

revista digital

PRONÚCLEO

20 ANOS

Assuntos regulatórios

Destinação de
embriões
excedentes

Com a palavra

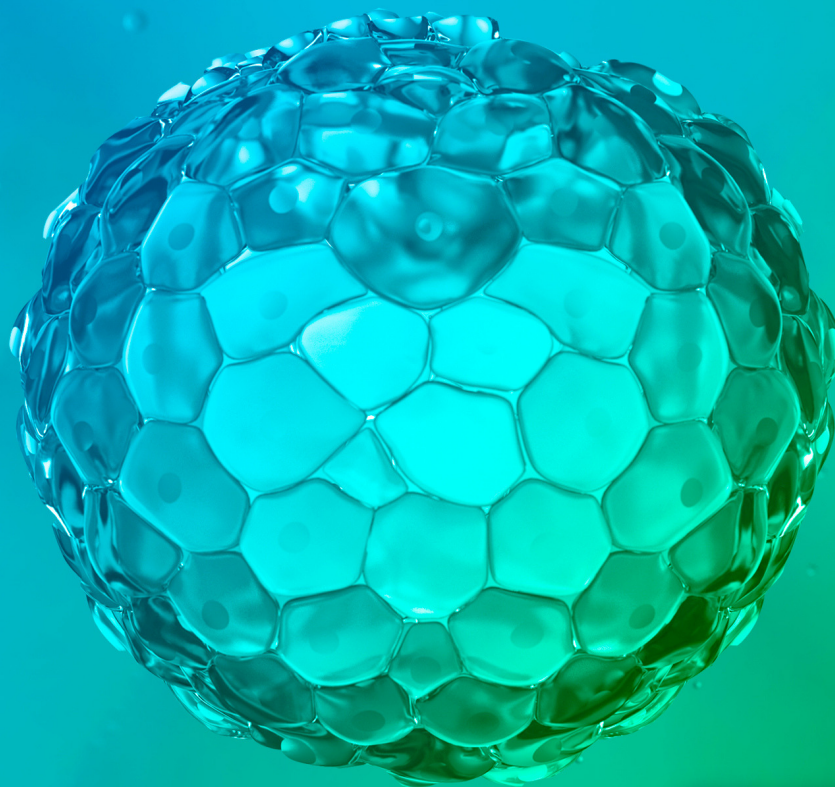
Edson Lo Turco:
metabolômica

Ponto em pauta

O laboratório ideal
e a importância da
gestão de qualidade

Falando em...

- Capacitação e seleção espermática
- Tempo de armazenamento de embriões criopreservados
- Epigenética



TUDO PELO

EMBRIÃO

PERFEITO

Nota da editora



Obrigada a todos que aceitaram o convite para compor mais um de nossos volumes. Vocês contribuem para o crescente sucesso desse projeto! Nesse volume, gostaria de agradecer especialmente à Patrícia França pela ajuda na revisão e edição, agregando imensurável valor com suas observações. É muito bom poder contar com ajuda e suporte de uma equipe, e ainda melhor quando temos a oportunidade de aprender com ela!

Desejo uma boa leitura a todos e coloco-me à disposição no endereço de *e-mail* abaixo para fornecer as referências citadas nos textos, ou como elo de comunicação com os autores, caso queiram esclarecer algum ponto.

Sintam-se à vontade também para enviar *feedbacks* e sugestões. Nosso compromisso é evoluir cada vez mais, juntos. Contamos com vocês!

Contato: anaclaracesteves@gmail.com

CORPO EDITORIAL

COMISSÃO CIENTÍFICA



Ana Paula
de Souza
Aguiar



Bia Mattos



Brummel
Rodrigues
Magalhães



Camila Pinho
Pompeu



Darlete
Matos



Mariana de
Nadai



Patrícia
França



Rita Figueira



Thais
Serzedello
de Paula



Vinícius
Bonato da
Rosa

CONSULTORIA DE EDIÇÃO



Diana Caroline Bastos



Felype Wanzeller

CONSELHO EDITORIAL



Bernardo Moura

EDITORA ASSOCIADA



Ana Beatriz Zavan Marques

APOIO

Handle



20 ANOS
PRONÚCLEO
Associação Brasileira
de Embriologistas em
Medicina Reprodutiva

Nesta edição

Palavra da Presidência	7
Assuntos Regulatórios	8
Ponto em Pauta	11
Falando em Andrologia	28
Falando em Embriologia	35
Falando em Genética	38
Com a Palavra	42
Fique de olho	45

COLABORADORES

ANA PAULA DE SOUZA AGUIAR

- Graduação em Ciências Biológicas com ênfase em Análises Clínicas e bacharelado em Biologia pela Universidade Gama Filho (RJ);
- Homologação da licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidad Complutense de Madrid (Espanha);
- Diretora – sócia na Ferti Rio Administração, Procedimento e Consultoria LTDA;
- Embriologista sênior no Laboratório de Fertilização *in vitro* do IBRRA, Belo Horizonte - MG.

BRUMMEL RODRIGUES MAGALHÃES

- Graduação em Biomedicina com habilitações em Análise Clínicas e Citologia pela Universidade de Franca (UNIFRAN/SP);
- Especialista em Reprodução Humana Assistida pelo Instituto Sapientiae – Faculdade de Medicina de Jundiaí-SP;
- Embriologista sênior da Clínica GERARE Reprodução Humana, Palmas - TO;
- Delegado Regional do Estado do Tocantins da PRONÚCLEO.

CLAUDIA GUILHERMINO PETERSEN

- Embriologista clínica, especialista em micromanipulação, cultivo e criopreservação de gametas e embriões humanos;
- Diretora do laboratório de Reprodução Assistida do Centro de Reprodução Humana Prof. Franco Junior, Ribeirão Preto - SP (1990 - atual);
- Possui 169 trabalhos publicados em revistas científicas e 160 trabalhos apresentados em anais de congressos;
- Ex-presidente da PRONÚCLEO (2006 - 2010);
- Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar/SP);
- Mestrado em Embriologia Clínica na Universidade de Medicina de Leeds, Inglaterra (2003);
- Doutorado em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia pela Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP/SP - 2009).

EDSON LO TURCO

- Graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual de Londrina (UEL) (2001);
- Treinamento técnico em biologia molecular e transferência nuclear pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho na (UNESP) (2002);
- Mestrado em Reprodução Animal pela UNESP (2004);
- Doutorado pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) (2008);
- Chefiou o laboratório de fertilização *in vitro* do Hospital São Paulo (2004 - 2016);
- Coordenador de Pesquisa e Desenvolvimento do centro de reprodução humana LabforLife;
- Diretor científico da IonMedicine – Clinical Metabolomics;
- Sócio fundador da EmbrioLógica – Consultoria em Reprodução Humana;
- Responsável técnico da MedMep – Medicina Veterinária Personalizada;
- Professor orientador de mestrado e doutorado da disciplina de Urologia pela pós-graduação da UNIFESP.

COLABORADORES

FERNANDO MARQUES GUIMARÃES

- Mestrado pelo Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ/RJ);
- Especialista em Reprodução Assistida;
- Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ/RJ);
- Embriologista sênior no Instituto Verhum;
- Consultor na Fertitech - Tecnologia em Reprodução Assistida;
- Coordenador do Comitê de Ética da PRONÚCLEO.

JAQUELINE VERCEZE BORTOLIERO

- Graduação em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Barão de Mauá;
- Especialista em Reprodução Assistida pela Rede Latinoamericana de Reprodução Assistida;
- Embriologista sênior na clínica Matrix - Prof. Dr. Marcos Moura, Ribeirão Preto - SP;
- Consultora na Fertitech- Tecnologia em Reprodução Assistida;
- Coordenadora do Comitê de Ética da PRONÚCLEO.

LETÍCIA SCHMIDT ARRUDA

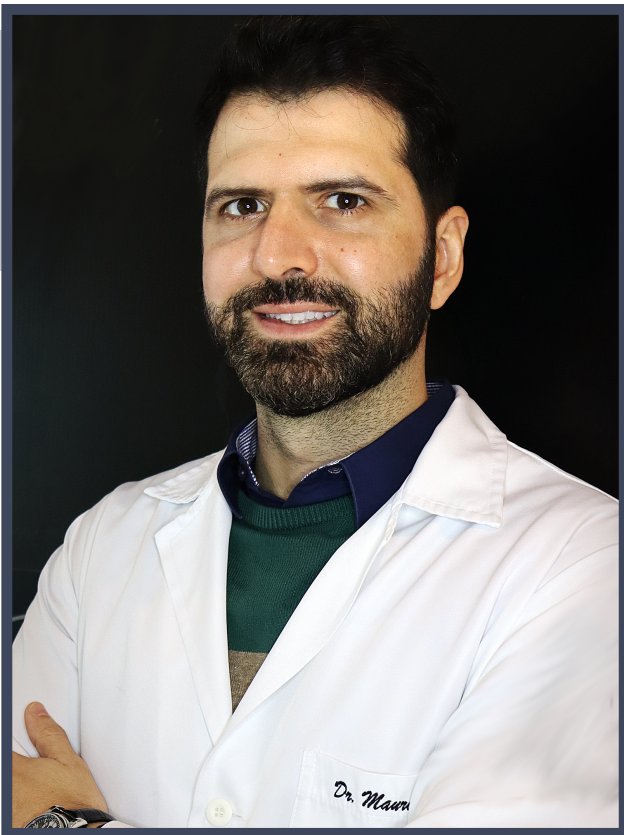
- Sócia fundadora do Vida Fértil- Centro de Preservação da Fertilidade Masculina;
- Diretora do laboratório de embriologia da Clínica Proser- Reprodução Assistida;
- Mestrado em Fisiologia pela Universidade Federal do Rio Grande Sul (UFRGS/RS);
- Graduação em Medicina Veterinária (UFRGS/RS);
- Desenvolveu pesquisas com vitrificação e cultivo de embriões e comunicação celular em células do *cumulus*;
- Atualmente desenvolve trabalhos com lubrificantes seminais e marcadores de competência oocitária.

RAQUEL DE LIMA LEITE SOARES ALVARENGA

- Doutorado em Biologia Celular pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG/MG);
- Doutorado Sanduíche pela Université de Rennes 1 (França);
- Mestrado em Morfologia pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG/MG),
- Especialização em Embriologia pelo CRBio-4,
- Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG/MG),
- Especialista em Embriologia Clínica;
- Diretora na Fertitech - Tecnologia em Reprodução Assistida;
- Embriologista sênior e sócia-proprietária em Cegonha Medicina Reprodutiva;
- Membro do conselho do Comitê de Ética do PRONÚCLEO.

RITA FIGUEIRA

- Embriologista sênior e supervisora de qualidade na ANDROFERT - Clínica de Andrologia e Laboratório de Reprodução Humana;
- Graduação em Ciências Biológicas pelo Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo (USP/SP);
- Mestrado em Ciências pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP/SP);
- Doutorado em Ciências Médicas pela Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (SP);
- Certificação de Supervisor Técnico em Embriologia pela ABB - American Board of Bioanalysis (EUA).



PALAVRA DA PRESIDÊNCIA

Além do nosso encontro, tivemos recentemente o lançamento do novo site da PRONÚCLEO, com nova identidade visual e design, para trazer informação da melhor forma e oferecer a melhor experiência a todos vocês. Não deixe de conferir e aproveite para se tornar sócio, caso ainda não seja. Os associados possuem inúmeras vantagens, sendo uma delas a inscrição gratuita no XXIV Congresso Brasileiro de Reprodução Assistida - realização da SBRA - que este ano acontecerá online nos dias 1, 2 e 3 de outubro.

