

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

Avaliação dos parâmetros seminais no desenvolvimento embrionário em mulheres submetidas à fertilização *in vitro* com estimulação ovariana.

Alberto da Costa Stein

Orientador: Prof. Walter José Koff – Depto Urologia da UFRGS

Tese de Doutorado

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

Avaliação dos parâmetros seminais no desenvolvimento embrionário em mulheres submetidas à fertilização *in vitro* com estimulação ovariana.

Alberto da Costa Stein

Orientador: Prof. Walter José Koff – Depto Urologia da UFRGS

Tese de Doutorado

2010

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Nilson e Lenice, exemplos de caráter e dedicação, sempre nos ensinando o quanto é importante viver e amar a profissão, sempre seguindo em frente. Ao meu irmão Raphael, ontem e hoje meu melhor amigo.

À Kátia, meu grande amor e maior incentivadora, pelas preciosas horas de convivência, apoio e estímulo, mesmo em um período difícil e maravilhoso da espera nosso filho Alexandre que nasce em breve.

A minha filha Manuela pelas horas roubadas de sua convivência, descritas por ela como “agora não da papai, papai ta estudando,né “.

Aos meus avós paternos *in memorian*, pessoas que vibrariam muito com esta conquista e a minha avó materna que sempre me estimula e fala que “quem corre por gosto não cansa “.

Ao Prof. Walter José Koff, meu orientador, que colaborou muito para minha formação urológica, não tendo palavras para descrever seu apoio.

Em especial, ao Prof. João Sabino Cunha Filho, que além de amigo e colega de trabalho, é um orientador na excelência da palavra, tornando tudo muito simples e fácil. Admirável por me fazer pensar que devo reagir inteligentemente mesmo diante de um tratamento não inteligente. Agradeço pela competência, compreensão e disponibilidade demonstradas durante o estudo, e também pela grande oportunidade de me auxiliar a desenvolver este trabalho. Gostaria de agradecer a sua esposa e colega Dra Luciana Guedes da Luz, e a seus filhos João e Fernanda.

À Dra Daniela Silva, embriologista responsável pelo laboratório do Centro de Reprodução Humana Insemine, pela paciência, dedicação e excelência em qualidade durante a parte desenvolvida em laboratório.

Aos amigos Carlos Souza e Vanessa Genro pelo estímulo e apoio nas horas mais críticas, sendo sempre incansáveis.

Ao grande amigo, Dr Marcelo Binato, pelo estímulo de ensinar e de acreditar que o sucesso está vinculado ao aperfeiçoamento ético, moral e profissional.

Ao amigo Schubert Aguiar Ribeiro, pela sabedoria em mostrar-me que o caminho é longo, porém, pode ser percorrido rápido e facilmente, basta dar-mos o primeiro passo – falando isso da forma mais simples: “Vamos lá”.

Ao Centro de Reprodução Humana Insemine, e toda sua equipe.

Aos Serviços de Urologia e de Ginecologia e Obstetrícia da UFRGS.

Ao Instituto Willkok – Projeto Cegonha e sua equipe.

Ao Dr Osmar de Oliveira e Laboratório Mont Serrat.

Aos professores Fernando Thomé Kreutz, Patrícia El Beitune, Luciano Hammes e Leandro Totti Cavazzola por participarem desta banca em proximidade a datas festivas, a vocês o MEU MUITO OBRIGADO.

À acadêmica Camila, pessoa que contribuiu muito para o resultado final desse trabalho.

A todos os amigos e colegas que me permitiram encontrar tempo e tranquilidade para desenvolver este projeto, em especial Dr Jaime Lutzky.

E, por fim agradeço aos indivíduos que voluntariamente participaram deste estudo, lembrando que um dos princípios da sabedoria médica consiste em saber como aumentar o bem-estar de nossos pacientes.

SUMÁRIO

1- Resumo da Tese.....	5
2- Lista de abreviaturas.....	7
3- Introdução.....	8
4- Revisão da literatura.....	10
4.1 Infertilidade masculina e epidemiologia	10
4.2 Avaliação seminal.....	11
4.3 Parâmetros seminais e desfechos reprodutivos.....	14
4.4 Qualidade embrionária	26
5- Referências bibliográficas.....	31
6- Justificativa.....	36
7- Objetivos.....	36
8- Hipótese Nula.....	36
9- Artigo versão em português: Parâmetros seminais como um fator prognóstico para desenvolvimento embrionário em pacientes submetidos a FIV ou ICSI.....	37
10- Artigo versão em inglês: Seminal parameters as a prognostic factor for embryo development in IVF or ICSI patients.....	50
11- Conclusões.....	64
12- Anexos.....	66
12.1- Rotinas de laboratório e avaliação do embrião	
12.2- Termos de consentimento informado	
12.3- Ficha do laboratório e protocolos de meios de cultura	

1- RESUMO DA TESE

Introdução:

Apesar do grande avanço das técnicas de reprodução humana na área da infertilidade a avaliação do homem ainda carece de maiores conhecimentos. Estima-se que a prevalência de infertilidade seja de 10 a 15% de casais em idade reprodutiva (20-40 anos), com cerca de metade dos casos com algum grau de problema de ordem masculina.

Até o momento a avaliação do homem quanto à fertilidade é, em grande parte, restrita a avaliação das características do sêmen. No entanto, a avaliação seminal não consegue determinar de maneira clara e eficaz a fertilidade masculina. Entretanto até agora nenhum autor havia correlacionado os parâmetros seminais com o escore embrionário (GES) que avalia todo o desenvolvimento embrionário.

Nosso estudo avaliou a relação entre os parâmetros seminais (motilidade, motilidade progressiva e concentração) como fator prognóstico para o desenvolvimento embrionário em mulheres submetidas à fertilização *in vitro* (FIV convencional ou ICSI) com estimulação ovariana. Todos os casais foram avaliados no Centro De Reprodução Humana insemine.

Material e métodos:

Foi realizado um estudo prospectivo (coorte) no Período de janeiro de 2009 até agosto de 2010 com casais inférteis (n=290) que foram submetidos ao primeiro ciclo de Reprodução Assistida. Realizada estimulação ovariana, punção para retirada dos oócitos, FIV convencional ou ICSI conforme o caso, cultura dos embriões. Avaliado os parâmetros seminais (concentração, motilidade e motilidade A+B) pós preparo do sêmen. Avaliado o desenvolvimento embrionário com uso de escore embrionário (GES) proposto por Fisch 2001. Foram avaliados clivagem precoce, escore embrionário total e escore embrionário médio.

Resultados:

Foi demonstrado, após avaliar 290 casais, que sessenta e oito por cento realizaram FIV convencional e 32% ICSI. A média de oócitos recuperados após punção folicular foi de $6,2 \pm 4,6$

com taxa de fertilização de 55% e clivagem de 97%. Analisando os parâmetros seminais após preparo e sua associação com clivagem precoce houve correlação com motilidade ($P=0,006$) e concentração ($P=0,002$). Entretanto não houve correlação com porcentagem de espermatozoides classificados como A+B ($P=0,075$). Em relação aos parâmetros seminais e clivagem precoce no grupo da FIV convencional existe correlação para motilidade ($P=0,028$) e concentração ($P=0,001$) e no grupo da ICSI não foi significativo para nenhum parâmetro. Com relação aos parâmetros seminais e escore embrionário médio, no grupo da FIV convencional existe correlação com a motilidade ($P=0,0001$) e motilidade A+B ($P=0,0001$), no grupo da ICSI apenas com a concentração ($P=0,022$).

Conclusão:

Existe correlação dos parâmetros seminais com a clivagem precoce no grupo da FIV convencional e nenhuma correlação destes parâmetros no grupo da ICSI. Em relação ao escore embrionário médio apresenta correlações tanto na FIV convencional quanto na ICSI.

