sofram alterações e, deste modo, é expectável que a qualidade seminal destes indivíduos seja inferior. Tendo em conta a bibliografia disponível é possível prever que a exposição aos poluentes presentes no ar ambiente pode levar a alterações na qualidade dos parâmetros seminais, nomeadamente a mobilidade, fragmentação do ADN espermático e morfologia.

Na mesma medida, Deng *et al* (2016) no estudo de meta-análise relata fortes evidências que a exposição à poluição do ar ambiente pode alterar a qualidade seminal, resultando na infertilidade. Adicionalmente, vários estudos toxicológicos em animais de laboratório relatam fortes evidências que a exposição aos poluentes ambientais, pode lesar o epitélio germinativo e por sua vez lesar a fertilidade.

Fazia parte do objetivo deste estudo confrontar os valores obtidos com valores reais, mas devido à condição pandémica e às exigências do Regulamento Geral da Proteção de dados (RGPD) não foi

possível adquirir atempadamente esses mesmos dados, que seriam fundamentais para suportar e fundamentar os resultados obtidos.

5.4. Discussão

A maioria dos estudos que visam estudar o impacto dos poluentes ambientais na função reprodutora masculina são estudos retrospectivos, observacionais e/ou epidemiológicos. Desta forma, os resultados dos vários estudos quanto ao impacto deletério dos contaminantes ambientais na função reprodutora masculina são limitados, controversos e inconsistentes. Para além disso, inúmeras razões podem contribuir para a limitação e divergência dos diferentes estudos, e que desta forma podem interferir na descoberta científica, nomeadamente:

- A maioria dos estudos se focarem nos efeitos a curto prazo e não a longo prazo, apesar das pessoas, geralmente, sofrerem da exposição prolongada
- Diferentes estudos focam-se unicamente nos efeitos nocivos nos 74 dias antes da ejaculação e não têm em consideração a influência dos poluentes nas fases principais/críticas da espermatogénese;
- Alguns estudos têm unicamente em consideração a exposição ambiental e não têm em consideração a exposição ocupacional (exposição profissional, sendo de destacar os solventes orgânicos, a exposição a alguns metais pesados e agentes químicos);
- A heterogeneidade da população selecionada para os estudos epidemiológicos, nomeadamente a avaliação da fertilidade masculina, a variação da região geográfica e a etnia;
- A maioria dos estudos não têm em consideração a importância das condições meteorológicas, sendo que estas influenciam na concentração ou dispersão dos poluentes;
- A influência da estação do ano (sendo que nos meses mais frios, Inverno, aumenta a emissão de poluentes que pode estar relacionado com o aumento da queima de biomassa para aquecimento das casas, assim como no Verão que pode estar relacionado com uma maior ressuspensão dos poluentes gasosos);
- A população de estudo ser habitualmente reduzida em alguns estudos (variação da população de estudo);
- Os métodos de avaliação da poluição do ar (até ao momento os estudos de investigação nesta vertente recorrem a base de dados de monitorização do ar, que podem induzir em erro e levar à ilação de resultados não fidedignos);
- Não existirem dados suficientes para o cálculo do índice de qualidade do ar o que leva a que não haja registo diário ou anual de determinado(s) poluente(s)
- Determinadas estações de monitorização não medem determinados poluentes, nomeadamente MP_{2,5}, que sabemos que nas grandes metrópoles caracterizadas pelo intenso tráfego rodoviário a concentração de partículas finas é bastante elevada.

Em suma, considero que todos os parâmetros acima mencionados são fundamentais e devem ser tidos em consideração. Importante referir que estudar os efeitos dos poluentes ambientais na saúde reprodutiva tem as suas limitações, uma vez que os indivíduos expostos estão geralmente expostos a vários poluentes em simultâneo. Desta forma, é importante reconhecer que os estudos em humanos só podem envolver as abordagens epidemiológicas, e ensaios *in vitro* em que os

espermatozoides são expostos a diferentes concentrações de poluentes diferentes (ou mistura de poluentes) em janelas temporais específicas da espermatogénese.

5.5. Conclusão

As técnicas de PMA permitem tratar a doença infertilidade que afeta cerca de 15% dos casais em idade reprodutiva. Na mesma medida permitem desde o ano 2017, dada mudança na legislação que contempla a utilização de técnicas de PMA para satisfazer os desejos reprodutivos de mulheres solteiras ou casais de mulheres.