Seguindo com os projetos comemorativos, chegamos agora ao terceiro volume da nossa revista digital. Nesta edição, trazemos temas como a destinação de embriões, o laboratório ideal e importância da gestão de qualidade, formas de seleção e capacitação espermática, influência do tempo de criopreservação dos embriões, epigenética e metabólica.

Para comentar todos esses conteúdos, temos a honra de contar com a participação de uma das nossas ex-diretoras e presidente, Cláudia Petersen, bem como uma das fundadoras da nossa Associação, Raquel Alvarenga. Além disso, temos a participação dos amigos Jaqueline Verceze, Fernando Guimarães, Edson Lo Turco, Letícia Arruda e os membros da comissão científica, Ana Paula Aguiar, Brummel Magalhães e Rita Figueira.

Agradecemos a colaboração dos autores em mais uma edição desse projeto. Esperamos que você aprecie, boa leitura!

E continuamos com a programação de comemoração aos 20 anos da nossa Associação! Primeiramente, agradecemos a participação de todos em nosso encontro virtual, por terem contribuído para seu sucesso. Nosso evento contou com palestrantes de alto nível e com uma grande audiência durante todo o dia, sendo mais de 600 visualizações de especialistas do Brasil e de todo mundo. Claro que também não podemos deixar de reconhecer o trabalho de todos os envolvidos na comissão e organização, que trabalharam incansavelmente para que tudo corresse da melhor forma, em especial nossa secretária Diana. Não podemos deixar de citar também nossos associados, que fizeram com que atingíssemos o recorde de sócios pagantes em toda nossa história: hoje somos mais de 250, um número muito significativo para nossa Associação, que vem crescendo a cada dia com a sua ajuda. Obrigado a todos!!

ASSUNTOS REGULATÓRIOS

CLAUDIA PETERSEN



Destinação de embriões excedentes

O SisEmbrio – Sistema Nacional de Produção de Embriões foi criado pela Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) Anvisa nº 29 em 12 de maio de 2008, a fim de permitir o conhecimento de quantos embriões humanos são produzidos por fertilização *in vitro* e acabam não sendo utilizados nos respectivos procedimentos, no Brasil.

Em 2008, o SisEmbrio publicou que foram congelados um total de 5.539 embriões por 30 diferentes Bancos de Células e Tecidos Germinativos (BCTGs). Desde então, esse sistema relata um aumento gradativo do número de embriões armazenados pelas clínicas brasileiras: 8.058 (2009), 21.254 (2010), 26.283 (2011), 32.181 (2012), 38.062 (2013) 47.812 (2014), 67.259 (2015), 78.216 (2017) e 88.776 (2018).

Os dados de 2019, publicados no mês de maio deste ano, no 13º Relatório do SisEmbrio revelam que foram congelados 99.112 embriões, um aumento de 12% comparado a 2018.

Segundo o Conselho Federal de Medicina (CFM), na resolução nº 2.168/2017 publicada no diário oficial da união (D.O.U) de 10 Nov 2017 seção I, p.73, as normas éticas para a utilização das técnicas de RA adotam que BCTGs podem criopreservar embriões (capítulo V, itens 1 e 2), desde que o número total de embriões gerados em laboratório seja comunicado aos pacientes para que eles decidam quantos embriões serão transferidos a fresco, conforme determina a resolução (mulheres até 35 anos: até 2 embriões; mulheres entre 36 e 39 anos: até 3 embriões; mulheres com 40 anos ou mais: até 4 embriões; em situações de doação de óvulos e embriões, considera-se a idade da doadora no momento da coleta dos óvulos).

Os embriões não transferidos para o útero da receptora, aqueles que “sobram” no processo de tratamento de fertilização *in vitro*, denominados "embriões excedentes", devem ser congelados, por tempo indeterminado.

Nota: embora a idade máxima para doação de gametas esteja estabelecida na resolução nº 2.168/2017 do CFM (35 anos para mulher e 50 para homens), não está prevista idade máxima para doação de embrião; nesse caso, entende-se como aconselhável seguir as mesmas diretivas de idade estabelecidas para doação de gametas.

A realidade é que atualmente, com o aumento no número de embriões criopreservados, existe um grande número de embriões excedentes que não serão mais utilizados pelos casais, devido a diversos fatores, como: casais que já tiveram seus filhos, pacientes em separação, casos de morte de um dos cônjuges, casos de abandono dos embriões pelo casal, entre outros motivos. Com o objetivo de direcionar o destino destes embriões excedentes para não mantê-los criopreservados por tempo indefinido, o CFM, em sua resolução nº 2.168/2017, permite a possibilidade de doação, descarte e pesquisa.

DOAÇÃO

Conforme descrito nos itens 1, 2, 4, 5, 6 e 8 do capítulo IV e no item 3 do capítulo V da resolução CFM Nº 2.168/2017:

"No momento da criopreservação, os pacientes devem manifestar sua vontade, por escrito, quanto ao destino a ser dado aos embriões criopreservados em caso de divórcio ou dissolução de união estável, doenças graves ou falecimento de um deles ou de ambos, e quando desejam doá-los. A doação não poderá ter caráter lucrativo ou comercial."

Os doadores não devem conhecer a identidade dos receptores e vice e versa, devendo ser mantido, obrigatoriamente, o sigilo sobre a identidade dos doadores de embriões, bem como dos receptores.

Contudo, em situações especiais, por motivação médica, informações sobre os doadores podem ser fornecidas exclusivamente para médicos, resguardando-se a identidade civil do(a) doador(a). Os BCTGs onde são feitas as doações devem manter, de forma permanente, um registro com dados clínicos de caráter geral, características fenotípicas e uma amostra de material celular dos doadores, de acordo com legislação vigente.

Na região de localização da unidade, o registro dos nascimentos evitará que um(a) doador(a) tenha produzido mais de duas gestações de crianças de sexos diferentes em uma área de um milhão de habitantes. Um(a) mesmo(a) doador(a) poderá contribuir com quantas gestações forem desejadas, desde que em uma mesma família receptora. Não será permitido aos médicos, funcionários e demais integrantes da equipe multidisciplinar dos BCTGs a participar como doadores nos programas de RA.

**"Atualmente
existe um
grande número
de embriões
excedentes"**

DESCARTE

Encontra-se descrito nos itens 4 e 5 do no capítulo V da dita resolução que:

■ ASSUNTOS REGULATÓRIOS ■

"Os embriões congelados, com mais de 03 (três) anos, podem ser descartados, caso seja essa uma opção do(s) paciente(s). Da mesma forma, os embriões criopreservados e abandonados, ou seja, aqueles embriões em que os responsáveis descumpriram o contrato pré-estabelecido e/ou não foram localizados pela clínica, após três anos ou mais de criopreservação, poderão ser descartados."

PESQUISA

O item 1 do capítulo VI da mesma resolução dispõe de que:

"As técnicas de RA podem ser aplicadas à seleção de embriões submetidos a diagnóstico de alterações genéticas causadoras de doenças podendo, nesses casos, serem doados para pesquisa ou descartados, conforme a decisão do(s) paciente(s) devidamente documentada em consentimento informado livre e esclarecido específico."

O CFM, ao permitir o descarte de embriões, considerou que a Lei N° 11.105/05 (Lei de Biossegurança), em seu artigo 5º/ II, já autorizava o descarte de embriões congelados há três anos, para uso em pesquisas sobre células-tronco. Isso porque, conforme exposto, faz-se necessária a destruição dos embriões para que seja possível sua utilização em pesquisas e/ou tratamentos com células-tronco. Segue destacada transcrição da referida Lei:

"Art. 5º: É permitida, para fins de pesquisa e terapia, a utilização de células-tronco

embrionárias obtidas de embriões humanos produzidos por fertilização *in vitro* e não utilizados no respectivo procedimento, atendidas as seguintes condições:

I - Embriões inviáveis (aqueles com alterações genéticas comprovadas por diagnóstico pré-implantacional, conforme normas específicas estabelecidas pelo Ministério da Saúde, que tiveram seu desenvolvimento interrompido por ausência espontânea de clivagem após período superior a vinte e quatro horas a partir da fertilização *in vitro*, ou com alterações morfológicas que comprometam o pleno desenvolvimento do embrião); ou

II - Embriões congelados há 3 (três) anos ou mais, na data da publicação desta Lei, ou que, já congelados na data da publicação desta Lei, depois de completarem 3 (três) anos, contados a partir da data de congelamento.

1º Em qualquer caso, é necessário o consentimento dos genitores.

2º Instituições de pesquisa e serviços de saúde que realizem pesquisa ou terapia com células-tronco embrionárias humanas deverão submeter seus projetos à apreciação e aprovação dos respectivos comitês de ética em pesquisa.

3º É vedada a comercialização do material biológico a que se refere este artigo e sua prática implica o crime tipificado no art. 15 da Lei no 9.434, de 4 de fevereiro de 1997." ■

Ponto em Pauta

O laboratório ideal e a importância da gestão de qualidade

- Consenso de Cairo - "Apenas uma coisa é importante no laboratório de FIV: TUDO" - artigo comentado *por Ana Paula Aguiar*
- Exposição sobre a importância da Gestão de Qualidade e Análise de Risco nas clínicas de Reprodução Assistida *por Raquel Alvarenga, Jaqueline Verceze e Fernando Guimarães*

“There is only one thing that is truly important in IVF : everything” Cairo Consensus Guidelines on IVF culture Conditions

"Apenas uma coisa é realmente importante no laboratório de FIV: tudo"

Diretrizes do Consenso de Cairo sobre condições de cultivo

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2019.10.003>

Comentado por Ana Paula Aguiar

O sucesso dos tratamentos de Reprodução Humana Assistida (RHA) depende de boas práticas laboratoriais, uma vez que está diretamente relacionado à excelência do cultivo *in vitro*. Seguindo as diretrizes de 2016 da Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia (ESHRE), tudo que está relacionado ao laboratório de Fertilização *in vitro* (FIV) deve ser controlado e monitorado regularmente. O controle de qualidade nos laboratórios de FIV é de grande importância, pois evita variações indesejáveis e permite a identificação e resolução de eventuais problemas para que não afetem os resultados.

Inúmeras são as variáveis que podem afetar gametas e embriões: temperatura, umidade, osmolaridade, pH, tensão de O₂, CO₂, tipo de incubadora, meios de cultivo e elementos como os compostos orgânicos voláteis (COV) e poluentes do ar. O artigo em questão reuniu um grupo de especialistas na área, para estabelecer diretrizes sobre as condições de cultivo embrionário. A recomendação é procurar sempre diminuir os efeitos adversos, visando criar um ambiente ideal para uma melhor chance de se obter um resultado favorável, pois um pequeno detalhe pode fazer toda diferença no resultado final.

Para isso, um laboratório equipado e com condições ideais de cultivo deve ser projetado com uma única finalidade: proteger os gametas e embriões.

Tendo em vista as recomendações levantadas no artigo, aqui revisaremos alguns pontos principais sugeridos pelos autores. Vale informar que, de maneira geral, o que segue disposto está contemplado no artigo em questão; as exceções estão seguidas de suas respectivas referências.

"O sucesso dos tratamentos de Reprodução Humana Assistida está diretamente relacionado à excelência do cultivo *in vitro*"

Temperatura, umidade e pH

Sabe-se que oócitos e embriões são sensíveis a mudanças de temperaturas. É importante considerar a suscetibilidade do fuso meiótico oocitário a condições externas, como temperatura, pH e o dano causado pela pipetagem agressiva durante a desnudação (González-Ortega *et al.*, 2016), que tornam o oócito mais sensível a essas mudanças que os espermatozoides ou embriões.