2. LISTA DE ABREVIATURAS

ALH – Amplitude lateral de Deslocamento

CASA – Programa de Análise Espermática por Computador

CCO – Complexos Cumulus-oócitos

DNA – Ácido desoxirribonucléico

FIV – Fertilização *in vitro* (engloba tanto FIV convencional quanto ICSI)

FIV convencional – Fertilização *in vitro* convencional

GES – Escore Embrionário Graduado

IA – Índice de acrossoma

ICSI – Injeção Intracitoplasmática do Espermatozóide

OMS – Organização Mundial da Saúde

RA – Reprodução Assistida

Rapid – Movimento Rápido do Espermatozóide

ROC – Receiver Operator Characteristic Curve

VCL – Velocidade Curvilínea

VSL – Velocidade em Linha Reta

3 - INTRODUÇÃO

Apesar do grande avanço das técnicas de reprodução humana na área da infertilidade a avaliação do homem ainda carece de maiores conhecimentos. Estima-se que a prevalência de infertilidade seja de 10 a 15% de casais em idade reprodutiva (20-40 anos), com cerca de metade dos casos com algum grau de problema de ordem masculina.

Até o momento a avaliação do homem quanto à fertilidade é, em grande parte, restrita a avaliação das características do sêmen. No entanto, a avaliação seminal não consegue determinar de maneira clara e eficaz a fertilidade masculina. Devido a este fator uma série de exames tem sido estudados com o objetivo de aumentar o conhecimento sobre a fertilidade/subfertilidade masculina. O principal objetivo destes exames é, além de ajudar a entender a funcionalidade espermática, discriminar pacientes férteis de subférteis.

Pesquisadores e clínicos que tratam pacientes subférteis procuram muitas vezes responder se um determinado espermatozóide possui a capacidade de fertilizar um oócito, e o porquê espermatozoides de um determinado paciente não são capazes de fertilizar.

Mais complicado ainda fica quando estudamos oócitos de uma doadora em ciclos induzidos e os fertilizamos com espermatozoides de pessoas diferentes (parâmetros seminais distintos). Estes embriões desenvolvem-se e clivam-se de maneira diferente, alguns conseguindo o desenvolvimento completo e vindo a produzir um embrião com características perfeitas ao passo que outros não passam das primeiras horas.

Este questionamento nos faz perguntar como o fator masculino pode influenciar no desenvolvimento embrionário? Até que ponto os parâmetros seminais amplamente estudados (contagem, velocidade e morfologia) influenciam nestas taxas?

Desta forma, este trabalho procura aprofundar o estudo da infertilidade masculina, principalmente no sentido de correlacionar os parâmetros espermáticos com o desenvolvimento

embrionário, com a finalidade de encontrar parâmetros científicos que possam ser utilizados na prática clínica da avaliação e do tratamento do casal subfértil.

4 – REVISÃO DA LITERATURA

4.1- Infertilidade masculina e epidemiologia

Infertilidade é definida como ausência de gestação após o período de um ano da manutenção de relações sexuais regulares sem o uso de nenhum método anticoncepcional[1]. Estima-se que 10 a 15 % dos casais no mundo sejam inférteis. Nos Estados Unidos e Europa foram realizados 500.000 ciclos de técnicas de reprodução assistida (RA), resultando em 105.000 nascimentos no ano de 2004. O custo estimado de um ciclo de reprodução assistida nos Estados Unidos é estimado em U\$ 12.513,00, sendo o custo mais elevado em comparação com o resto do mundo pelos custos associados do sistema de saúde [2].

Em 2006, foram realizados nos Estados Unidos 138.198 procedimentos de RA, que resultaram em 41343 partos e 54656 crianças [3]. A infertilidade por causa masculina ocorre em cerca 50% dos casais inférteis [4], sendo que em 30% dos casais ocorre uma associação de causas masculinas e femininas [5].

Apesar do grande número de testes da qualidade e função espermática, em um grande número de casos de infertilidade masculina a causa não pode ser adequadamente determinada, sendo definida como idiopática em 30 a 50% das vezes. Na prática clínica atual, a análise seminal padrão, onde os espermatozoides são analisados através de microscopia óptica, é o método mais amplamente utilizado para avaliação inicial do casal infértil. Contudo, a análise convencional do sêmen não é capaz de realizar um diagnóstico definitivo da fertilidade masculina. Os espermatozoides são células altamente especializadas que possuem uma ampla gama de propriedades biológicas a fim de alcançar a fertilização. Somado a este fator pode-se adicionar a subjetividade do exame, além da ampla variabilidade intra e inter observador [6, 7].

A análise convencional do sêmen consiste da mensuração do volume, pH, concentração espermática, motilidade, vitalidade, morfologia e número de leucócitos. Esta análise é utilizada

para determinar se um ou mais parâmetros seminais encontram-se dentro de uma faixa prevista para homens férteis. Como qualquer teste diagnóstico, o ideal é que a faixa da normalidade seja distinta da faixa da anormalidade, ou seja que possa discriminar de maneira adequada os pacientes, sem que haja uma intersecção entre férteis e subférteis. No entanto a análise seminal padrão não consegue este objetivo [8].

No passado, o prognóstico reprodutivo dos pacientes com infertilidade masculina era reservado, no entanto com o advento da Injeção Intracitoplasmática do Espermatozóide(ICSI), introduzida por Palermo et al,1992 houve uma revolução nesta situação [9]. Causas de infertilidade masculina que careciam de opções terapêuticas passaram a dispor de um tratamento que permitiria aos casais terem filhos com seu próprio material genético [10]. Hoje em dia, cerca de 63,4% dos ciclos de fertilização são realizados pela técnica de ICSI conforme dados do Centro de Prevenção e Controle de Doenças (Estados Unidos) [1].

4.2 Avaliação seminal

A análise seminal é amplamente utilizada para avaliação da fertilidade masculina e, na prática clínica, o espermograma continua a ter papel central na avaliação masculina, na grande maioria dos centros que trabalham com reprodução humana [11]. Como um exame de primeira linha, o espermograma, apesar de não sofisticado, é utilizado para determinar se uma amostra seminal encontra-se entre os valores de referência da Organização Mundial da Saúde (OMS) [11]. Atualmente [12] os valores de referência para homens férteis incluem: um volume mínimo de 1,5 ml ou maior; um pH entre 7,2 e 7,8; uma concentração $\geq 15.000.000$ espermatozoides/ml; uma contagem total de espermatozoides de pelo menos 39.000.000 espermatozoides/ejaculado; vitalidade de 58% ou mais; uma motilidade total $\geq 40\%$; motilidade progressiva (A+B) de 32%; morfologia normal $\geq 4\%$ e uma contagem de leucócitos menor do que 1.000.000 células/ml. O critério de morfologia espermática estrito de Kruger 1986 [13] descreve: 1) maior que 14% de formas normais (bom prognóstico), 2) de 4 a 14 % de formas normais (zona intermediária), 3)

menor que 4% de formas normais (prognóstico reservado). A OMS 2010 passou a utilizar a morfologia normal $\geq 4\%$ como valor de referência para homens férteis.

Os parâmetros de referência propostos pela OMS foram uma tentativa de uniformizar os resultados dos espermogramas, melhorar o controle de qualidade inter e intra laboratórios e tentar comparar os resultados entre diferentes serviços.

Na tentativa de uniformizar esta avaliação, a utilização do CASA (programa de análise espermática por computador) poderá diminuir estas variações de subjetividade de leitura manual dos espermogramas, o que ainda permanece sendo uma barreira para estudos e futuras comparações [14].

O baixo poder do espermograma em prever a fertilidade futura foi determinado inicialmente nos anos 1980s [15, 16]. Outros autores, mais recentemente, demonstraram a baixa utilidade dos valores de referência [17-19]. A maior parte desses estudos foram realizados com pequeno número de pacientes, não possuindo adequado poder de avaliação de desfechos como gestação.

No entanto, o maior problema em se utilizar os valores de referência propostos pela OMS é a forma que os mesmos foram calculados e o próprio delineamento proposto. Não existe uma associação com desfechos reprodutivos claros (gestação) e o acompanhamento das populações estudadas deu-se, muitas vezes, de forma retrospectiva [20, 21]. Esses estudos concluem, também, que há uma grande área de intersecção entre homens férteis e inférteis.