Importante aludir para o facto de que as técnicas de PMA não deverão ser uma alternativa à procriação normal, nem podem reverter a diminuição da fecundidade que se verifica inevitavelmente com a idade da mulher. Ao longo dos últimos anos, as técnicas de PMA têm tido uma maior visibilidade pública e consequentemente uma maior procura, dada ao aumento da prevalência da infertilidade que se tem verificado ao longo das últimas décadas. Por outro lado, também se deve ao facto das técnicas de PMA serem, desde 2017, consideradas métodos complementares de procriação, e que contemplem mulheres solteiras ou casais de mulheres.

A poluição ambiental é o maior problema ambiental da atualidade. Dado que, a poluição ambiental é um problema emergente, este merece uma maior atenção por parte das autoridades responsáveis e da implementação de medidas mais rigorosas no controlo de emissão dos poluentes ambientais, principalmente nas áreas caracterizadas pelo excessivo tráfego automóvel. Ao longo das últimas décadas, diversos estudos têm vindo a evidenciar e a alertar para o impacto deletério da poluição do ar ambiente na saúde reprodutiva masculina,

Efetivamente, um número crescente de estudos tem documentado os efeitos nefastos dos poluentes ambientais na diminuição da qualidade espermática, podendo levar à infertilidade masculina.

Em suma, este estudo permite ter uma perspetiva a respeito dos resultados obtidos na predição da alteração na qualidade seminal, só passível ser confirmado após recolha de dados estatísticos da região estudada.

Efetivamente, não é passível efetivar estes dados uma vez que devido à condição pandémica e às exigências do Regulamento Geral de Proteção de Dados (RGPD) não foi possível atempadamente ter acesso a valores reais, que seria de todo uma mais valia para suportar os resultados obtidos.

Bibliografia

- Adamson, G. D., de Mouzon, J., Chambers, G. M., Zegers-Hochschild, F., Mansour, R., Ishihara, O., Banker, M., & Dyer, S. (2018). International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology: world report on assisted reproductive technology, 2011. *Fertility and Sterility*, *110*(6), 1067–1080.
- Agarwal, A., Majzoub, A., Baskaran, S., Selvam, M. K. P., Cho, C. L., Henkel, R., Finelli, R., Leisegang, K., Sengupta, P., Barbarosie, C., Parekh, N., Alves, M. G., Ko, E., Arafa, M., Tadros, N., Ramasamy, R., Kavoussi, P., Ambar, R., Kuchakulla, M., ... Shah, R. (2020). Sperm DNA fragmentation: A new guideline for clinicians. *World Journal of Men's Health*, *38*(4), 412–471.
- Agarwal, A., Makker, K., & Sharma, R. (2008). Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: An update. *American Journal of Reproductive Immunology*, *59*(1), 2–11.
- Aitken, R. J., & Curry, B. J. (2011). Redox regulation of human sperm function: From the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxidants and Redox Signaling*, *14*(3), 367–381.
- Allahbadia, G. N. (2017). Intrauterine Insemination: Fundamentals Revisited. *Journal of Obstetrics and Gynecology of India*, *67*(6), 385–392.
- Arbak, P., Yavuz, O., Bukan, N., Balbay, O., Ulger, F., & Annakkaya, A. N. (2004). Serum oxidant and antioxidant levels in diesel exposed toll collectors. *Journal of Occupational Health*, *46*(4), 281–288.
- Babakhanzadeh, E., Nazari, M., Ghasemifar, S., & Khodadadian, A. (2020). Some of the factors involved in male infertility: A prospective review. *International Journal of General Medicine*, *13*, 29–41.
- Balaban, B., Brison, D., Calderón, G., Catt, J., Conaghan, J., Cowan, L., Ebner, T., Gardner, D., Hardarson, T., Lundin, K., Cristina Magli, M., Mortimer, D., Mortimer, S., Munné, S., Royere, D., Scott, L., Smitz, J., Thornhill, A., Van Blerkom, J., & Van Den Abbeel, E. (2011). The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: Proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction*, *26*(6), 1270–1283.
- Balhorn, R. (1982). A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *Journal of Cell Biology*, *93*(2), 298–305.
- Barratt, C. L. R., Björndahl, L., De Jonge, C. J., Lamb, D. J., Martini, F. O., McLachlan, R., Oates, R. D., van der Poel, S., John, B. S., Sigman, M., Sokol, R., & Tournaye, H. (2017). The diagnosis of male infertility: An analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance-challenges and future research opportunities. *Human Reproduction Update*, *23*(6), 660–680.
- Barth, A., Brucker, N., Moro, A. M., Nascimento, S., Goethel, G., Souto, C., Fracasso, R., Sauer, E., Altknecht, L., da Costa, B., Duarte, M., Menezes, C. B., Tasca, T., Arbo, M. D., & Garcia, S. C. (2017). Association between inflammation processes, DNA damage, and exposure to environmental pollutants. *Environmental Science and Pollution Research*, *24*(1), 353–362.
- Benoff, S., Jacob, A., & Hurley, I. R. (2000). Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium. *Human Reproduction Update*, *6*(2), 107–121.
- Bunting, L., & Boivin, J. (2008). Knowledge about infertility risk factors, fertility myths and illusory benefits of healthy habits in young people. *Human Reproduction*, *23*(8), 1858–1864.
- Carré, J., Gatimel, N., Moreau, J., Parinaud, J., & Léandri, R. (2017). Does air pollution play a role in infertility?: A systematic review. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, *16*(1), 1–16.
- Chen, Y. A., Chang, Y. K., Su, Y. R., & Chang, H. C. (2020). Ambient sulfur dioxide could have an impact on testicular volume from a observational study on a population of infertile male. *BMC Urology*, *20*(1), 1–12.
- Chiang, C., Mahalingam, S., & Flaws, J. A. (2017). Environmental Contaminants Affecting Fertility and Somatic Health. *Seminars in Reproductive Medicine*, *35*(3), 241–249.
- Corradi, P. F., Corradi, R. B., & Greene, L. W. (2016). Physiology of the Hypothalamic Pituitary