O laboratório ideal

Ana Paula Aguiar

Apesar de uma faixa de variação aceitável de temperatura não ter sido determinada pelo Consenso, oócitos e embriões devem ser mantidos idealmente a 37°C durante todas as etapas de manipulação e cultivo. Para isso, é preciso atentar para as fases em que possa ocorrer variação de temperatura a fim de evitá-la - por exemplo com o uso de suportes aquecidos para tubos durante a aspiração folicular. Além disso, oscilações na temperatura do laboratório podem afetar o correto funcionamento dos equipamentos.

Já a umidade poderia aumentar o risco do crescimento de microorganismos na incubadora, impactando negativamente o desenvolvimento embrionário. Por essa razão e com alguns estudos citados sugerindo desenvolvimento embrionário levemente melhor em incubadoras sem umidade, o uso de incubadoras úmidas é desencorajado. Com o uso de uma camada de óleo nas placas de cultivo é possível evitar a evaporação dos meios e, conseqüentemente, evitar uma mudança na osmolaridade, o que nos permite tranquilidade no uso de incubadoras secas. O uso de termohigrômetros calibrados pelo menos duas vezes ao ano para controle da umidade no ambiente se faz necessário.

"Oscilações na temperatura do laboratório podem afetar o correto funcionamento dos equipamentos"

O parâmetro mais importante do meio de cultivo é o pH, fator crítico que deve ser minuciosamente mantido para não afetar o metabolismo celular, comprometendo a qualidade e o desenvolvimento dos gametas e embriões. Dentro da incubadora, o pH se mantém entre 7,2 a 7,4 com concentrações de CO₂ entre 5-6% (no nível do mar), variando conforme o fabricante. Esse pH é alcançado através de uma pressão adequada de CO₂ com sensores próprios, calibrados e validados.

"O parâmetro mais importante do meio de cultivo é o pH"

Fora da incubadora, o pH aumenta e, por isso, a importância de utilizar uma solução de tampão com Hepes ou Mops para estabilizar o pH, mantendo-o estável quando se trabalha fora da incubadora. Variações nas condições de cultivo, como pH do meio, podem ser prejudiciais por causarem perturbações intracelulares deletérias. Além disso, mesmo coberta com óleo, uma placa com gotas de 50µl alcança um pH maior que 7,4 após apenas 2 minutos fora da incubadora, tornando-se imprescindível um controle estrito de tais variáveis.

Oxigênio e controle de poluentes

Buscando recriar as condições do trato reprodutor feminino, existem dois fatores que podem e devem ser replicados *in vitro*: tensão de oxigênio e exposição dos embriões a poluentes, especialmente COV.

Idealmente, a tensão de oxigênio deve ser baixa (5%), uma vez que já foi demonstrado o efeito deletério da alta tensão.

Também devemos reduzir a exposição dos embriões aos COV, que podem causar efeitos adversos no seu desenvolvimento. Independente de qual for o tipo de incubadora a ser utilizada, é recomendável o uso de filtros Coda *in line* para minimizar os contaminantes, incluindo os COV, garantindo uma melhor qualidade do ar que chega às incubadoras. Em adição a esses filtros, para manter o ar do laboratório livre de partículas e outros poluentes, é recomendado o uso de um sistema com filtro HEPA e carvão ativado com permanganato de potássio e oxidação fotocatalítica ultravioleta (Consenso de Cairo, 2018). Equipamentos com sensibilidade adequada devem ser usados para medição dos COV.

Cabines de fluxo e preparo de placas

Conseguir estabilidade em cabines fluxo laminar exige habilidade e rapidez do embriologista além de um sistema de controle de qualidade rigoroso. O preparo de placas quando realizado nas cabines de fluxo laminar à temperatura ambiente, mantém a esterilidade e condições adequadas durante o processo. A velocidade com que se realiza o preparo é essencial para evitar a evaporação. Não é recomendado o preparo de múltiplas placas ao mesmo tempo; sendo assim, as placas devem ser preparadas em série.

Otimizando ainda o trabalho com as cabines, devemos atentar para pontos fundamentais, como o efeito de resfriamento, evaporação e consequente mudança de osmolaridade do meio de cultivo. É importante calibrar as superfícies de acordo com a placa que será utilizada, visando à manutenção da temperatura no interior da gota do meio de cultivo. O uso de uma cúpula de vidro com gás distribuído ao redor da placa pode prolongar o tempo de trabalho na cabine.



Incubadoras

A quantidade de aberturas das portas/tampas das incubadoras, sejam elas tradicionais ou de bancada, deve ser mínima. Isso pode ser proporcionado se tivermos um número adequado de incubadoras em relação ao número de ciclos de FIV realizados e utilizando incubadoras de trabalho ou de curta duração dedicadas ao equilíbrio dos meios, aquecimento das placas ou para trabalhos momentâneos.

Incubadoras de bancada apresentam uma recuperação rápida de CO₂ e O₂, reduzindo o impacto prejudicial que uma incubadora tradicional possa causar. Medidores mecânicos, eletrônicos ou analisadores de gases são os utilizados para manter um controle diário.

A manutenção preventiva é realizada anualmente. As orientações de limpeza e esterilização podem ser feitas com peróxido de hidrogênio ou detergente próprio para uso em laboratório de FIV, sempre procurando seguir as orientações do fabricante. Após a limpeza, temperatura, CO₂ e O₂ devem ser reajustados e calibrados pela equipe ou por empresa especializada. Um controle adequado das incubadoras é um dos aspectos mais importantes no laboratório de FIV e por isso, as medições devem ser feitas com aparelhos calibrados pelo menos anualmente, com precisão de 0,05°C e limite não superior a 0,1°C, para os termômetros.

Meios de cultivo e cuidados a serem observados

"Continua sendo verdade em 2011, que não existe um meio de cultura disponível que otimize o desenvolvimento de embriões humanos" (Harper *et al.*, 2012).

A maioria dos meios contém mais de 40 componentes, em concentrações e quantidades diferentes. Os especialistas consideram que alguns componentes podem ser padronizados e outros merecem consideração especial.

Em geral, como citado no artigo em questão, os meios são compostos por aminoácidos comuns, carboidratos (glicose a aproximadamente 3mmol/l em meio para blastocisto ou a 0,2-1,0 mmol/l em meio contínuo ou de clivagem, lactato a 5-10mmol/l e piruvato a <0,5mmol/l), antibióticos (gentamicina), cálcio e magnésio.

De acordo com os autores, ainda não há consenso sobre a importância de outros componentes. Em relação ao aminoácido glutamina, está estabelecido que a forma de dipeptídeo é menos prejudicial ao embrião. Quanto à suplementação com proteínas, o uso de HSA (*Human Serum Albumin*) recombinante seria mais seguro e consistente que HSA, que por sua vez seria melhor que formulações contendo globulina.

"Um controle adequado das incubadoras é um dos aspectos mais importantes no laboratório de FIV"

Alguns meios continham vermelho fenol para controle de pH, mas devido sua atividade estrogênica e por ser fonte de espécies reativas de oxigênio (ROS), os riscos superam os benefícios. Por isso, seu uso foi descontinuado, também considerando que em gotas pequenas de meio seria difícil verificar mudança de cor devido a pH alterado.

O laboratório ideal

Ana Paula Aguiar

Não existem bases científicas que apontem diferenças significativas entre o uso de meios sequenciais e meios únicos. Se meios sequenciais forem utilizados, é importante que a avaliação embrionária seja alinhada com a troca de meio para minimizar o tempo fora da incubadora.

Os fabricantes de meios fornecem as recomendações da forma correta de armazenamento e transporte, que devem ser seguidas para evitar, por exemplo, alterações de pH, osmolaridade, degradação e oxidação dos componentes dos meios: devem ser armazenados sob refrigeração (2°C a 8°C) e protegidos da luz, especialmente solar, de acordo com instruções do fabricante, e devem ser usados na sequência dos lotes, não sendo aconselhado o uso após a data de vencimento. Os frascos de meios não devem ser abertos, fechados e reabertos para uso posterior, sendo aconselhável dividir o meio em alíquotas menores logo na primeira abertura. Se o meio congelar por algum motivo, deve ser descartado, mas baixas temperaturas não parecem ter efeito sobre o óleo mineral.

Temperaturas ligeiramente elevadas (entre a temperatura de refrigeração e a temperatura ambiente) parecem não ser prejudiciais à integridade dos meios. Altas temperaturas podem causar oxidação e diminuição da concentração de componentes ativos, ou liberação de íons de amônio, que têm efeito negativo (potencializado em meios suplementados com proteína ou com glutamina em forma que não seja dipeptídeo) no desenvolvimento embrionário.

Os meios de criopreservação são tamponados, mantendo pH estável durante todo o processo, quando realizado em cabines de fluxo laminar, à temperatura ambiente, seguindo o protocolo de cada fabricante. A vitrificação e desvitrificação apresentam etapas cruciais no seu protocolo, quando os óvulos ou embriões ficam mais suscetíveis à temperatura: o momento em que são retirados da incubadora e passados para a solução de equilíbrio e o momento do aquecimento no descongelamento.

"A vitrificação e desvitrificação apresentam etapas cruciais"

Manuseio de gametas e embriões

A avaliação oocitária é um pouco subjetiva, devido ao aspecto do complexo *cumulus*-oócito (CCO), em alguns casos, ser discordante da maturação oocitária. Recomenda-se o corte de CCO com sangue ou coágulos, pois isso poderia afetar o desenvolvimento embrionário. No processo de denudação, deve-se minimizar o estresse mecânico causado pelo processo de remoção das células, assim como atentar para que o diâmetro da pipeta seja o apropriado. Na ICSI, a remoção do *cumulus* é de fundamental importância para verificar a presença ou não de corpúsculo polar, porém a exposição prolongada à hialuronidase poderia afetar os oócitos, apesar das poucas informações sobre o assunto.

Deve-se esperar pelo menos 2 horas para realizar a denução, pois evidências sugerem melhores resultados de maturação, taxa de fertilização e qualidade do embrião.

"A avaliação oocitária é subjetiva"

Quanto ao sêmen, o objetivo básico da capacitação espermática é remover o plasma seminal e selecionar os espermatozoides móveis, considerando que a exposição dos espermatozoides ao plasma por mais de 30 minutos após ejaculação pode diminuir seu potencial de fertilização. As variáveis passíveis de controle na capacitação são a escolha do método, o tipo de meio e a temperatura: atualmente, são utilizados o *swim-up*, microfluidos e o gradiente de densidade; pode-se utilizar um tampão no preparo, que permite controlar o pH. Para uma avaliação seminal adequada e com protocolos padronizados, devemos avaliar sempre o volume, a concentração, a motilidade e a morfologia, garantindo o controle da temperatura.

A ICSI pode apresentar melhores resultados quando reduzimos o número de oócitos por placa no momento da injeção. Quanto menor o tempo de manipulação dos oócitos fora da incubadora, mesmo em meio tamponado, menor o descenso da temperatura. Um perfeito alinhamento no sistema de micromanipulação com temperatura controlada e estável é fundamental para incrementar o resultado.

Existem muitos esquemas publicados sobre avaliação e classificação de gametas e embriões, porém ainda não existe uma padronização e cada laboratório adota aquele que melhor se adapta à sua rotina. A recomendação ao avaliar embriões em estágio de clivagem inclui número de células, tamanho e simetria, porcentagem de fragmentação, granulidade do citoplasma, presença ou não de vacúolos e multinucleação. Para o estágio de blastocisto, incluem o grau da expansão (tamanho da cavidade da blastocele) e a morfologia da massa celular interna e do trofoectoderma. A classificação de blastocistos mais utilizada é a publicada por Gardner e Schoolcraft.