Além disso, outro ponto de debate sobre a análise seminal é: Qual parâmetro seminal é melhor para prever a fertilidade? Alguns trabalhos demonstraram que a morfologia seria o melhor parâmetro para avaliação da fertilidade. Estes autores [22, 23] relataram que a percentagem de espermatozóides normais possuiria boa sensibilidade e especificidade no diagnóstico de infertilidade. Entretanto ficou demonstrado [23], que ao avaliar 243 homens férteis (esposas grávidas no momento da análise seminal) alguns possuíam morfologia abaixo dos parâmetros da OMS.

Por outro lado, outros autores concluíram que a concentração espermática e a motilidade seriam melhor discriminadores da população fértil do que a morfologia [19]. Comparando 56 homens de comprovada fertilidade com 406 pacientes em investigação de infertilidade, sendo 166 com infertilidade de causa masculina, demonstraram que a concentração espermática e a motilidade foram mais discriminatórias, com a morfologia tendo o pior valor preditivo. Foi demonstrado que a probabilidade de gestação possui uma correlação positiva com o aumento da concentração até o valor de 40.000.000 espermatozoides/ml, porém, após esse limite, não houve aumento da chance de concepção. No entanto, a motilidade espermática foi de valor limitado para avaliação da fertilidade [24].

Dois fatores podem ser destacados para a variabilidade desses achados:

i) a variabilidade intrínseca dos parâmetros seminais ocupa papel relevante nesta análise. Provavelmente o sêmen é um dos fluidos biológicos mais variáveis; e os parâmetros usualmente avaliados, como concentração, motilidade e morfologia, variam de maneira significativa entre países, regiões, indivíduos e ainda em amostras consecutivas do mesmo indivíduo. Em um estudo [21] foi demonstrado que a qualidade dos espermatozoides de pacientes recrutados na Finlândia, Estônia e Lituânia é superior àquela da Noruega ou Dinamarca. Comparando pacientes de diferentes estados norte-americanos [25], foi concluído que haviam diferenças nas concentrações espermáticas de homens de Nova York em comparação aos de Yowa.

O trabalho clássico da OMS, onde um homem fértil é acompanhado pelo período de 120 semanas demonstrou que a concentração espermática chegou a atingir 170 milhões de espermatozoides/ml, porém em sete ocasiões a concentração foi abaixo do ponto de corte de 20 milhões espermatozoides/ml [8]. Estudando 673 amostras seminais de sete homens por 324 semanas, foi demonstrando intensa variabilidade na concentração espermática, morfologia e motilidade [26].

ii) a carência de poder preditivo da análise espermática descritiva é explicitada pelo grande número de pacientes apresentando o diagnóstico de infertilidade de causa desconhecida [27]. Há dificuldade de avaliar uma amostra seminal dentro de um contexto clínico de infertilidade. A limitação do espermograma como teste diagnóstico de infertilidade é uma realidade e avanços são feitos em várias dimensões a fim de poder aumentar o conhecimento da fertilidade masculina e correlacionar dados teóricos com a prática clínica do dia-a-dia.

O diagnóstico definitivo de infertilidade masculina ou a diminuição na qualidade espermática são muitas vezes difíceis de serem confirmados pela análise básica do sêmen. Apesar de todo o esforço da comunidade científica, muitos estudos que analisam as alterações na qualidade seminal, tem reproduzido conclusões conflitantes principalmente devido às diferentes metodologias, grupos de estudo e controle, a sua origem, forma de alocamento e desfechos. Além disso, os resultados dos estudos apresentam muitos vieses (por ex. critérios de seleção de voluntários) e metodologias diferentes entre os estudos, o que dificulta suas comparações [28].

Na maioria dos centros de reprodução assistida, a avaliação da fertilidade masculina é ainda baseada principalmente na rotina de análise seminal. Entretanto, o papel da análise tradicional do sêmen e parâmetros seminais (incluindo morfologia) como um preditor de potencial de fertilidade masculina em FIV (Fertilização *in vitro*) é um problema em debate contínuo [29-31].

4.3 Parâmetros seminais e desfechos reprodutivos

Um clássico estudo [32], multicêntrico, prospectivo e randomizado, avaliou e comparou os resultados em 415 casais, submetidos a ICSI e FIV convencional e alocados aleatoriamente. Foram excluídos todos os casais onde a causa da infertilidade estava relacionada a fator masculino severo. Foi evidenciado que as taxas de implantação e gestação eram maiores no grupo da FIV convencional comparadas ao grupo da ICSI. Concluindo, que nos casos de infertilidade onde não existe fator masculino severo envolvido, a ICSI não oferece nenhuma

vantagem em termos de resultados clínicos em relação a FIV convencional. Estes resultados suportam a prática corrente, de reservar a ICSI para casos onde o fator masculino severo existe.

Entretanto, aqueles casos de infertilidade inexplicada, casos onde existe o fator masculino porém ele não é severo, bem como os casos de RA que apresentam altas taxas de falência de fertilização, como determinar qual a técnica a ser usada (ICSI ou FIV)? Talvez, o entendimento mais aprofundado dos parâmetros seminais e sua associação com o desenvolvimento embrionário, possam permitir, no futuro, a melhor orientação destes casais na conduta mais adequada a ser utilizada.

Alguns estudos tentam correlacionar os parâmetros seminais a desfechos reprodutivos tais como: taxa de fertilização, formação de blastocisto e gravidez. Entretanto os parâmetros são apresentados de diversas formas e os grupos são heterogêneos, dificultando a comparação entre eles. Outros têm exibido que uma baixa concentração espermática, motilidade e morfologia foram bons preditores de baixas taxas de fertilização após FIV convencional ou ICSI [13, 33, 34]. Alguns falharam em encontrar alguma relação entre baixas taxas de gravidez e morfologia subnormal (usando critérios estritos) na FIV [30, 35]. Entretanto, o valor preditivo da morfologia espermática tem sido controverso. Estudos que utilizaram os critérios restritos de Kruger (1986) [13] incorporados pela OMS,1999 [11] evidenciaram que as taxas de fertilização foram significativamente diminuídas ou falhas em pacientes que tinham menos de 5% de espermatozoides normais [22, 36, 37].

Estudando retrospectivamente o valor preditivo da avaliação seminal em 795 ciclos de fertilização *in vitro* [38], divididos em 2 grupos (gravidez – grupo I comparado com ausência de gravidez – grupo II), alguns autores não observaram diferenças significativas na percentagem de morfologia normal, motilidade, motilidade progressiva, rapidamente progressiva e concentração entre os dois grupos. Contudo, os índices de teratozoospermia e deformidade espermática previamente descritos (OMS, 1999) [11] exibiram diferenças estatísticas significativas entre os grupos. A taxa de fertilização e número de embriões transferidos no grupo I foi significativamente

maior que no grupo II, porém nenhuma diferença estatística significativa na taxa de clivagem e boa qualidade dos embriões foi observada entre os grupos.

Usando a curva ROC (*Receiver Operator Characteristic Curve*) eles determinaram, neste estudo que os parâmetros seminais (concentração, motilidade e morfologia), índices de teratozoospermia e deformidade espermática não foram bons indicadores de gravidez em FIV. Os parâmetros seminais, de acordo com os critérios da OMS, não foram bons preditores na precisão para identificar resultados de FIV [38].

Foi descrito que quando a ICSI é utilizada como técnica de RA, não parece existir correlação entre morfologia espermática e taxas de fertilização ou gravidez [39-43]. Comparando a relação entre os três parâmetros básicos (contagem, motilidade e morfologia) e resultados da ICSI [40], por análise retrospectiva de 966 oócitos microinjetados com sêmen fresco, foi estabelecido que não há importante influência de nenhum destes parâmetros nos resultados da ICSI.