- Gonadal Axis in the Male. *Urologic Clinics of North America*, 43(2), 151–162.
- Costanzo, P. R., Suárez, S. M., Scaglia, H. E., Zylbersztejn, C., Litwak, L. E., & Knoblovits, P. (2014). Evaluation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in eugonadal men with type 2 diabetes mellitus. *Andrology*, 2(1), 117–124.
- Cui, D., Han, G., Shang, Y., Liu, C., Xia, L., Li, L., & Yi, S. (2015). Antisperm antibodies in infertile men and their effect on semen parameters: A systematic review and meta-analysis. *Clinica Chimica Acta*, 444, 29–36.
- Darbandi, M., Darbandi, S., Agarwal, A., Sengupta, P., Durairajanayagam, D., Henkel, R., & Sadeghi, M. R. (2018). Reactive oxygen species and male reproductive hormones. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1), 1–14.
- De Coster, S., & Van Larebeke, N. (2012). Endocrine-disrupting chemicals: Associated disorders and mechanisms of action. *Journal of Environmental and Public Health*, 2012.
- Deng, Z., Chen, F., Zhang, M., Lan, L., Qiao, Z., Cui, Y., An, J., Wang, N., Fan, Z., Zhao, X., & Li, X. (2016). Association between air pollution and sperm quality: A systematic review and meta-analysis. *Elsevier*, 208, 663–669.
- Depuydt, E., & Comhaire, H. (1996). The Regulation Between Reactive Oxygen Species and Cytokines in Andrological Patients With or Without Male Accessory Gland Infection. *Journal of Andrology*, 17(6), 699–707.
- Ding, R., Jin, Y., Liu, X., Zhu, Z., Zhang, Y., Wang, T., & Xu, Y. (2016). Characteristics of DNA methylation changes induced by traffic-related air pollution. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 796, 46–53.
- EEA. (2020). *European Environment Agency - Air quality in Europe*. <https://www.eea.europa.eu/publications/air-quality-in-europe-2020-report>
- Esteves, S. C., Sharma, R. K., Thomas, J., & Agarwal, A. (1996). Suitability of the hypo-osmotic swelling test for assessing the viability of cryopreserved sperm. *Fertility and Sterility*, 66(5), 798–804.
- Flickinger, C., & Fawcett, D. W. (1967). The junctional specializations of sertoli cells in the seminiferous epithelium. *The Anatomical Record*, 158(2), 207–221.
- França, L. R., Hess, R. A., Dufour, J. M., Hofmann, M. C., & Griswold, M. D. (2016). The Sertoli cell: One hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology*, 4(2), 189–212.
- Fronczak, C. M., Kim, E. D., & Barqawi, A. B. (2012). The insults of illicit drug use on male fertility. *Journal of Andrology*, 33(4), 515–528.
- GAO, H., MA, M. quan, ZHOU, L., JIA, R. ping, CHEN, X. guo, & HU, Z. de. (2007). Interaction of DNA with aromatic hydrocarbons fraction in atmospheric particulates of Xigu District of Lanzhou, China. *Journal of Environmental Sciences*, 19(8), 948–954.
- Gaspari, L., Chang, S. S., Santella, R. M., Garte, S., Pedotti, P., & Taioli, E. (2003). Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human sperm as a marker of DNA damage and infertility. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 535(2), 155–160.
- Griswold, M. D. (2018). 50 years of spermatogenesis: Sertoli cells and their interactions with germ cells. *Biology of Reproduction*, 99(1), 87–100.
- Hamada, A., Esteves, S. C., Nizza, M., & Agarwal, A. (2012). Unexplained male infertility: Diagnosis and management. *International Braz J Urol*, 38(5), 576–594.
- Han, Y., Xia, Y., Zhu, P., Qiao, S., Zhao, R., Jin, N., Wang, S., Song, L., Fu, G., & Wang, X. (2010). Reproductive hormones in relation to polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) metabolites among non-occupational exposure of males. *Science of the Total Environment*, 408(4), 768–773.
- Hansen, C., Luben, T. J., Sacks, J. D., Olshan, A., Jeffay, S., Strader, L., & Perreault, S. D. (2010). The effect of ambient air pollution on sperm quality. *Environmental Health Perspectives*, 118(2), 203–209.
- Heller, C. G., & Clermont, Y. (1963). Spermatogenesis in man: An estimate of its duration. *Science*, 140(3563), 184–186. <https://doi.org/10.1126/science.140.3563.184>
- Henkel, R. R., & Schill, W. B. (2003). Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1, 1–22.
- Holstein, A. F., Schulze, W., & Davidoff, M. (2003). Understanding spermatogenesis is a