A avaliação embrionária tem o objetivo de selecionar o embrião com maior potencial de implantação e o momento e a frequência das observações podem ser feitos conforme recomendado nos Consensos de Viena e de Istambul (2017, 2011). Atualmente, graças à tecnologia do *time-lapse*, é possível realizar um monitoramento completo e em tempo real, sem necessidade de remover embriões das incubadoras até o momento da transferência. Com o uso dessa tecnologia, avaliamos a morfologia e parâmetros como os tempos de divisão, permitindo resultados mais consistentes e possivelmente melhores.

Como alguns laboratórios não contam com esse sistema de monitoramento, avaliar a qualidade embrionária exige a remoção do embrião do ambiente otimizado e estável da incubadora.

Manipulação de gametas e embriões fora da incubadora requer uma atenção especial para evitar um estresse. A exposição à pressão do CO₂ ambiente deve ser controlada e minimizada a fim de evitar mudanças significativas do pH do meio.

Transferência embrionária

Atualmente, a tendência é a transferência em estágio de blastocisto, por oferecer melhor avaliação do desenvolvimento embrionário, incluindo aspectos morfológicos, metabólicos e uma melhor sincronia entre o embrião e o endométrio. Além disso, apresenta taxas de implantação superiores à transferência em estágio de clivagem. Também seria aconselhável a transferência em ciclo subsequente, de embriões descongelados, pois as altas concentrações de estrogênio e progesterona poderiam ser prejudiciais, produzindo um ambiente desfavorável à implantação.



Projeto de engenharia e qualidade do ar

Precisamos prestar atenção ao projeto do laboratório, aos materiais utilizados na construção, às escolhas das incubadoras, das estações de trabalho, do gás de suprimento, além de outros elementos como acabamento das instalações, produtos de limpeza, os COV liberados por equipamentos e produtos utilizados no laboratório - inclusive equipamentos novos - e contaminantes como cosméticos utilizados no cabelo, na pele e de higienização (Consenso de Cairo, 2018).

Outro ponto de destaque é a importância da proximidade entre as estações de ICSI, as incubadoras e as cabines de fluxo laminar, que tem como objetivo manter o mínimo de variações para um cultivo estável em cada etapa do desenvolvimento embrionário.

Controle de qualidade

É recomendado que as variáveis críticas apresentadas anteriormente, como temperatura, CO₂ e O₂, sejam medidas diariamente, com medições de pH feitas pelo menos a cada mudança de lote. Esses controles devem ser estabelecidos junto com os pontos de ajustes e os valores de tolerâncias ideais.

Um correto monitoramento (diário) das geladeiras, freezers e incubadoras são essenciais e solicitados pelos órgãos fiscalizadores.

Esses equipamentos devem possuir um sistema de alarmes e sensores, capazes de alertar em caso de algum efeito inesperado, mau funcionamento ou até mesmo uma falha do equipamento, assim como *no-breaks* e gerador.

Todos os laboratórios devem adotar medidas para verificar cada processo. Todas as etapas devem ser documentadas em protocolos estabelecidos e validados, possibilitando rastreabilidade dos materiais, certificados de análise, lote e validade, tudo de acordo com a regulamentação vigente do órgão fiscalizador (no Brasil, a Agência de Vigilância Sanitária - ANVISA). Os protocolos devem ser revalidados sempre que houver mudança.

Os indicadores chaves de desempenho (KPIs) são considerados essenciais para avaliar a técnica, estabelecer padrões mínimos de proficiência e monitorar o desempenho contínuo, fornecendo uma visão geral das etapas mais importantes no laboratório de FIV (Consenso de Viena, 2017). Ao analisar os resultados do desempenho do laboratório com KPIs, podemos descobrir alguma variação que afetou negativamente o cultivo.

A frequência de como coletamos os dados deve ser estabelecida com base na experiência da própria clínica com relação ao número de ciclos. O ideal é que seja feito mensalmente, mas pode ser feito

com intervalos mais longos ou de acordo com um número predeterminado de casos (Consenso de Viena, 2017).

"Os indicadores chaves de desempenho (KPIs) são considerados essenciais para avaliar a técnica, estabelecer padrões mínimos de proficiência e monitorar o desempenho contínuo"

Também se faz necessário monitorar os resultados de cada incubadora, como a taxa de formação de blastocistos e de gravidez.

Considerações gerais

Um ponto importante são as fontes de luzes presentes nos laboratórios que podem afetar gametas e embriões, e apresentar efeito prejudicial em outros componentes, como os meios e o óleo. O uso de filtros nos microscópios poderia bloquear raios ultravioletas.

Uma forma de manter as condições ideais fora da incubadora é trabalhar com as cabines de ambiente controlado, que funcionam como mini incubadoras, mantendo controlados os parâmetros internos de temperatura, umidade, CO₂, filtragem HEPA controlados e até remoção de COV.

O laboratório ideal

Ana Paula Aguiar

Como visto, as principais condições para cultivo embrionário seriam*:

- Meio de cultivo completo, essencialmente contendo aminoácidos comuns, carboidratos (piruvato, lactato e glicose), cálcio e magnésio;
- Atenção a todos os fatores laboratoriais e clínicos;
- Baixa tensão de O₂ no laboratório;
- Poucos ou nenhum VOC no ambiente;
- Cultivo até o estágio de blastocisto - em clínicas onde essa rotina não esteja estabelecida, deve haver um foco para sua implementação/melhora nas condições de cultivo;
- Estratégia *freeze-all* (vitrificação dos blastocistos) para posterior transferência de embrião único e, quando a análise genética for possível, euploide.

TUDO é importante no laboratório de FIV.

Por isso, é importante que cada etapa seja bem conhecida e controlada, garantindo o desempenho do laboratório dentro de limites predefinidos. O monitoramento de todos os parâmetros críticos é obrigatório e importante para otimizar as condições de cultivo e reduzir o estresse ambiental, com o único objetivo de não prejudicar o desenvolvimento embrionário e, conseqüentemente, não afetar de forma negativa os resultados.

No Brasil, seguimos as exigências da ANVISA (órgão regulador e fiscalizador) através do regulamento técnico para o funcionamento dos Bancos de Células e Tecidos Germinativos (RDC N°23 de 27 de maio de 2011) e, atualmente em tempos de pandemia da Covid-19, o manual de biossegurança da Pronúcleo está sendo de grande utilidade nos laboratórios. ■



**Nota: as recomendações não refletem necessariamente a opinião da autora, e sim apenas o disposto no artigo apresentado para comentário nesta seção.*

Sobre a Importância da Gestão de Qualidade e Análise de Risco nas Clínicas de Reprodução Assistida (BCTGs - Bancos de Células e Tecidos Germinativos)

Texto por Raquel Alvarenga, Jaqueline Verceze e Fernando Guimarães

Gestão de qualidade e de risco em Reprodução Assistida

A Reprodução Assistida (RA) começou como um procedimento experimental e no final dos anos 70 culminou no nascimento de Louise Brown, em 1978; evoluiu rapidamente nas últimas décadas para um campo em rápida expansão de pesquisa e prática clínica, que varreu o mundo na década de 1980 e se consolidou como um serviço clínico de rotina na década de 1990. Como resultado desta expansão global e comercialização, a gestão da qualidade e a gestão de risco tornaram-se cada vez mais importantes para os responsáveis pela operação de clínicas de RA e, conseqüentemente, para os profissionais que nelas trabalham.

A dinâmica das atividades assistenciais desenvolvidas nas clínicas de RA (BCTG – Banco de Células e Tecidos Germinativos) e a natureza dos controles que envolvem pessoas e tecnologias explicam a possibilidade de variações nos níveis de riscos, exigindo mecanismos de alta vigilância por parte dos próprios serviços em seus sistemas de garantia de qualidade, auditorias internas e externas, além da intensificação de ações de monitoramento exercido pela vigilância sanitária.

Existe um equívoco comum de que a única responsabilidade do laboratório de um BCTG é realizar procedimentos de laboratório. Na verdade, os operadores dos processos de um tratamento da Fertilização *in vitro* (FIV) (embriologistas, médicos e enfermeiros) realizam atividades além do âmbito dos procedimentos tecnológicos de RA.

Essas atividades incluem reunião entre médico e equipe sobre o plano de tratamento do paciente para garantir que os procedimentos apropriados sejam solicitados, que a documentação necessária esteja disponível e registrada, e a identificação dos espécimes e dos pacientes seja adequada.

" A gestão da qualidade e a gestão de risco tornaram-se cada vez mais importantes"

Deve-se notar que um programa de controle de qualidade (CQ) trata cada elemento monitorado como uma unidade independente e não tenta medir as atividades do laboratório de FIV como um todo.

Importância da gestão de qualidade

Raquel Alvarenga, Jaqueline Verceze e Fernando Guimarães

A garantia de qualidade (GQ = QA – *Quality Assurance*) é um programa de monitoramento e avaliação de componentes, que em um laboratório de FIV inclui: atividades de CQ, um manual abrangente de procedimentos escritos (PMV - Plano Mestre de Validação), atividades educacionais contínuas, um programa de avaliação de funcionários, um programa de segurança para a proteção de pessoal de laboratório e pacientes, e um programa externo de proficiência.

Os indicadores-chave (KPIs – Key Performance Indicators) usados em um plano de TQI (*Total Quality Improvement* - Melhoria Total da Qualidade) devem ser objetivos, relevantes para o laboratório e medir uma ampla gama de eventos específicos ou aspectos do tratamento que reflitam a qualidade do atendimento.

A Validação dos Processos (Alvarenga, Zuculo e Guimarães, 2018) em um BCTG passa a ser obrigatória a partir da RDC N° 23 da ANVISA.

Regulamentações

O Brasil não possui leis que regem a RA e, por essa razão, as resoluções do Conselho Federal de Medicina (CFM) preenchem essa lacuna legal. A regulamentação nacional desta prática se dá pela deontologia médica desde 1992, com a primeira Resolução sobre normas éticas para utilização das técnicas de RA (CFM n° 1.358/1992). O CFM é eminentemente uma

autarquia federal de fiscalização ética das práticas médicas. A última Resolução do CFM (n° 2.168/2017) revoga as anteriores, estando em vigor até a presente data.

"A regulamentação nacional da Reprodução Assistida se dá pela deontologia médica desde 1992"

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) determina, também através de resoluções, as diretivas para o funcionamento dos BCTGs e da doação de gametas. Estas regulamentações visam, principalmente, ao controle sanitário nestes centros.

A RDC N° 23, DE 27 DE MAIO DE 2011 (Brasil, 2011), que revoga a RDC 33/2006, dispõe sobre o regulamento técnico para o funcionamento dos BCTGs, além de outras providências, e encontra-se em vigor, com alguns artigos tendo sido alterados pela RDC N° 72, DE 30 DE MARÇO DE 2016 (Brasil, 2016).

A RDC N° 36, DE 25 DE JULHO DE 2013 institui ações para a segurança do paciente em serviços de saúde, entre elas a gestão de risco: aplicação sistêmica e contínua de políticas, procedimentos, condutas e recursos na identificação, análise, avaliação, comunicação e controle

Importância da gestão de qualidade

Raquel Alvarenga, Jaqueline Verceze e Fernando Guimarães

de riscos e eventos adversos que afetam a segurança, a saúde humana, a integridade profissional, o meio ambiente e a imagem institucional. Esta RDC também determina a obrigatoriedade da implementação do núcleo de segurança do paciente (NSP), instância do serviço de saúde criada para promover e apoiar a implementação de ações voltadas à segurança do paciente (Brasil, 2013).

Risco sanitário nas clínicas de RA do Brasil

Mais de 40.000 ciclos de tratamento de fertilização *in vitro* são realizados a cada ano no Brasil (Sisembrio, 2019). Embora os erros sejam raros, suas consequências são devastadoras para as famílias envolvidas e também para os profissionais das clínicas, originando geralmente demandas na justiça por indenização e reconhecimento de paternidade.