Avaliando 354 casos consecutivos de ICSI e comparando os resultados da ICSI com critérios estritos de morfologia de Kruger (morfologia dividida em três grupos: >14% formas normais – excelente prognóstico, 4 a 14% de formas normais- bom prognóstico e <4% de formas normais – prognóstico reservado), não foi observado nenhuma diferença estatística significativa com relação às taxas de fertilização, gestação ou implantação entre os três grupos. O grupo de prognóstico reservado teve chance igual de obter gestação quando comparado com o de bom prognóstico[41].

A morfologia espermática, no mínimo quando usado critérios estritos, é considerada um importante prognóstico para o resultado de fertilização e gravidez após FIV convencional [13, 44, 45]. Entretanto, tem sido demonstrado que boa fertilização bem como taxas de gravidez podem também ser obtidas, com grupos de pior prognóstico [42, 46].

Em estudo prospectivo realizado em grupo de pacientes (81 casais) submetidos a FIV convencional ou ICSI, os quais apresentavam uma percentagem de morfologia espermática

normal menor que 5% e no mínimo um milhão de espermatozoides progressivos, foi utilizado o índice de acrossoma (IA) na avaliação do sêmen deste grupo de pacientes, tentando avaliar o valor preditivo deste índice para prever para quais pacientes o tratamento com ICSI é necessário para obter uma taxa de fertilização aceitável. Foi descrito que a avaliação do IA não irá prever com acurácia o potencial de fertilização de uma amostra de esperma com pior prognóstico. Entretanto ele demonstrou que uma amostra de esperma com uma morfologia menor que 5% de formas normais e um IA maior que 7% tem uma significativa taxa de fertilização de aproximadamente 70% seguindo a FIV convencional, comparada a uma média de taxa de fertilização de 40% para um IA menor que 7% [47].

Tem sido proposto que a presença de acrossomas morfologicamente normais é de mais importância para a interação espermatozoide com a zona pelúcida do que a morfologia espermática geral sozinha, e que a morfologia do acrossoma poderia ainda ser usada como um parâmetro adicional para prever o potencial de fertilização em uma FIV convencional [48]. Previamente [49] foi demonstrado que a morfologia espermática e um acrossoma intacto normal foram significativamente correlacionados com taxa de fertilização *in vitro*. A proporção de espermatozoides com acrossoma intacto na inseminação foi também significativamente correlacionada com taxas de fertilização *in vitro*, porém somente no grupo com morfologia alterada (menos de 30% de formas normais de acordo com os critérios da OMS).

Alguns autores [50, 51] propuseram que uma morfologia espermática alterada pode influenciar não somente na taxa de fertilização, mas também no desenvolvimento embrionário inicial e fragmentação.

Pelo uso de alta magnificação de imagem x1500, com microscópio de luz invertido e com zoom de até x6100, estudos recentes demonstraram que um espermatozoide normal e, mais precisamente, o núcleo do espermatozoide normal podem afetar a taxa de fertilização e a ocorrência de gravidez [52-54].

Alguns autores avaliaram 27 casais encaminhados para tratamento por ICSI, devido a fator masculino, onde as mulheres tinham menos de 36 anos e os homens menos de 40 anos. Baseados na sua experiência e na acumulada no campo da fertilidade, os autores consideraram seis parâmetros dos espermatozóides (três critérios maiores e três menores) – cabeça, acrossoma, vacúolos, base, inserção e gota citoplasmática; foi atribuído valores a estes parâmetros e realizado um escore de classificação (classe 1 – cabeça normal e no máximo duas alterações fora da cabeça; classe 2 – espermatozóide com mais de duas alterações; classe 3 – espermatozóides com alguns defeitos de cabeça), e foram excluídos os espermatozóides com defeitos óbvios [55].

Após a ICSI, estes embriões foram cultivados, e acompanhados até blastocisto. A análise estatística dos critérios dos espermatozóides revelou que quando correlacionamos cada parâmetro em separado com taxa de fertilização, qualidade embrionária ou desenvolvimento, nenhuma correlação estatisticamente significativa foi encontrada com cabeça, acrossoma, gota citoplasmática ou cauda. Entretanto, uma maior taxa de fertilização foi observada em oócitos que foram injetados com espermatozóides onde nenhum vacúolo foi observado na cabeça. Estes autores demonstraram que a presença de vacúolos prejudica a taxa de fertilização.

Foi estabelecido que a presença de vacúolos pode ser traduzida por alterações do DNA afetando a fertilização pós ICSI [56-58]. Vacúolos de vários tamanhos são mais comumente correlacionados a integridade do DNA [58]. O achado de correlação positiva entre taxa de fertilização e a proporção de espermatozóides com formas normais na cabeça, foi demonstrado por outros autores [56, 59].

Adicional análise revelou uma diferença, quando foram comparados embriões de boa qualidade (escore A e B) resultantes de oócitos de mulheres com menos de 30 anos e de oócitos de mulheres com mais de 30 anos, no segundo e terceiro dia de desenvolvimento (96,3% contra 44,4% respectivamente). O declínio na qualidade dos oócitos relacionado ao aumento da idade, como demonstrado por estes autores é um fenômeno bem conhecido [60-62]. Os resultados demonstram importância do escore de espermatozóides principalmente em oócitos de mulheres

mais velhas, maiores que 30 anos. O resultado indica que quando espermatozóides classe 2 ou 3 são injetados, uma menor quantidade de bons embriões se desenvolvem em grupo de mulheres mais velhas quando comparado com as pacientes mais jovens.

Esses autores também encontraram diferenças na taxa de expansão a blastocisto entre os três grupos de embriões que resultaram das classes 1, 2 e 3 dos espermatozóides (15%, 9% e 0% respectivamente), os quais suportam a importância da morfologia destes para o desenvolvimento embrionário, como descrito por outros [63-66].

Autores, recentemente, em estudo prospectivo e randomizado, avaliaram os resultados dos parâmetros seminais em FIV convencional e ICSI, de 106 casais, onde metade dos oócitos de cada paciente foram submetidos a FIV convencional e a outra metade a ICSI [67]. Demonstraram que em 26 casais dos 106 em estudo a fertilização foi observada apenas no grupo da ICSI. Não havia diferença na qualidade embrionária de embriões desenvolvidos pela ICSI em ciclos com ou sem FIV convencional. Nenhuma diferença foi encontrada com relação a taxa de gestação entre os três grupos de embriões transferidos. Também ficou evidenciado que casais tratados com ICSI resultaram em maior taxa de fertilização por oócito quando comparados com FIV convencional. Em conclusão eles sugerem que no caso de casais com sêmen subfértil, o tratamento dos oócitos devem ser feitos pela FIV convencional e ICSI na mesma paciente, permanecendo a utilização de ambas as técnicas com uma ótima ferramenta para prevenir a falência total na fertilização após FIV convencional [67].

Pacientes com fertilização após FIV convencional aparentemente não necessitam ser tratados com ICSI. A questão é como discriminar entre pacientes que necessitam ou não necessitam ICSI para fertilizar. Na literatura não há resposta para esta pergunta. De maneira geral, estudos nos quais oócitos da mesma paciente são tratados com FIV convencional e ICSI no caso de sêmen *borderline*, demonstram ausência de fertilização pós FIV convencional em 25% a 50% dos casos. Entretanto a definição de sêmen *borderline* difere muito entre estes estudos, os quais podem influenciar diferenças nos resultados encontrados [43, 68-71].

Um efeito dominante de um único parâmetro seminal sub-ótimo nos resultados de fertilização após FIV e ICSI foram reportados para morfologia e para motilidade. Dois estudos em pacientes com severa teratozoospermia, na presença de contagem e motilidades normais em relação a habilidade de fertilizar, após FIV convencional e ICSI exibiram uma maior percentagem de fertilização após ICSI comparado com FIV convencional [43, 72].

Um autor [68] estudando o efeito da motilidade, demonstrou que em casos de astenospermia há um alto risco de ausência de fertilização com FIV convencional (50%) e uma tendência da taxa de fertilização ser menor em oócitos da mesma paciente tratados com FIV (46%), comparados com aqueles tratados com ICSI (59%). Entretanto, não foram identificados pontos de corte de um ou mais parâmetros que pudessem prever a ocorrência de fertilização e este ser utilizado para determinar um ótimo tratamento para pacientes individualmente.