- prerequisite for treatment. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1, 1–16.
- Inyang, F., Ramesh, A., Kopsombut, P., Niaz, M. S., Hood, D. B., Nyanda, A. M., & Archibong, A. E. (2003). Disruption of testicular steroidogenesis and epididymal function by inhaled benzo(a)pyrene. *Reproductive Toxicology*, 17(5), 527–537.
- Jamalan, M., Ghaffari, M. A., Hoseinzadeh, P., Hashemitabar, M., & Zeinali, M. (2016). Human sperm quality and metal toxicants: Protective effects of some flavonoids on male reproductive function. *International Journal of Fertility and Sterility*, 10(2), 215–222.
- Jeng, H. A., & Yu, L. (2008). Alteration of sperm quality and hormone levels by polycyclic aromatic hydrocarbons on airborne particulate particles. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 43(7), 675–681.
- Jurewicz, J., Dziewirska, E., Radwan, M., & Hanke, W. (2018). Air pollution from natural and anthropic sources and male fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1).
- Katz, D. F., Overstreet, J. W., & Hanson, F. W. (1980). A new quantitative test for sperm penetration into cervical mucus. *Fertility and Sterility*, 33(2), 179–186.
- Kesari, K. K., Agarwal, A., & Henkel, R. (2018). Radiations and male fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1), 1–16.
- Kizu, R., Okamura, K., Toriba, A., Mizokami, A., Burnstein, K. L., Klinge, C. M., & Hayakawa, K. (2003). Antiandrogenic activities of diesel exhaust particle extracts in PC3/AR human prostate carcinoma cells. *Toxicological Sciences*, 76(2), 299–309.
- Kovac, J. R., Khanna, A., & Lipshultz, L. I. (2015). The effects of cigarette smoking on male fertility. *Postgraduate Medicine*, 127(3), 338–341.
- Kühnert, B., & Nieschlag, E. (2004). Reproductive functions of the ageing male. *Human Reproduction Update*, 10(4), 327–339.
- La Vignera, S., Condorelli, R. A., Balercia, G., Vicari, E., & Calogero, A. E. (2013). Does alcohol have any effect on male reproductive function? A review of literature. *Asian Journal of Andrology*, 15(2), 221–225.
- Mortimer, D. (1991). Sperm preparation techniques and iatrogenic failures of in-vitro fertilization. *Human Reproduction*, 6(2), 173–176.
- Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. (2015). The mammalian blood-testis barrier: Its biology and regulation. *Endocrine Reviews*, 36(5), 564–591.
- Nobles, C. J., Schisterman, E. F., Ha, S., Kim, K., Mumford, S. L., Buck Louis, G. M., Chen, Z., Liu, D., Sherman, S., & Mendola, P. (2018). Ambient air pollution and semen quality. *Environmental Research*, 163(January), 228–236.
- O'Donnell, L., Meachem, S. J., Stanton, P. G., & McLachlan, R. I. (2006). Endocrine regulation of spermatogenesis. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (Third Edit). Elsevier Inc.
- Oliveira, P. F., Tomás, G. D., Dias, T. R., Martins, A. D., Rato, L., Alves, M. G., & Silva, B. M. (2015). White tea consumption restores sperm quality in prediabetic rats preventing testicular oxidative damage. *Reproductive BioMedicine Online*, 31(4), 544–556.
- Rahban, R., & Nef, S. (2020). Regional difference in semen quality of young men: a review on the implication of environmental and lifestyle factors during fetal life and adulthood. *Basic and Clinical Andrology*, 30(1), 1–15.
- Rajender, S., Avery, K., & Agarwal, A. (2011). Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 727(3), 62–71.
- Santos, T.A. (2018a). Reprodução Medicamente Assistida. In: Santos, T.A. (Ed.). *Temas de Medicina da Reprodução* (pp.186-196).
- Santos, T.A. (2018b). Impacto Médico, Social e Demográfico da Infertilidade. In: Santos, T.A. (Ed.). *Temas de Medicina da Reprodução* (pp.12-17).
- Shiraishi, K., Takihara, H., & Matsuyama, H. (2010). Elevated scrotal temperature, but not varicocele grade, reflects testicular oxidative stress-mediated apoptosis. *World Journal of Urology*, 28(3), 359–364.
- Sklorz, M., Briedé, J. J., Schnelle-Kreis, J., Liu, Y., Cyrus, J., De Kok, T. M., & Zimmermann, R. (2007). Concentration of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons and oxygen free radical formation from urban particulate matter. *Journal of Toxicology and Environmental*