Existe uma relação entre o tamanho da clínica e a taxa de incidência de eventos adversos: clínicas maiores tendem a relatar mais incidentes. Isso poderia ser esperado, afinal, quanto mais tratamentos as clínicas fornecerem, maiores serão as chances de algo dar errado (HEFA, 2018).

Os incidentes clínicos são a maior categoria de eventos adversos, correspondendo a 40% do total - o principal sendo a Síndrome do Hiperestímulo Ovariano.

O segundo tipo mais comum de incidentes são aqueles categorizados como administrativos, representando 27% de todos os incidentes em 2017/2018 no Reino Unido. Erros administrativos relativos ao armazenamento de amostras congeladas são os mais propensos a resultar em não conformidades (HFEA, 2018).

"Existe uma relação entre o tamanho da clínica e a taxa de incidência de eventos adversos"

Uma avaliação dos BCTGs brasileiros mostrou que a maioria apresenta baixo índice de risco sanitário relacionado à execução de serviços. De acordo com a ANVISA, 81 dos 88 (92%) estabelecimentos analisados em 2017 e 2018 foram classificados como de "baixo risco" ou "médio baixo risco" potencial. Isso significa que as unidades investigadas cumpriam normas sanitárias que garantiam a qualidade e a segurança dos procedimentos executados.

Riscos na pandemia

A pandemia apresenta às clínicas de RHA e a seus pacientes uma série de desafios. Conhece-se pouco sobre os efeitos da pandemia da COVID-19 na

Importância da gestão de qualidade

Raquel Alvarenga, Jaqueline Verceze e Fernando Guimarães

fertilidade, nos tratamentos de RHA e na gestação. De acordo com os estudos iniciais da atuação do coronavírus na maternidade, este vírus parece não causar grande impacto nas gestantes e nos seus bebês, mas precisamos agir com cautela, pois o número de casos de pacientes contaminados disponíveis para a pesquisa ainda é limitado (Pronúcleo, 2020).

"A implementação de um programa de Biossegurança é fortemente recomendada"

Embora nenhum programa de segurança possa garantir uma proteção completa contra exposição acidental ao coronavírus pelos profissionais de saúde e de atendimento nos BCTGs, a implementação de um programa de Biossegurança é fortemente recomendada, pois fornece aos funcionários e colaboradores confiança para realizarem seu trabalho.

O empregador deve fazer todo o possível para minimizar os riscos à saúde de seus funcionários, desenvolvendo protocolos, fornecendo treinamentos, EPIs e produtos adequados para limpeza e desinfecção em geral.

A obrigatoriedade de manter documentada toda e qualquer decisão, sendo respeitada a relação médico-paciente, é uma forma de identificar a ciência dos pacientes, inclusive com a assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido específico para informar os riscos inerentes da doença, que não são eximidos mesmo com os cuidados adotados.

A prioridade adotada nesse período de contaminação é direcionada a pacientes que podem ter na postergação da gestação um risco de danos irreparáveis à capacidade reprodutiva, como idade avançada, pacientes oncológicos e de baixa reserva ovariana (Redlara *et al.*, 2020).

"O empregador deve fazer todo o possível para minimizar os riscos à saúde de seus funcionários"

Considerações finais

A Reprodução Assistida evoluiu rapidamente nas últimas décadas. A área cresceu de forma acelerada em pesquisa e prática clínica e se consolidou na década

Importância da gestão de qualidade

Raquel Alvarenga, Jaqueline Verceze e Fernando Guimarães

de 1990. A dinâmica das atividades assistenciais desenvolvidas nos BCTGs e a natureza dos procedimentos realizados exigem mecanismos de alta vigilância por parte dos próprios serviços, em seus sistemas de gestão de qualidade e nas auditorias externas e internas, além da intensificação de ações de monitoramento exercido pela vigilância sanitária.

A gestão da qualidade e dos riscos são requisitos imprescindíveis para o fornecimento de um tratamento de Reprodução Assistida seguro e eficaz, dentro dos melhores padrões de serviços técnicos e assistência médica, aumentando a organização e eficiência do serviço e minimizando a chance de erros, sobretudo em situações como a atual pandemia. ■





COOK
MEDICAL

**CONHEÇA A INCUBADORA
QUE CONQUISTOU**

**TUDO
O BRASIL**

ALÉM DA MAIS ALTA QUALIDADE
COOK MEDICAL, CONTE COM O
SUPORTE HANDLE PARA ALCANÇAR
OS MELHORES RESULTADOS COM A MINC!

ASSISTÊNCIA TÉCNICA À DISPOSIÇÃO DE SUA CLÍNICA:

Para atender o nosso parque de equipamentos, contamos com uma equipe técnica especializada, composta por engenheiros treinados pelo fabricante. Essa equipe realiza visitas frequentes aos clientes para a realização de testes, instalações, manutenções preventivas e corretivas, e treinamentos. Em casos urgentes, eles também fazem atendimento remoto. Através de softwares patenteados, realizamos testes que coletam o histórico de parâmetro da Minc, e assim é possível obter informações de performance e funcionamento. Além disso, a fabricante Cook Medical fornece os protocolos para realização de todo serviço, laudos de qualidade e certificação, conforme exigências dos órgãos sanitários.

SUPORTE DE BACK-UP:

Caso seja necessário uma manutenção mais complexa, disponibilizamos um equipamento reserva para a sua clínica continuar atendendo suas demandas até que a sua MINC esteja pronta.

CONSULTORIA DE PERFORMANCE:

Contamos com uma bióloga, especialista no equipamento e em reprodução humana, para auxiliar nossos clientes a melhorar o desempenho de seus laboratórios e otimizar a experiência com a MINC.

35
ANOS

Handle

FERTILIDADE

VEJA O QUE NOSSOS CLIENTES TÊM A DIZER SOBRE A EXPERIÊNCIA DE TRABALHAR COM A MINC:

“

Para um trabalho de boa qualidade é primordial a escolha dos equipamentos utilizados no laboratório, assim como, da empresa que vende os mesmos. **Nas MINCs, conseguimos blastocistos de excelente qualidade**, o que mostra serem elas o ambiente adequado para o cultivo dos embriões. **Compacta, umedecida, com base e câmara aquecidas, recuperação rápida de temperatura e pH, dentre outras vantagens, começamos com uma e já estamos com 13 e querendo mais.** Quanto a empresa, falar da Handle fica simples. **Sempre prontos a atender em qualquer circunstância, (o que é essencial quando se tem aparelhos de tamanha importância), fica fácil confiar em quem trabalha com ética, compromisso e dedicação.**

FRANÇOISE ELIA MIZRAHI
Projeto Alfa



Utilizamos as Incubadoras de Bancada MINC por acreditarmos nos benefícios para o cultivo embrionário, o que têm refletido satisfatoriamente na qualidade dos embriões e nos resultados.

Por possuir um compartimento pequeno, é mais fácil manter um ambiente térmico estável. E por conta do rigoroso controle a proporção dos gases injetados, o pH dos meios se mantém estável sem oscilações importantes, o que **confere um ambiente mais seguro e favorável para o desenvolvimento embrionário.** Além disso, é um equipamento de fácil limpeza e que garante o controle de qualidade por possuir registros diários dos parâmetros. **E a Handle oferece manutenção e atendimento de excelência.**

DANIELE FREITAS
Diretora de Laboratório FIV
Clínica IVI Salvador



As MINCS tem coração de mãe, sempre cabe mais uma plaquinha. **Fácil de usar, fácil de manter, fácil para encaixar na nossa rotina e em espaços pequenos. Assistência técnica ao alcance das nossas necessidades e os resultados nem se fala! Pergunte ao Rafa!!!!**

”

PHILIP WOLF
E RAFAEL PORTELA
Genics Medicina Reprodutiva
e Genômica



VISITE NOSSO SITE!
LÁ VOCÊ TEM ACESSO A PUBLICAÇÕES
CIENTÍFICAS E TODOS OS DIFERENCIAIS DA MINC.

HANDLE.COM.BR



Falando em Andrologia...



Capacitação e seleção espermática

Principais métodos

Por



LETÍCIA ARRUDA

As técnicas de processamento seminal visam selecionar de forma artificial os melhores espermatozoides para serem utilizados em laboratório, de acordo com sua morfologia, motilidade e a integridade do DNA e da membrana. Além disso, a amostra deve ser livre de plasma seminal, debris, espermatozoides imóveis, leucócitos, células imaturas e outras substâncias que podem afetar a sua viabilidade. Entretanto, embora esses parâmetros sejam amplamente descritos na literatura, ainda não somos capazes de prever exatamente qual espermatozoide apresenta a capacidade de fertilizar um oócito.

O ejaculado é composto por milhões de espermatozoides que, em um coito

natural, são depositados na vagina, mas somente alguns serão capazes de vencer os rigorosos mecanismos de seleção natural existentes no trato reprodutivo feminino e chegar ao local da fecundação (William *et al.*, 1992; Sakkas *et al.*, 2015).

Assim que os espermatozoides saem do plasma seminal e passam pelo muco cervical, sofrem uma série de modificações fisiológicas e bioquímicas que vão torná-los capazes de fecundar o oócito (capacitação espermática) (Yanagimachi, 1994). Após a capacitação, os espermatozoides continuam pela cavidade uterina até a junção útero-tubária. Embora não se tenham muitas informações sobre este ambiente, alguns estudos em animais sugerem que há necessidade da expressão de uma ou mais proteínas específicas para que o espermatozoide consiga atravessar esta estreita passagem (Nakanishi *et al.*, 2004), além de morfologia e motilidade adequadas. Além disso, tem sido sugerido que a interação entre o ambiente tubário e o espermatozoide provavelmente esteja envolvida na seleção espermática final (Sakkas *et al.*, 2015).

As metodologias de seleção espermática para as técnicas de reprodução assistida foram desenvolvidas com o objetivo de mimetizar esses mecanismos naturais de seleção e capacitação, apresentando distinções em relação ao princípio utilizado, resultado final, indicações, dificuldade para execução e principalmente custo/benefício.

"As técnicas de processamento seminal visam selecionar os melhores espermatozoides"

***Swim-up* e Gradiente descontínuo de densidade**

As técnicas mais utilizadas na rotina para selecionar espermatozoides utilizam a motilidade espermática como princípio de seleção (Comhaire *et al.*, 1988; Horvath *et al.*, 1989), como é o caso do *swim-up* e gradiente descontínuo de densidade. Embora a motilidade seja essencial para o sucesso da Fertilização *in vitro* (FIV) clássica e da Inseminação intrauterina (IIU), nem todos os espermatozoides móveis têm capacidade fecundante (Jeyendran *et al.*, 2019), como é observado nos casos de ausência de acrossoma (Jeyendran *et al.*, 1983), sendo esta uma possível limitação destas técnicas.

Para o *swim-up* (ou migração ascendente), o sêmen é depositado no fundo de um tubo cônico com meio tamponado. Os espermatozoides com melhor motilidade migram naturalmente contra a gravidade, deixando para trás todos os elementos inertes do ejaculado. Após um período de incubação, uma alíquota do sobrenadante com os espermatozoides é retirada e esta é a amostra que será utilizada.