O mesmo autor, estudando o papel da ICSI ou FIV convencional, baseados nos parâmetros seminais, alocaram pacientes para FIV convencional ou ICSI (naqueles que apresentavam < de 5% de velocidade tipo A, em sêmen fresco), tendo como objetivo avaliar a eficiência da FIV convencional e ICSI em casos de astenospermia, que foi definida neste estudo como \leq 5% tipo A [68]. Embora do ponto de vista de metodologia apresente alguns problemas (ex. forma de alocar pacientes, "n" muito pequeno para desfechos em estudo), ficou demonstrado que a taxa de fertilização pós FIV convencional (22,9%) estava muito abaixo da taxa de fertilização pós ICSI (63,4%, $P < 0,001$), bem como foi observado uma falência de completa fertilização em FIV convencional em 10 dos 20 ciclos (50%), e naqueles que apresentaram fertilização após FIV convencional a taxa de fertilização foi de 45,7%, a qual não foi significativamente diferente dos 59,4% obtidos após ICSI, nos mesmos 10 pacientes [68].

Os autores concluíram que uma baixa taxa de motilidade rápida progressiva (<5% tipo A), está associada com alta taxa de falência completa de fertilização após FIV convencional, enquanto que as taxas de fertilização após ICSI estão dentro dos resultados esperados [68].

Uma inexplicada falta de fertilização após FIV convencional é observada em cerca de 8% dos ciclos. De acordo com alguns autores estes achados exibem uma baixa taxa de recorrência

[73-76]. Em outros trabalhos, a falência total da fertilização bem como taxas muito baixas de fertilização são fenômenos repetitivos, indicando a possibilidade de desconhecimento ou ausência de diagnóstico de patologias nos espermatozóides ou oócitos [77, 78].

Entretanto, após ICSI, raramente ocorre falência na fertilização (2,8%), e são repetitivos em somente 15% dos casos [79-81].

Alguns autores [82] avaliaram 454 casais submetidos a ICSI, de forma retrospectiva, comparando a taxa de fertilização, a qualidade dos embriões e a taxa de gestação, aos parâmetros seminais (sêmen de parâmetros normais, sêmen anormal e espermatozóide retirado cirurgicamente do testículo). Os pacientes foram divididos em três grupos: 1- com sêmen normal (133 ICSI); 2- com sêmen anormal (235 ICSI); 3- espermatozóides extraídos cirurgicamente do testículo, com azoospermia não obstrutiva (95 ICSI).

Os oócitos foram observados para a presença de prónucleo 16-18h pós ICSI; a fertilização foi considerada normal quando 2 distintos prónucleos, contendo nucléolos estavam presentes. A clivagem dos oócitos fertilizados foi avaliada 24h após a fertilização. Os embriões foram avaliados de acordo com tamanho do blastômero, qualidade e a proporção de fragmentos. Grau 1 é o embrião de melhor qualidade, sendo que com 3 e 4 raramente se consegue uma gestação.

No grupo I, todos os parâmetros seminais foram normais de acordo com OMS [8] e critérios estritos Kruger (concentração > 20 milhões /ml, motilidade > 50%, morfologia normal >14%) [13], no grupo II a concentração variou de 0,5 milhões / ml a 10 milhões/ ml e com motilidade de 20%; no grupo III azoospérmicos.

Ficou determinado: i) que a média de embriões transferidos por transferência e a taxa de embriões grau 1 foi significativamente mais baixa em ICSI com espermatozóide do grupo 3 do que com grupo 1, ii) em pacientes do grupo 1, a taxa de fertilização foi significativamente maior do que os outros grupos, iii) nos pacientes do grupo 2, as taxas de fertilização, qualidade embrionária, taxas de gestação não foram afetadas pelos diferentes parâmetros seminais em ambos ciclos com protocolos curto e longo.

Em conclusão, foi demonstrado que a habilidade de fertilizar na ICSI é muito mais alta com esperma fresco ejaculado, e também muito mais baixa com espermatozóide extraído de testículo em casos de azoospermia não obstrutiva. As taxas de gestação clínica e fertilização foram significativamente mais baixas com espermatozóides extraídos do testículo do que com espermatozóides de ejaculado

Outro autor [83], também evidenciou taxas de fertilização e gestação, mais baixas quando comparadas a esperma ejaculado e retirado do epidídimo. Estes achados, nos permitem entender e cada vez mais pesquisar a relação dos parâmetros seminais com tais desfechos, pois a nível do testículo e epidídimo, os espermatozóides tem menos motilidade bem como alterações de sua morfologia, são mais imaturos.

Os autores [84] compararam o desenvolvimento embrionário *in vitro*, resultante de ICSI realizada com sêmen fresco ejaculado, espermatozóides de origem testicular ou do epidídimo de homens azoospermicos obstrutivos e espermatozóides de testículo de homens azoospermicos não obstrutivos. Estes autores observaram que as taxas de formação de blastocisto e fertilização encontradas foram significativamente menores no grupo testicular. Eles concluíram que espermatozóides de azoospermicos não obstrutivos, quando utilizados para ICSI, resultam em embriões que progridem para estágio de blastocisto com uma taxa menor e mais lenta e menos eficientemente implantam [84].

Alguns autores tem indicado que dados obtidos pelo CASA da motilidade do espermatozóide também podem ser preditivos de fertilidade [14, 85, 86]. Porém, outros falharam em encontrar benefício da análise seminal pelo CASA comparado com análise seminal de rotina [87, 88].

Na tentativa de melhor avaliar o parâmetro motilidade, os autores [89] avaliaram o uso do CASA para determinar a motilidade dos espermatozóides, comparando estas características com taxa de fertilização *in vitro*, em 136 embriões, antes e após “*swim-up*”, e foram divididos em grupo com taxa de fertilização > 50% (grupo 1) e outro com taxa de fertilização ≤50% (grupo 2). Foram analisados vários fatores relacionados a motilidade, sendo que antes do *swim-up*, havia

significativas correlações entre taxa de fertilização e alguns parâmetros do CASA, incluindo amplitude lateral de deslocamento(ALH), velocidade curvilínea(VCL), velocidade em linha reta(VSL) e movimento rápido do espermatozóide(*Rapid*). Como para as características da motilidade do espermatozóide, havia significantes diferenças de ALH, VCL, VSL e *Rapid*, entre grupo 1 e 2 antes do *swim-up*. Após os *swim-up*, havia significativas diferenças de VCL e *Rapid* entre os grupos. Em conclusão, haviam diferenças significativas em duas características da motilidade (VCL e *Rapid*), antes e após o *swim-up*, demonstrando que a distância total percorrida pelo espermatozóide pode ser importante para a habilidade de fertilizar do espermatozóide humano. Estas informações poderiam ser utilizadas no aconselhamento dos casais antes de tomar a decisão de transferência embrionária pós FIV. Porém, outros estudos devem ser realizados para determinar pontos de corte das estimativas do CASA, que poderiam ser utilizados nos laboratórios para planejamento e estratégia na hora de realizar FIV convencional.

Outro autor que avaliou, os efeitos da qualidade espermática no desenvolvimento embrionário após ICSI, onde 1020 embriões oriundos de 219 casais, foram alocados em 5 grupos distintos, baseados nos parâmetros seminais: grupo I- sêmen normal , grupo II- concentração ≤ 10 milhões / ml, morfologia < 30%, motilidade <50% (a+b), grupo III- concentração esperma < 1 milhão /ml, motilidade <25% e morfologia <10%, grupo IV – azoospermia obstrutiva, grupo V azoospermia não obstrutiva[64].