- Health - Part A: Current Issues*, 70(21), 1866–1869.
- Smith, L. B., & Walker, W. H. (2014). The regulation of spermatogenesis by androgens. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 30, 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.02.012>
- Song, J., & Song, T. M. (2019). Social big-data analysis of particulate matter, health, and society. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(19).
- Sousa, A. P., Santos, T. A., & Coimbra, U. De. (2010). *A Importância da Integridade da Cromatina dos Espermatozoides na Infertilidade Masculina Artigo de Revisão*. 37–47.
- Sun, X. lei, Wang, J. lin, Peng, Y. peng, Gao, Q. qiang, Song, T., Yu, W., Xu, Z. peng, Chen, Y., & Dai, Y. tian. (2018). Bilateral is superior to unilateral varicocele in infertile males with left clinical and right subclinical varicocele: a prospective randomized controlled study. *International Urology and Nephrology*, 50(2), 205–210.
- Sutovsky, P., & Manandhar, G. (2006). Mammalian spermatogenesis and sperm structure: Anatomical and compartmental analysis. *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*, 1–30.
- Thomas, L. (2019). *Causes of a Low Sperm Count*. Medical Life Sciences. <https://wayback.archive-it.org/6850/20190520155321/https://www.news-medical.net/health/Causes-of-a-Low-Sperm-Count.aspx>
- Tunc, O., & Tremellen, K. (2009). Oxidative DNA damage impairs global sperm DNA methylation in infertile men. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 26(9–10), 537–544.
- Turner, K. A., Rambhatla, A., Schon, S., Agarwal, A., Krawetz, S. A., Dupree, J. M., & Avidor-Reiss, T. (2020). Male Infertility is a Women’s Health Issue-Research and Clinical Evaluation of Male Infertility Is Needed. *Cells*, 9(4), 1–14.
- Turner, R. M. (2003). Tales from the Tail: What Do We Really Know about Sperm Motility? *Journal of Andrology*, 24(6), 790–803.
- Ventura Buscar, S. (2014). *Estudo da Fragmentação do DNA em Espermatozoides Humanos após Separação por MACS*. Universidade de Lisboa.
- Wagner, H., Cheng, J. W., & Ko, E. Y. (2018). Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature. *Arab Journal of Urology*, 16(1), 35–43.
- Wang, C., & Swerdloff, R. S. (2014). Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests. *Fertility and Sterility*, 102(6), 1502–1507.
- Watanabe, N., & Oonuki, Y. (1999). Inhalation of diesel engine exhaust affects spermatogenesis in growing male rats. *Environmental Health Perspectives*, 107(7), 539–544.
- WHO. (2010). *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen (5th edition)*. 7–114.
- WHO. (2021). *World Health Organization*. <https://www.who.int/teams/environment-climate-change-and-health/air-quality-and-health/ambient-air-pollution>
- Yoshida, S., Hirano, S., Shikagawa, K., Hirata, S., Rokuta, S., Takano, H., Ichinose, T., & Takeda, K. (2007). Diesel exhaust particles suppress expression of sex steroid hormone receptors in TM3 mouse Leydig cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 24(3), 292–296.
- 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.