O gradiente descontínuo de densidade (GD), por outro lado, se baseia na seleção dos espermatozoides de acordo com seu tamanho e diferença de densidade, além da motilidade (Takeshima *et al.*, 2017). Para tanto, são utilizadas colunas contendo partículas de sílica com densidades diferentes (normalmente uma de 45% e outra de 90%) e a amostra seminal é depositada na parte superior do tubo. Este tubo é centrifugado, de forma que os leucócitos e *debris* celulares são retidos na interface entre o plasma seminal e a coluna superior; já os espermatozoides com morfologia alterada ficam na interface entre a coluna superior e a inferior, e os espermatozoides móveis e maduros, devido à densidade maior, formam o *pellet* no fundo do tubo (Malvezzi *et al.*, 2014). Embora esta técnica recupere uma alta quantidade de espermatozoides móveis, ela não é indicada em casos de oligozoospermia severa, amostras com alta viscosidade e com alta quantidade de *debris* celulares (Jeyendran *et al.*, 2019).

As metodologias de seleção espermática para as técnicas de reprodução assistida foram desenvolvidas com o objetivo de mimetizar esses mecanismos naturais de seleção e capacitação, apresentando distinções em relação ao princípio utilizado, resultado final, indicações, dificuldade para execução e principalmente custo/benefício.

Swim-up e Gradiente descontínuo de densidade

As técnicas mais utilizadas na rotina para selecionar espermatozoides utilizam a motilidade espermática como princípio de seleção (Comhaire *et al.*, 1988; Horvath *et al.*, 1989), como é o caso do *swim-up* e gradiente descontínuo de densidade. Embora a motilidade seja essencial para o sucesso da Fertilização *in vitro* (FIV) clássica e da Inseminação intrauterina (IIU), nem todos os espermatozoides móveis têm capacidade fecundante (Jeyendran *et al.*, 2019), como é observado nos casos de ausência de acrossoma (Jeyendran *et al.*, 1983), sendo esta uma possível limitação destas técnicas.

Para o *swim-up* (ou migração ascendente), o sêmen é depositado no fundo de um tubo cônico com meio tamponado. Os espermatozoides com melhor motilidade migram naturalmente contra a gravidade, deixando para trás todos os elementos inertes do ejaculado.

Após um período de incubação, uma alíquota do sobrenadante com os espermatozoides é retirada e esta é a amostra que será utilizada.

"As técnicas de processamento seminal visam selecionar os melhores espermatozoides"

O gradiente descontínuo de densidade (GD), por outro lado, se baseia na seleção dos espermatozoides de acordo com seu tamanho e diferença de densidade, além da motilidade (Takeshima *et al.*, 2017). Para tanto, são utilizadas colunas contendo partículas de sílica com densidades diferentes (normalmente uma de 45% e outra de 90%) e a amostra seminal é depositada na parte superior do tubo. Este tubo é centrifugado, de forma que os leucócitos e *debris* celulares são retidos na interface entre o plasma seminal e a coluna superior; já os espermatozoides com morfologia alterada ficam na interface entre a coluna superior e a inferior, e os espermatozoides móveis e maduros, devido à densidade maior, formam o *pellet* no fundo do tubo (Malvezzi *et al.*, 2014). Embora esta técnica recupere uma alta quantidade de espermatozoides móveis, ela não é indicada em casos de oligozoospermia severa, amostras com alta

viscosidade e com alta quantidade de *debris* celulares (Jeyendran et al., 2019).

Quanto à eficiência de seleção dos métodos acima para redução da taxa de fragmentação de DNA, os resultados do *swim-up* e GD são controversos. Alguns trabalhos mostram que ambos são eficientes em eliminar os espermatozoides com quebras duplas de DNA (Ford, 1990), e apresentam taxas semelhantes de espermatozoides apoptóticos (Jayaraman et al., 2012). Outros mostram que o GD separa os espermatozoides das espécies reativas de oxigênio (Ford, 1990), além de reduzir a taxa de fragmentação de maneira mais efetiva que o *swim-up* (Amiri et al., 2012; Takeshima et al., 2017). Entretanto, o GD necessita de centrifugação, um mecanismo altamente agressivo e não fisiológico, podendo levar a um estresse oxidativo e posteriores danos ao DNA.



O *sperm wash*, ou lavado seminal, é uma técnica de preparo seminal indicada para os casos em que a amostra seminal apresenta uma oligozoospermia severa ou

astenozoospermia, como é frequentemente observada em amostras de espermatozoides obtidos cirurgicamente (PESA/TESA/TESE). Ela consiste em apenas uma lavagem da amostra com meio tamponado através de centrifugação para retirada do sobrenadante contendo fluido e/ou tecido testicular ou epididimal. Desta forma, não há nenhuma seleção dos espermatozoides, e sim a retirada de fatores prejudiciais que estão presentes no sobrenadante.

IMSI

Em casos de oligozoospermia normalmente é realizada a ICSI, na qual os espermatozoides serão selecionados de forma subjetiva pelo embriologista, segundo sua morfologia e motilidade. Com o intuito de melhorar essa seleção morfológica, foi desenvolvida a técnica de IMSI (do inglês *Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection*) ou Super-ICSI, que permite uma magnificação de aproximadamente 6000 vezes o tamanho do espermatozoide. Embora haja evidências na literatura que suportem o seu uso (Berkovitz et al, 2006), uma meta-análise publicada em 2013 não observou benefícios quando essa técnica é utilizada (Teixeira et al., 2013). Além disso, existem diversos fatores que dificultam a sua aplicabilidade, como o custo do equipamento, a difícil execução e o maior tempo de realização (Jeyendran et al., 2019).

PICSI e MACS

A partir do conhecimento dos impactos negativos relacionados à elevada taxa de fragmentação do DNA espermático nos parâmetros reprodutivos, muitos métodos foram desenvolvidos visando selecionar os espermatozoides com DNA íntegro. Dentre eles está a PICSI (do inglês *Physiological Intracytoplasmic Sperm Injection*), uma técnica baseada na seleção espermática de acordo com o grau de maturidade da membrana, que utiliza uma placa preparada com ácido hialurônico na qual os espermatozoides maduros são capazes de se fixar. O ácido hialurônico está presente nas células do *cumulus* que envolvem o oócito e somente os espermatozoides maduros expressam em sua membrana receptores que são necessários para a fertilização natural.

Este método tem se mostrado eficiente em selecionar espermatozoides com morfologia normal, com baixa taxa de fragmentação do DNA e baixa frequência de aneuploidias cromossômicas (Beckfruchter *et al.*, 2016), porém não parece eficaz em aumentar a taxa de fertilização e de gestação, nem apresenta diferença na dinâmica do desenvolvimento embrionário quando comparado com a ICSI convencional, embora um acréscimo na qualidade embrionária tenha sido observado (Romany *et al.*, 2017; Miller *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019).

Outro exemplo é a técnica de seleção espermática de MACS (do inglês Magnetic Activated Cell Sorting), que tem como objetivo eliminar os espermatozoides apoptóticos e assim, selecionar aqueles com menor risco de apresentarem dano de DNA. A amostra é incubada em uma solução contendo microesferas coloidais magnetizadas conjugadas à anexina V que se ligam aos espermatozoides que contêm fosfatidilserina na membrana da superfície externa, um indicador inicial de apoptose celular.

"Somente os espermatozoides maduros expressam receptores (para ácido hialurônico) necessários para a fertilização natural"

Após este processo, a amostra passa por uma coluna magnética de MACS, capaz de reter os espermatozoides com DNA apoptótico, que ficam ligados à anexina, enquanto os espermatozoides não-apoptóticos passam livremente e são selecionados (Rappa *et al.*, 2016; Said & Land, 2011). Não foi observada uma melhora nos parâmetros de ICSI, implantação e aborto (Said & Land, 2011; Romany *et al.*, 2014; Romany *et al.*, 2017) embora um aumento na taxa de gestação foi observado quando esta técnica foi utilizada em comparação ao GD e *swim-up* (Gil *et al.*, 2013).

Teste hiposmótico

O teste hiposmótico (HST- do inglês *hypo-osmotic swelling test*) é uma técnica que leva em consideração a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides, selecionando aqueles que dobram a cauda após serem expostos a uma solução hiposmótica. Isso ocorre devido à expansão celular causada pelo influxo de água que penetra na membrana plasmática intacta, levando ao abaulamento da cauda. A integridade da membrana plasmática é essencial para a motilidade do espermatozoide e para os processos que envolvem a fertilização, como capacitação, reação acrossômica e ligação do espermatozoide com o oócito.

"A integridade da membrana plasmática é essencial"

Amostras com resultados anormais no HTS apresentam maiores taxas de fragmentação do DNA (Vantman *et al.*, 1989; Cincik *et al.*, 2007) e menor taxa de fertilização (Casper *et al.*, 1996; Tartagni, *et al.*, 2002). É uma técnica de seleção indicada para amostras que não tem espermatozoides com motilidade, como no caso da Síndrome de Kartagener. É portanto, um método promissor, barato e de fácil realização, mas são necessários mais estudos para confirmar a sua eficácia na seleção espermática.

Microfluídica

Recentemente, chegou ao Brasil um dispositivo que utiliza o princípio da microfluídica (nome comercial Zymot, porém existem outros dispositivos), que já vem sendo discutido há algum tempo na literatura. Esta técnica se baseia na capacidade dos espermatozoides de migrarem através de microcanais, separando os espermatozoides de acordo com a sua motilidade e morfologia, e evitando os efeitos negativos causados pela centrifugação. Além disso, tem sido demonstrado que a microfluídica é eficiente em selecionar espermatozoides com DNA íntegro, comparada às técnicas usuais como *swim-up* e GD (Smith GD e Takayama, 2017; Quinn *et al.*, 2018).

Quanto aos parâmetros clínicos, Yildiz e Yuksel (2019) observaram um aumento na taxa de fertilização em paciente com histórico de falha de FIV anterior, porém não houve melhora na taxa de gestação em relação ao GD. Segundo Gode e colaboradores (2019), este método aumentou em torno de 3,5 vezes a chance de obter uma gestação por IIU quando comparada ao método do GD. Da mesma forma, outros autores não observaram diferença no que se refere à taxa de fertilização, gestação clínica e nascidos vivos (Yetkinel *et al.*, 2019). Esses resultados, todavia, ainda não são robustos e necessitam de respaldos futuros.

Frente a tantos métodos de seleção espermática disponíveis, estamos caminhando para uma abordagem individualizada com técnicas avançadas de seleção. O embriologista deve escolher a melhor metodologia para seleção espermática, levando em consideração o fator de infertilidade masculina, a qualidade da amostra, a técnica de RA que será utilizada e o resultado final desejado.

**"O embriologista deve
escolher a melhor
metodologia para
seleção espermática"**

Além disso, é preciso desenvolver melhores indicadores de qualidade espermática, tanto para diagnóstico quanto para traçar a melhor estratégia de tratamento e seleção dos espermatozoides e assim aumentar os resultados em laboratório. Com o foco neste cenário, a indústria desenvolve muitas tecnologias, porém é preciso ter cautela para aguardar resultados consistentes, provando segurança e benefício clínico que justifiquem a sua introdução. ■

Falando em Embriologia...



The effect of storage time after vitrification on pregnancy and neonatal outcomes among 24 698 patients following the first embryo transfer cycles

Efeito do tempo de armazenamento pós vitrificação na gravidez e resultados neonatais entre 24.698 pacientes após transferência do primeiro embrião

DOI: <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa136>

Por



BRUMMEL MAGALHÃES

Indiscutivelmente, a criopreservação foi uma das grandes revoluções nos tratamentos de reprodução humana assistida, auxiliando não só na preservação da fertilidade como também no armazenamento de embriões excedentes para a transferência em um ciclo posterior com preparo endometrial exclusivo.

No histórico de evolução das técnicas de congelamento, a vitrificação provou ser uma alternativa mais eficaz do que o seu antepassado - o congelamento lento.