Estes autores observaram que as taxas de fertilização e clivagem, qualidade dos embriões bem como a taxa de desenvolvimento a blastocisto, foi significativamente diminuída quando a qualidade do sêmen diminui. Entretanto nenhuma diferença significativa foi observada com relação a gestação clínica e taxas de implantação. Quanto a taxa de fertilização e clivagem não houve diferença entre os grupos I e II, porém os achados foram estatisticamente significativos quando comparados grupo I aos grupos III, IV e V. A qualidade embrionária, expressada pela presença de embriões de grau 1 ou 2 com 4 células no segundo dia, foi negativamente afetada quando a qualidade do sêmen diminui, sendo que este efeito foi estatisticamente significativo quando comparado o grupo I a todos os outros

Finalmente, taxas reduzidas de desenvolvimento a blastocisto no quinto dia foram observadas, quando a qualidade do sêmen piorava. Nenhum blastocisto foi observado no grupo V [64]. Em conclusão, os autores relatam que a negativa relação que foi observada entre qualidade seminal e desenvolvimento embrionário, mesmo antes da ativação do genoma embrionário, sugere que o fator masculino pode afetar a embriogênese a partir de um estágio muito inicial.

Foi demonstrado [63], comparando o desenvolvimento embrionário e qualidade dos blastocistos em pacientes derivados de ICSI, onde pacientes foram alocados em 2 grupos: Grupo I (fator masculino presente, n=32, submetidos a ICSI) e grupo II (ausência de fator masculino, n=32, submetidos a FIV convencional). Neste trabalho foi avaliada a influência dos fatores paternos (concentração, motilidade, morfologia) no desenvolvimento embrionário e qualidade do embrião. A avaliação embrionária foi feita: 1) em 17 a 19h, foi checado a maturidade e evidência de fertilização normal (dois prónucleos); 2) em 70 a 74h (terceiro dia) foi avaliado o desenvolvimento embrionário (número de células e grau de fragmentação). Sendo que foi atribuído à fragmentação um escore (1=nada, 1.5= 1 a 10% fragmentação, 2= 50 a 80% fragmentação, 3= 21 a 30% fragmentação, 4>30%); 3) em 120 a 122h, avaliou-se o número de embriões que alcançaram o estágio de desenvolvimento a blastocisto. Foi demonstrado que muito mais embriões derivados de ICSI, tardavam a chegar a 5-8 células ($P=0,024$) concomitante com a ativação do genoma paterno, do que aqueles derivados de FIV convencional. Significativamente, poucos embriões derivados de ICSI chegavam ao estágio de blastocisto nos quinto e sexto dia, a também poucos embriões derivados de ICSI foram de alta qualidade, em comparação aos da FIV convencional.

Dentre os parâmetros analisados a motilidade progressiva e a morfologia foram significativamente correlacionados com a diminuição do desenvolvimento à blastocisto e qualidade embrionária, concluindo-se que os fatores paternos e ou a realização da ICSI em casos severos de infertilidade por fator masculino podem ter um efeito deletério no desenvolvimento a blastocisto e sua qualidade.

A diminuição potencial de embriões da ICSI pode ser devido a influencia paterna ou ao próprio procedimento, no caso a ICSI. Existem consideráveis evidências que sugerem que o DNA espermático de pacientes com severa oligoastenospermia (pacientes que se beneficiam deste procedimento) apresentem perda da cromatina e fragmentação do DNA espermático [90]. Sendo que estes espermatozóides podem completar a fertilização [57, 91], porém as anormalidades do DNA podem resultar em atraso do desenvolvimento na fase pré implantacional.

Outro autor [92], avaliando a ICSI realizada na ausência de fator masculino, sugeriu que o procedimento por si só compromete o desenvolvimento embrionário, entretanto os resultados deste estudo devem ser interpretados com cautela, porque estas observações foram baseadas em cultura contínua dos embriões considerados inadequados para transferir ou criopreservar no terceiro dia de desenvolvimento.

Foi descrito [93], usando a ICSI para fertilizar, que não encontraram uma correlação entre a concentração espermática ou morfologia espermática e o desenvolvimento a blastocisto, porém neste grupo de pacientes em que os oócitos foram injetados com espermatozóides de ejaculado com altas taxas de motilidade progressiva tinham uma significativa maior chance de chegar ao estagio de blastocisto.

Recentemente, Fatores prognósticos foram avaliados nas diferentes técnicas de FIV (FIV convencional e ICSI) [94], sendo que inúmeros fatores foram relatados, porém nenhum dado com relação aos parâmetros seminais e sua associação como fatores prognósticos foi demonstrado.

Com relação ao número de embriões transferidos, qualidade embrionária e taxas de fertilização e clivagem, os autores avaliados por essa revisão não apresentam uma metodologia uniforme para reportar estas variáveis, não ficando claro o verdadeiro papel destes como fatores prognósticos.

Como vimos após esta revisão, a associação entre parâmetros seminais não está clara, os estudos tem resultados conflitantes e as população são bastante heterogêneas. Não há dados claros na literatura sobre o efeito dos parâmetros seminais no desenvolvimento embrionário (clivagem precoce até o terceiro dia de cultivo) considerando todas as características deste

desenvolvimento. Os autores preferem avaliar pontualmente alguma característica (clivagem, blastulação ou fragmentação), como se o desenvolvimento fosse segmentado e uma etapa não dependesse da anterior.

Ademais, sabe-se que a incorporação do DNA paterno dar-se-á a partir do desenvolvimento de 4 células (2º dia) [95], e isso teria papel fundamental na comparação dos desfechos embrionários nos diferentes estágios.

4.4- Qualidade Embrionária

O desfecho final de todos os estudos em reprodução humana deveria ser gestação, porém existem muitas variáveis inter-relacionadas a serem estudadas, necessitando um número muito grande, uma vez que a taxa de gestação em RA é de aproximadamente 30% por transferência, e muitas variáveis são encontradas, tornado assim este desfecho muito difícil de ser avaliado.

Quando estamos estudando os embriões, levando em conta a sua qualidade estamos tentando transferir para a paciente, embriões com melhor qualidade, e com uma capacidade de evoluir a gestação.

Até o presente momento, permanece, ainda, a questão de como definir “ótimos embriões” e como selecionar embriões que tenham um melhor desenvolvimento.

O papel do fator masculino no desenvolvimento embrionário está ganhando atenção desde a introdução da ICSI como uma opção de tratamento para pacientes com características seminais muito reservadas.

A biologia da fusão do espermatozóide com o óvulo, em mamíferos, vem sendo muito estudada, alguns autores [96] demonstraram que a fusão destas células ocorre em uma área mais vilosa do óvulo, onde o espermatozóide se liga ao óvulo. Previamente a este fato o esperma necessita de maturação, que ocorre pela passagem através do epidídimo e posteriormente quando passa pelo aparelho reprodutor feminino. Na fusão as membranas das duas células se

alteram, e o citoplasma do óvulo vai se unindo ao do espermatozóide, formando uma nova membrana agora do zigoto, este processo tem sido descrito como pseudofagocitose.

Recentemente, algumas proteínas tem sido estudadas (CD9, CD81, GPI, ligadas ao óvulo e Izumo, DE e Anti ADAM ligadas ao espermatozóide), e parecem ter relação com o processo de fertilização. O estudo mais aprofundado das mesmas abre novas perspectivas para o entendimento deste processo [96].

Os autores que demonstram diminuição das taxas de fertilização e clivagem associadas a pobres parâmetros seminais, sugerem um início muito cedo dos efeitos paternos no desenvolvimento embrionário. Estes achados são muito interessantes, considerando que o conhecimento clássico do embrião humano, durante os estágios iniciais de desenvolvimento, é controlado pelo RNA-m herdado maternamente, bem como o genoma embrionário não é ativado até após o estágio de 4 células [95]. Logo, se há influência paterna no desenvolvimento embrionário, esta não deveria estar aparente até o estágio de mórula ou 8 células.

Classicamente como proposto por Veeck [97] e Red Latinoamericana de Reprodução Assistida [98] a avaliação embrionária avalia apenas o número de células (8 células) e a quantidade de fragmentação no terceiro dia, como descrito abaixo:

Grau I- embriões com blastômeros de igual tamanho, sem presença de fragmentação e com citoplasma claro e homogêneo.

Grau II – embrião com blastômeros simétricos e com menos de 30% de fragmentos.

Grau III – embriões com blastômeros assimétricos e ausência de fragmentos.

Grau IV – embrião com blastômeros de tamanho igual ou diferente, com 30 a 50% de fragmentos citoplasmáticos.

Grau V- embrião com mais de 50 % de fragmentos citoplasmáticos.

Neste tipo de avaliação, não estamos avaliando a clivagem precoce, que foi realizada por outros autores [99-104], e é descrita como a primeira clivagem, simetria do blastômero e grau de

fragmentação. Então, a boa qualidade do embrião teria dois blastômeros iguais e simétricos, e sem fragmentação. A falência da primeira clivagem após fertilização é relatada por uma baixa taxa de implantação, mesmo em embriões com boa morfologia no dia da implantação [100, 101, 103].

A qualidade embrionária tem sido tradicionalmente avaliada baseada na taxa de clivagem e morfologia do blastômero [105].

Somente a morfologia do embrião ao terceiro dia é insuficiente para prever a qualidade do blastocisto. O benefício de transferir blastocisto aumentando a taxa de implantação tem sido atribuída a uma facilitação da seleção natural dos embriões de “boa qualidade” [106].

Tem sido descritos vários marcadores precoces de desenvolvimento como simetria pronuclear, alinhamento nucleolar e halo perinuclear, que podem ser importantes em prever o potencial de implantação e a gravidez [107].

Em 1999, Tesarik e Greco demonstraram uma taxa de gravidez de 50% se pelo menos um embrião transferido fosse padrão 0 (desenvolvimento pronuclear normal), comparado com 9% se somente embriões com padrão 1-5 (desenvolvimento pronuclear anormal) estivessem disponíveis para transferência, mesmo se a taxa de clivagem e morfologia fossem similares. A simetria do corpúsculo precursor nuclear pode ser mais importante que a velocidade de clivagem [108].

Recentemente, autores [109], avaliaram a clivagem precoce (entre 25 a 29h), em 9.544 embriões, oriundos de 1.095 FIV convencionais ou ICSI. Evidenciaram uma significativa maior percentagem de embriões de excelente qualidade no grupo de clivagem precoce comparado com grupo com clivagem tardia.

No grupo de clivagem precoce havia também uma maior taxa de gestação por transferência comparado ao grupo de clivagem tardia. Além disto, os autores evidenciaram que a transferência de um único embrião do grupo de clivagem precoce resultava em uma alta taxa de gestação (38,5%) e uma baixa taxa de gestação múltipla (18%). Entretanto, a taxa de gestação múltipla diferia significativamente entre aqueles com um único embrião de clivagem precoce e aqueles com três embriões de clivagem precoce transferidos.

Portanto, aumentando o número de embriões com clivagem precoce entre os embriões transferidos não aumentava a taxa de gestação, mas sim a taxa de gestações múltiplas. Os autores concluíram que clivagem precoce é um forte indicador de qualidade embrionária, e pode ser utilizado como um critério adicional na seleção de embriões para transferência, para desta forma aumentar a taxa de gestação e diminuir a taxa de gestação múltipla.

Previamente, outros autores observaram que embriões com clivagem precoce tinham uma maior taxa de desenvolvimento a blastocisto [110] e a transferência de embriões com uma taxa de clivagem precoce levou a significativas taxas maiores de gestação [101, 111-114], quando comparados a embriões com clivagem tardia.

Tem sido demonstrado que a transferência de blastocisto gera taxas de gravidez e implantação altas, enquanto diminui a taxa gestação múltipla após FIV [115].

O Escore Embrionário Graduado (GES) que é composto de duas avaliações internas de cada ponto do desenvolvimento, paralelamente a uma avaliação ponderada das características morfológicas convencionais do terceiro dia. Utilizou uma coorte grande de embriões (n=1245), oriundos de ICSI, para avaliar a habilidade do GES em prever conversão destes embriões à blastocisto, implantação e gravidez [99].

No GES, são feitas três avaliações, que ocorrem 16-18, 25-27 e 64-67 horas pós ICSI, sendo atribuído valores, onde um ótimo embrião atinge no máximo 100 pontos. Nos resultados demonstraram: dos embriões transferidos com GES>70, apresentavam 59% de taxa de gestação, comparado com 34% dos que tinham GES ≤65. Com relação a taxa de implantação, os embriões com GES >70 tinham 39% comparado aos 24% de taxa de implantação naqueles com GES <65.

Baseados nos resultados obtidos por estes autores, eles sugeriram que é possível adquirir as mesmas altas taxas de implantação e gravidez associadas a transferência de blastocistos, a partir da transferência de embriões em estado de clivagem selecionados com base neste escore [99].

A habilidade, em prever no terceiro dia, quais embriões chegarão ao estágio de blastocisto, pode diminuir os gastos com laboratório, aumentar a eficiência e permitir a anterior criopreservação de embriões supranumerários [99].

Entretanto, estender a cultura de embriões tem uma série de desvantagens. Nem todos laboratórios estão equipados para realizar cultura de blastocistos, espaço adicional na incubadora é necessário para acomodá-la e custos adicionais com meios de cultura e pessoal especializado.

Existe também controvérsia em relação ao estágio ideal para criopreservação dos embriões excedentes. Muitos sentem ser melhor durante o estágio de clivagem do que blastocistos. Ainda existe o fato atormentador de não ter um embrião para transferir se nenhum embrião sobreviver até o quinto dia [99].

Portanto, existem diferentes formas de se avaliar e classificar o desenvolvimento ou qualidade embrionária. A mais utilizada leva em consideração o número de células e suas características no terceiro dia (fragmentação), entretanto não leva em consideração todo o desenvolvimento (da clivagem precoce até o terceiro dia) como o escore de 100 pontos proposto o faz.

Acreditamos que o uso deste escore é mais racional e reflete todo o desenvolvimento embrionário, neste sentido, não existem dados confiáveis na literatura avaliando os parâmetros seminais com esse escore.