Isso ocorreu não só por ser uma técnica simples e de menor custo, mas também porque apresenta maiores taxas de sobrevivência e melhores resultados clínicos (Loutradi *et al.*, 2008; AbdelHafez *et al.*, 2010; Edgar e Gook, 2012). Assim, o número de embriões vitrificados e os tempos de armazenamento aumentaram substancialmente.

**"A criopreservação
foi uma das
grandes revoluções
nos tratamentos de
reprodução
humana assistida"**

Por outro lado, a técnica de vitrificação nos preocupa em relação aos seus potenciais efeitos tóxicos, por conta das concentrações elevadas de crioprotetores e da contaminação por contato com o nitrogênio líquido (Gosden, 2011).

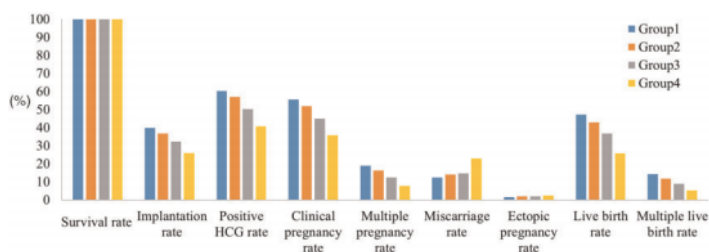
Existem questionamentos sobre a possibilidade de estes fatores afetarem ou não a viabilidade embrionária e o potencial de implantação (Testart *et al.*, 1987; Wirleitner *et al.*, 2013; Cobo *et al.*, 2015; Ueno *et al.*, 2018).

O artigo em questão mostra um estudo de coorte, retrospectivo, envolvendo 24.698 pacientes com fatores conhecidos de infertilidade, como idade materna avançada, síndrome de hiperestímulo ovariano, baixa reserva ovariana, síndrome do ovário policístico, fator tubário e endometriose. As pacientes realizaram congelamento de todos os embriões em seus ciclos e fizeram sua primeira transferência (embriões melhores que 3CC, segundo classificação de Gardner) entre janeiro de 2011 e dezembro de 2017, em um único centro de reprodução (Nong Hospital Popular de Xangai na China). Os grupos foram separados de acordo com o tempo de armazenamento embrionário, e os resultados de taxa de sobrevivência, taxas de implantação, gravidez e neonatais foram comparados entre eles.

- **Grupo 1:** 11.330 pacientes com tempo de armazenamento menor que 3 meses;
- **Grupo 2:** 9.614 pacientes com tempo de armazenamento entre 3 e 6 meses;
- **Grupo 3:** 3.188 pacientes com tempo de armazenamento entre 6 e 12 meses;
- **Grupo 4:** 566 pacientes com tempo de armazenamento entre 12 e 24 meses.

O estudo mostrou que não houve diferença significativa nas taxas de sobrevivência embrionária entre os grupos. Entretanto, as taxas de implantação, β HCG positivo, gravidez clínica, gravidez múltipla, nascidos vivos e múltiplos nascidos vivos diminuíram com o tempo de armazenamento.

A taxa de implantação variou entre 39,84% para períodos de armazenamento menor que 3 meses e 25,88% para períodos entre 12 e 24 meses. As taxas de gravidez clínica e de nascidos vivos também diminuíram com o aumento do tempo de armazenamento. Já a taxa de aborto e a de gravidez ectópica aumentaram conforme o tempo de armazenamento, porém só foi encontrada significância estatística para a taxa de aborto.



Não houve diferença nos resultados neonatais entre os grupos, mesmo ajustando a idade e as causas de infertilidade e considerando a maior incidência de pacientes com idade avançada e/ou e baixa reserva ovariana nos Grupos 3 e 4 em relação aos outros grupos.

■FALANDO EM EMBRIOLOGIA■

O estudo apresentou algumas limitações, como o fato de ser retrospectivo, em um único centro e com fatores como idade materna avançada ou mau prognóstico. Embora tenham reajustado a idade para análise, seu efeito não é linear. O tempo de armazenamento entre um grupo e outro é variável e de no máximo 24 meses. Apesar de ser um período reduzido, temos diferenças significativas entre um grupo e outro, o que nos faz questionar se um período tão curto como 3 meses realmente teria esse impacto nos resultados.

**"Os resultados nos
fazem questionar
se um período tão
curto como 3
meses realmente
teria esse impacto"**

Nada se fala sobre como é o armazenamento e a manutenção dos tambores, bem como o controle de qualidade da sala de criopreservação. Temos também a disparidade entre a amostragem populacional do Grupo 1 e do Grupo 4, por exemplo, que é relativamente alta. Os dados são interessantes, com uma coorte significativa, porém mais estudos são necessários para corroborar se o tempo de armazenamento de fato interfere ou não nos resultados clínicos do tratamento. ■

Falando em Genética...



Epigenética

O que é e qual seu papel na Reprodução Humana Assistida?

Por



RITA FIGUEIRA

Em termos gerais, a Epigenética compreende alterações do perfil de expressão gênica de uma célula sem que alterações na sequência de DNA tenham ocorrido. Dessa forma, a herança epigenética refere-se à transmissão de marcas epigenéticas entre gerações (van Otterdijk & Michels, 2016). Os mecanismos que controlam a herança epigenética incluem a regulação da expressão gênica por RNAs não-codificantes e as modificações da estrutura da cromatina por meio, por exemplo, da metilação, sendo este o mecanismo melhor caracterizado até o presente momento.

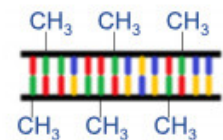
A metilação do DNA é um processo enzimático pelo qual um radical metil (CH_3) estabelece uma ligação covalente a um resíduo de citosina, silenciando a expressão gênica quando presente na região promotora de um gene (Figura 1). Apesar de estável, o padrão de metilação pode ser apagado por meio da desmetilação. Os eventos de metilação e desmetilação do DNA são cruciais para o desenvolvimento embrionário e para a herança epigenética, estando envolvidos em diversos processos, particularmente no início do desenvolvimento, como no *Imprinting* Genômico e na Inativação do Cromossomo X (Smith & Meissner, 2013).

DNA não metilado



Transcrição ativa

DNA metilado



Transcrição inativa

Figura 1: Esquema representativo da metilação de DNA na região promotora de um gene. Adaptado de Lacal & Ventura (2018).

Metilação e Herança Epigenética

A eliminação e a restauração das marcas epigenéticas acontecem em duas etapas (Figura 2). Inicialmente os gametas são completamente desmetilados e são remetilados após a fertilização, apagando as marcas epigenéticas acumuladas pelos indivíduos em sua vida. Após a implantação do blastocisto, as células da massa celular interna (MCI) passam por uma onda de metilação *de novo*, a qual direciona sua diferenciação. Uma nova onda de desmetilação é iniciada no início da gametogênese, ainda durante a migração das células germinativas, sendo o DNA da gametogônia remetilado por meio de uma segunda onda de metilação *de novo* que ocorre após a determinação do sexo (van Otterdijk & Michels, 2016).

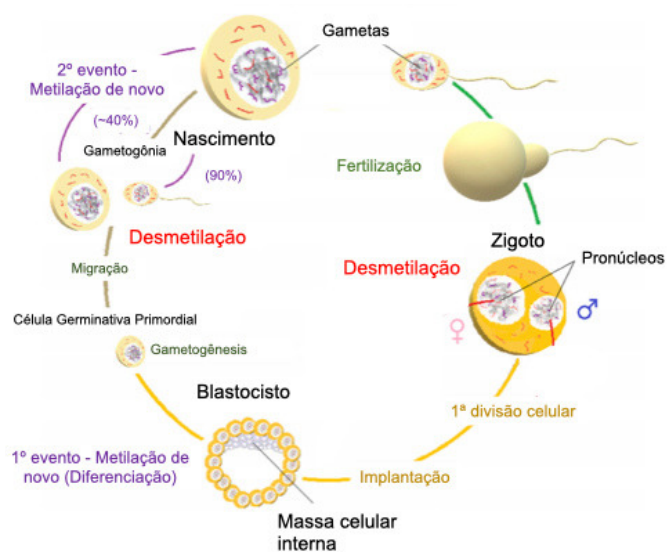


Figura 2: Reprogramação Epigenética durante o desenvolvimento. Adaptado de Lacal & Ventura (2018).

Herança Epigenética e Fertilização *in vitro*

Os principais eventos epigenéticos ocorrem durante o desenvolvimento da célula germinativa e nos estágios pré-implantacionais embrionários, processos que precisamente coincidem com os procedimentos clínicos e laboratoriais relacionados aos tratamentos de Reprodução Assistida. Sendo assim, os tratamentos de Fertilização *in vitro* poderiam alterar a reprogramação dos gametas e embriões (Ventura-Juncá *et al.*, 2015; Mainigi *et al.*, 2016).

De fato, evidências cada vez mais significativas demonstram uma relação entre a hiperestimulação e desordens epigenéticas em oócitos e embriões, associadas com alterações de desenvolvimento global (Osborne-Majnik *et al.*, 2013) e até mesmo com efeitos negativos na capacidade de implantação (Fossum *et al.*, 1989).

Além disso, estudos sugerem que a maturação oocitária *in vitro*, associada à superovulação, apresenta um efeito aditivo à ocorrência de alterações epigenéticas sendo o nível das mesmas diretamente dependentes do tempo e da composição do meio de cultivo (Russell *et al.*, 2006). Observações intrigantes demonstram o efeito dos meios de cultivo na metilação de DNA e no padrão de expressão gênica de embriões mantidos em cultivo (Market-Velker *et al.*, 2010).

Ademais, a exposição de gametas e embriões a uma diversidade de materiais plásticos durante a manipulação e cultivo também pode induzir alterações epigenéticas com efeitos no desenvolvimento (Manikkam *et al.*, 2013).

Com relação aos espermatozoides, o fato de os mesmos praticamente finalizarem os eventos de reprogramação ainda no epidídimo pode reduzir a interferência da manipulação e do cultivo na indução de alterações epigenéticas. Porém, desordens epigenéticas relacionadas à infertilidade por fator masculino foram previamente relatadas (Giacone *et al.*, 2019). De fato, as hipóteses que explicam as causas dos distúrbios genéticos no cenário da Reprodução Humana são controversas, podendo estes estarem associados aos efeitos do tratamento ou à etiologia da infertilidade.

Herança Epigenética na Doação de Gametas

Os efeitos mais pronunciados e duradouros do ambiente no desenvolvimento de uma nova vida estão relacionados ao ambiente propiciado por seus cuidadores (Mousseau & Fox, 1998; Guerrero *et al.*, 2020). Sabemos que o gameta masculino atinge níveis de metilação de 90% ainda antes do nascimento, porém a influência paterna não está limitada ao espermatozoide no conceito da Epigenética. A figura

masculina contribui ativamente durante a gestação como um estímulo que indiretamente influencia o ambiente materno no qual o feto está inserido.

Os hormônios e fatores imunes maternos, e até mesmo nutrientes e odores, podem ser modificados na presença da figura paterna (Todrank *et al.*, 2011). Além disso, no caso da espécie humana, o pai atua como um dos cuidadores da próxima geração, influenciando diretamente no estabelecimento das marcas epigenéticas que se estabelecem logo após o nascimento (Braun & Champagne, 2014).

Diferente do que ocorre com os espermatozoides, os níveis de metilação nos oócitos aumentam progressivamente, ainda após o nascimento, sendo os padrões transmitidos possíveis de serem alterados por meio de experiências diretas ou indiretas, particularmente durante a gestação e imediatamente após o nascimento. Em resumo, o ambiente que a mãe proporciona na gestação e logo após o nascimento afeta não apenas o desenvolvimento do feto mas deixa marcas até mesmo nas próximas gerações (Lacal & Ventura, 2013). Fatores maternos durante a gestação comprovadamente capazes de interferir no desenvolvimento global e até mesmo no neurodesenvolvimento incluem a dieta, hábitos como fumo e alcoolismo,

estresse e doenças como hipertensão e diabetes. Passado o período de gestação, a qualidade do cuidado materno, considerado o primeiro ambiente do recém-nascido, parece ser capaz de predizer o padrão de metilação dos descendentes. Por outro lado, a separação materna precoce, foi associada a alterações no padrão de metilação de genes relacionados à ansiedade (Francis *et al.*, 1999). Dessa forma, fica clara a contribuição, em nível molecular, do pai e da mãe do novo indivíduo, independentemente se o mesmo carrega ou não o material genético de seus cuidadores. De fato, a importância das experiências da gestação e do primeiro período de vida na formação do indivíduo foi reconhecida antes mesmo da descoberta do genoma humano.

Apenas recentemente os mecanismos epigenéticos trouxeram evidências moleculares para as observações comportamentais previamente relatadas. Novas teorias têm sido discutidas e defendem que doenças clinicamente evidenciadas na fase adulta - como aquelas relacionadas à saúde mental - se desenvolvem primariamente nas experiências do primeiro ano de vida do indivíduo e não necessariamente se correlacionam com sua constituição genética (Maccari *et al.*, 2017).

Considerações finais

A Epigenética pode ser considerada a forma mais rápida de transmitir informações favoráveis ou desfavoráveis entre gerações, sendo o ambiente seu principal regulador. Cabe a cada um de nós, como indivíduos e cuidadores, o uso desse regulador como uma potente ferramenta terapêutica. ■

Com a **PALAVRA**

Edson Lo Turco



METABOLÔMICA

A fronteira da ciência em Reprodução Assistida

A tecnologia cresce em ritmo exponencial, especialmente na área da saúde. Na Reprodução Assistida, os principais investimentos têm se concentrado na melhoria de processos do laboratório e em diagnósticos genéticos por sequenciamento de nova geração (NGS). Entretanto, uma nova tecnologia tem crescido nos últimos anos e tem se mostrado promissora no desenvolvimento de diagnósticos mais precisos e de moléculas que produzam ações mais eficazes comparadas às que temos nos dias de hoje: as tecnologias ômicas. Por meio delas e principalmente pela interação entre as moléculas produzidas na cascata genômica, transcriptômica e proteômica, será possível desenvolver novos diagnósticos e condutas médicas mais assertivas, com resultados mais eficazes.

A metabolômica é definida como o estudo dos metabólitos produzidos a partir da reação e dos processos biológicos dentro ou fora de um organismo, e tem contribuído com inúmeras áreas da Reprodução Assistida. Já existem painéis de metabólitos para diagnóstico em Endometriose, Síndrome dos Ovários Policísticos, falência ovariana prematura, gravidez, implantação, qualidade embrionária, entre outros (Cordeiro *et al.*, 2015, 2017 e 2018; Cataldi *et al.*, 2013; Braga *et al.*, 2019; Montani *et al.*, 2019).

Com o avanço da tecnologia em análises moleculares, será possível revolucionar a medicina diagnóstica, no futuro próximo. Um exemplo é a engenharia molecular reversa, que consiste na análise dos resultados da

transcrição do DNA e de moléculas resultantes dos processos enzimáticos para sua produção. Outro exemplo claro de grandes avanços da metabolômica pode ser percebido na área oncológica: hoje já se sabe quais são os painéis de metabólitos para diagnóstico de câncer de mama ou de níveis de resposta à quimioterapia (da Silva *et al.*, 2018).

"Por meio das tecnologias ômicas será possível desenvolver novos diagnósticos e condutas médicas mais assertivas"

Na Reprodução Humana as primeiras áreas a serem beneficiadas com esta tecnologia serão provavelmente as doenças ligadas à infertilidade, tais como endometriose e falência ovariana precoce. Secundariamente, chegará ao laboratório de fertilização *in vitro*, possibilitando indicar o embrião euploide com maior chance de implantação, apenas utilizando o meio de cultivo no qual o embrião foi cultivado, com um acurácia próxima de 100%.

Outro bom exemplo de aplicação da metabolômica é a compreensão dos mecanismos moleculares em processos fisiológicos e patológicos. Nosso grupo, em 2019, começou a desvendar

os processos moleculares do desenvolvimento folicular e oocitário humano e, com isso, observamos grupos de determinados metabólitos associados à saúde oocitária e conseqüentemente embrionária (Cordeiro *et al.*, 2018).

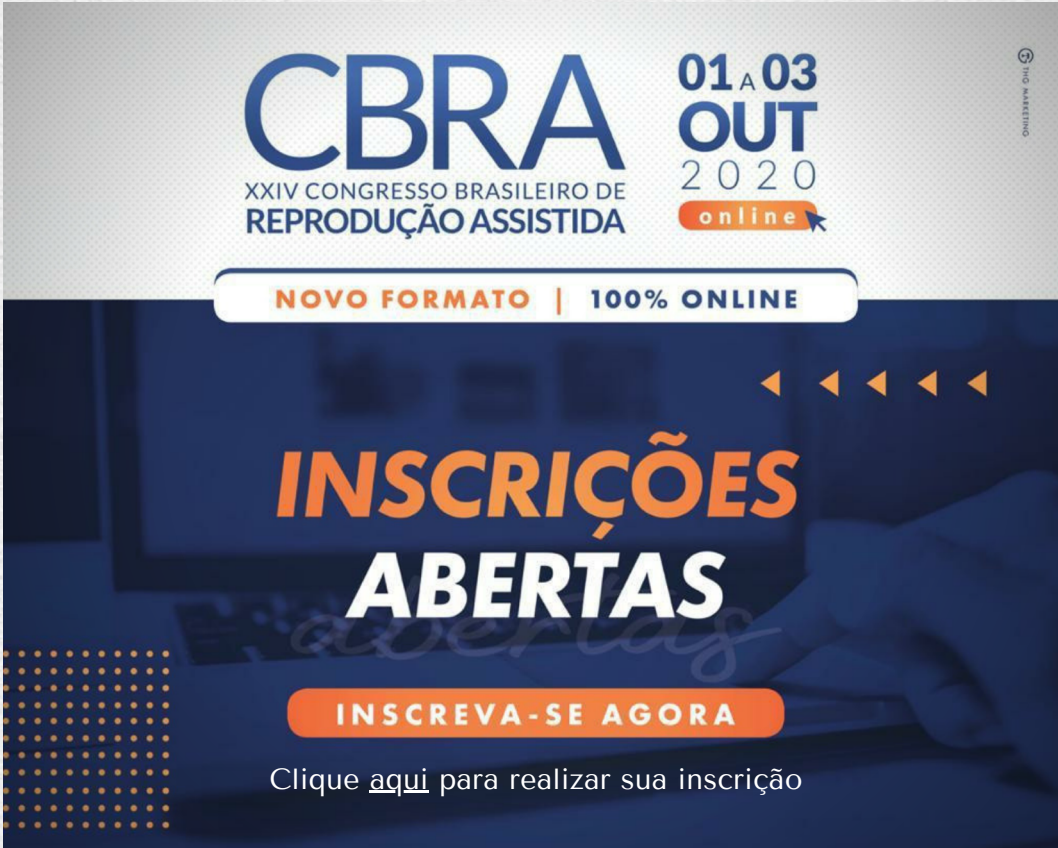
Por meio do entendimento destes mecanismos metabolômicos, a indústria farmacêutica busca por alvos terapêuticos para a produção de novas drogas. Com os avanços das outras ciências ômicas, hoje já se pode determinar com alta exatidão processos biológicos parácrinos e endócrinos através de mapas de interação metabolômicos. Com isso, será possível determinar moléculas com ações mais específicas e mais eficazes no tratamento de diversas doenças. No futuro, poderemos ter drogas mais específicas, com mais segurança e menos efeitos colaterais para estimulação ovariana controlada, novos meios de cultivo mais específicos para o desenvolvimento de embriões mais saudáveis com baixa taxa de aneuploidias, novos medicamentos para regulação da janela implantacional (Montani *et al.*, 2019) e aditivos para o aumento da fertilidade nos homens e mulheres.

"No futuro, poderemos ter novos meios de cultivo para o desenvolvimento de embriões mais saudáveis"

Atualmente, já existem em torno de 10 laboratórios de metabolômica clínica no mundo que estão desenvolvendo diagnósticos em diversas áreas da saúde, inclusive em Reprodução Humana. Na área da Reprodução Assistida, algumas dessas empresas têm trabalhado para determinar painéis metabolômicos para a escolha do melhor embrião a ser transferido, receptividade uterina e euploidia embrionária.

De fato, o nosso conceito de medicina reprodutiva deve mudar nos próximos dez anos. Os embriologistas de hoje estão vivendo em um período de transição e será a geração que terá que se adaptar a grandes mudanças de paradigmas na Reprodução Assistida, especialmente dentro dos laboratórios de fertilização in vitro. Dessa forma, podemos vislumbrar um futuro extremamente promissor para a embriologia clínica e para os casais que buscam o sonho de ter filhos. ■

Fique de olho 



CBRA
XXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE
REPRODUÇÃO ASSISTIDA

**01 A 03
OUT
2020**
online

NOVO FORMATO | 100% ONLINE

**INSCRIÇÕES
ABERTAS**

INSCREVA-SE AGORA

Clique [aqui](#) para realizar sua inscrição

Inscrição gratuita para sócios PRONÚCLEO,
SBRA e REDLARA!

Garanta já a sua!

Nota: Esse ano, o CBRA será exclusivo para sócios PRONÚCLEO, SBRA e REDLARA.
Portanto, não deixe de se associar!

Fique de olho

Webinars e plataforma com acesso liberado:

Cooper Surgical

<https://fertility.coopersurgical.com/global-education-and-webinar-series/>

ESHRE (e-campus)

<https://www.eshre.eu/ecampus>

Igenomix Foundation

<https://igenomixfoundation.com>

IVF meeting

<http://ivfmeeting.com/schedule.html>

IVF-worldwide

<https://webinars.cme-congresses.com>

<https://www.ivfphysicianed.com>

Vitrolife Academy

<https://www.vitrolife.com/academy/educate-yourself/>

De olho no Instagram:

PRONÚCLEO

@pronucleo.com.br

Embriológica - Webséries

@embriologica

Chromosome Medicina Genômica

@chromosome_medicina_genomica

SBRA

@movimentodafertilidade

Nota: devido ao momento pelo qual estamos passando, considerem que alguns eventos podem ser cancelados ou ter sua data alterada.



Associe-se!

Diretoria PRONÚCLEO Biênio 2019-2021

PRESIDENTE

LUIZ MAURO OLIVEIRA GOMES

PRIMEIRO SECRETÁRIO

PHILIP WOLF

PRIMEIRO TESOUREIRO

BERNARDO RODRIGUES DE MOURA

CONSELHO FISCAL - TITULARES

BEATRIZ MATTOS SILVA
JACIRA RIBEIRO CAMPOS
SARAH NACHEF

VICE PRESIDENTE

RENE EDUARDO BUSO

SEGUNDA SECRETÁRIA

ANA CRISTINA ALLEMAND MANCEBO

SEGUNDA TESOUREIRA

ANA LUISA MENEZES CAMPOS

CONSELHO FISCAL - SUPLENTES

ANA CLARA ESTEVES
BRUNA CAMILLO DE BARROS
LIA PONTES MORAIS

Contato PRONÚCLEO: Diana Caroline Bastos
contato@pronucleo.com.br ou (21) 98280-7160 (WhatsApp)

APOIO

Handle