Já para a avaliação de blastocistos não existe na literatura uma classificação validada, esse passa a ser um desfecho rígido, mas para sua ocorrência uma série de variáveis devem ser consideradas anteriormente (idade dos pacientes, protocolos de indução, quantidade e qualidade dos oócitos, dose de ganadotrofina, meios de cultura, condições do laboratório, causa de infertilidade) o que fica inviável uma comparação sem risco de viés adicional.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. *2007 Assisted Reproductive Technology Success Rates: National Summary and Fertility Clinic Reports*, A.S.f.R.M. Centers for Disease Control and Prevention, Society for Assisted Reproductive Technology. , Editor. 2009, Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention: Atlanta: U.S. p. 41.
2. Chambers, G.M., et al., *The economic impact of assisted reproductive technology: a review of selected developed countries*. *Fertil Steril*, 2009. **91**(6): p. 2281-94.
3. Sunderam, S., et al., *Assisted reproductive technology surveillance--United States, 2006*. *MMWR Surveill Summ*, 2009. **58**(5): p. 1-25.
4. Kim, E.D. and L.I. Lipshultz, *Male subfertility: diagnostic and therapeutic advances*. *Br J Urol*, 1997. **80**(4): p. 633-41.
5. Razvi, K., et al., *The clinical management of male infertility*. *Singapore Med J*, 1999. **40**(4): p. 291-7.
6. Evenson, D.P., et al., *Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic*. *Hum Reprod*, 1999. **14**(4): p. 1039-49.
7. Sidhu, R.S., et al., *Relationship between creatine kinase levels and clinical diagnosis of infertility*. *J Assist Reprod Genet*, 1998. **15**(4): p. 188-92.
8. *WHO Manual for the Standardized Investigation, Diagnosis and Management of the Infertile Male*, W.H. Organization., Editor. 1993, Cambridge University Press: New York.
9. Palermo, G., et al., *Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte*. *Lancet*, 1992. **340**(8810): p. 17-8.
10. Schoysman, R., *Clinical situations challenging the established concept of epididymal physiology in the human*. *Acta Eur Fertil*, 1993. **24**(2): p. 55-60.
11. *WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction.*, W.H. Organization., Editor. 1993, 1999, Cambridge University Press: New York. p. 13-80.
12. Cooper, T.G., et al., *World Health Organization reference values for human semen characteristics*. *Hum Reprod Update*, 2010. **16**(3): p. 231-45.
13. Kruger, T.F., et al., *Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization*. *Fertil Steril*, 1986. **46**(6): p. 1118-23.
14. Barratt, C.L., M.J. Tomlinson, and I.D. Cooke, *Prognostic significance of computerized motility analysis for in vivo fertility*. *Fertil Steril*, 1993. **60**(3): p. 520-5.
15. Glazener, C.M., et al., *The value of artificial insemination with husband's semen in infertility due to failure of postcoital sperm-mucus penetration--controlled trial of treatment*. *Br J Obstet Gynaecol*, 1987. **94**(8): p. 774-8.
16. Polansky, F.F. and E.J. Lamb, *Do the results of semen analysis predict future fertility? A survival analysis study*. *Fertil Steril*, 1988. **49**(6): p. 1059-65.
17. Swan, S.H., *Semen quality in fertile US men in relation to geographical area and pesticide exposure*. *Int J Androl*, 2006. **29**(1): p. 62-8; discussion 105-8.
18. Haugen, T.B., T. Egeland, and O. Magnus, *Semen parameters in Norwegian fertile men*. *J Androl*, 2006. **27**(1): p. 66-71.
19. Nallella, K.P., et al., *Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility*. *Fertil Steril*, 2006. **85**(3): p. 629-34.
20. Hellstrom, W.J., et al., *Semen and sperm reference ranges for men 45 years of age and older*. *J Androl*, 2006. **27**(3): p. 421-8.
21. Jorgensen, N., et al., *Coordinated European investigations of semen quality: results from studies of Scandinavian young men is a matter of concern*. *Int J Androl*, 2006. **29**(1): p. 54-61; discussion 105-8.
22. Guzick, D.S., et al., *Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men*. *N Engl J Med*, 2001. **345**(19): p. 1388-93.
23. Chia, S.E., S.K. Tay, and S.T. Lim, *What constitutes a normal seminal analysis? Semen parameters of 243 fertile men*. *Hum Reprod*, 1998. **13**(12): p. 3394-8.
24. Bonde, J.P., et al., *Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners*. *Lancet*, 1998. **352**(9135): p. 1172-7.
25. Fisch, H., E.F. Ikeguchi, and E.T. Goluboff, *Worldwide variations in sperm counts*. *Urology*, 1996. **48**(6): p. 909-11.

26. Mallidis, C., E.J. Howard, and H.W. Baker, *Variation of semen quality in normal men*. Int J Androl, 1991. **14**(2): p. 99-107.
27. Aitken, R.J., et al., *A prospective study of the relationship between semen quality and fertility in cases of unexplained infertility*. J Androl, 1984. **5**(4): p. 297-303.
28. Merzenich, H., H. Zeeb, and M. Blettner, *Decreasing sperm quality: a global problem?* BMC Public Health, 2010. **10**: p. 24.
29. Repping, S., et al., *Use of the total motile sperm count to predict total fertilization failure in in vitro fertilization*. Fertil Steril, 2002. **78**(1): p. 22-8.
30. Keegan, B.R., et al., *Isolated teratozoospermia does not affect in vitro fertilization outcome and is not an indication for intracytoplasmic sperm injection*. Fertil Steril, 2007. **88**(6): p. 1583-8.
31. van Weert, J.M., et al., *A prediction model for ongoing pregnancy after in vitro fertilization in couples with male subfertility*. J Reprod Med, 2008. **53**(4): p. 250-6.
32. Bhattacharya, S., et al., *Conventional in-vitro fertilisation versus intracytoplasmic sperm injection for the treatment of non-male-factor infertility: a randomised controlled trial*. Lancet, 2001. **357**(9274): p. 2075-9.
33. Strassburger, D., et al., *Very low sperm count affects the result of intracytoplasmic sperm injection*. J Assist Reprod Genet, 2000. **17**(8): p. 431-6.
34. Freeman, M.R., et al., *Male partner screening before in vitro fertilization: preselecting patients who require intracytoplasmic sperm injection with the sperm penetration assay*. Fertil Steril, 2001. **76**(6): p. 1113-8.
35. Kiefer, D., J.H. Check, and D. Katsoff, *The value of motile density, strict morphology, and the hypoosmotic swelling test in in vitro fertilization-embryo transfer*. Arch Androl, 1996. **37**(1): p. 57-60.
36. Gunalp, S., et al., *A study of semen parameters with emphasis on sperm morphology in a fertile population: an attempt to develop clinical thresholds*. Hum Reprod, 2001. **16**(1): p. 110-114.
37. Menkveld, R., et al., *Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds*. Hum Reprod, 2001. **16**(6): p. 1165-71.
38. Chen, X., et al., *Predictive value of semen parameters in in vitro fertilisation pregnancy outcome*. Andrologia, 2009. **41**(2): p. 111-7.
39. Kupker, W., et al., *Morphology in intracytoplasmic sperm injection: preliminary results*. J Assist Reprod Genet, 1995. **12**(9): p. 620-6.
40. Nagy, Z., et al., *Using ejaculated, fresh, and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection*. Fertil Steril, 1995. **63**(4): p. 808-15.
41. Svalander, P., et al., *The outcome of intracytoplasmic sperm injection is unrelated to 'strict criteria' sperm morphology*. Hum Reprod, 1996. **11**(5): p. 1019-22.
42. Lundin, K., B. Soderlund, and L. Hamberger, *The relationship between sperm morphology and rates of fertilization, pregnancy and spontaneous abortion in an in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection programme*. Hum Reprod, 1997. **12**(12): p. 2676-81.
43. Pisarska, M.D., et al., *Fertilization after standard in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in subfertile males using sibling oocytes*. Fertil Steril, 1999. **71**(4): p. 627-32.
44. Ombelet, W., et al., *Teratozoospermia and in-vitro fertilization: a randomized prospective study*. Hum Reprod, 1994. **9**(8): p. 1479-84.
45. Vawda, A.I., J. Gunby, and E.V. Younglai, *Semen parameters as predictors of in-vitro fertilization: the importance of strict criteria sperm morphology*. Hum Reprod, 1996. **11**(7): p. 1445-50.
46. Host, E., et al., *Sperm morphology and IVF: embryo quality in relation to sperm morphology following the WHO and Kruger's strict criteria*. Acta Obstet Gynecol Scand, 1999. **78**(6): p. 526-9.
47. Soderlund, B. and K. Lundin, *Acrosome index is not an absolute predictor of the outcome following conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection*. J Assist Reprod Genet, 2001. **18**(9): p. 483-9.

48. Menkveld, R., et al., *Acrosomal morphology as a novel criterion for male fertility diagnosis: relation with acrosin activity, morphology (strict criteria), and fertilization in vitro*. *Fertil Steril*, 1996. **65**(3): p. 637-44.
49. Liu, D.Y. and H.W. Baker, *The proportion of human sperm with poor morphology but normal intact acrosomes detected with Pisum sativum agglutinin correlates with fertilization in vitro*. *Fertil Steril*, 1988. **50**(2): p. 288-93.
50. Ron-el, R., et al., *Delayed fertilization and poor embryonic development associated with impaired semen quality*. *Fertil Steril*, 1991. **55**(2): p. 338-44.
51. Parinaud, J., et al., *Influence of sperm parameters on embryo quality*. *Fertil Steril*, 1993. **60**(5): p. 888-92.
52. Bartoov, B., et al., *Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection*. *Fertil Steril*, 2003. **80**(6): p. 1413-9.
53. Bartoov, B., et al., *Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome*. *J Androl*, 2002. **23**(1): p. 1-8.
54. Hazout, A., et al., *High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI*. *Reprod Biomed Online*, 2006. **12**(1): p. 19-25.
55. Cassuto, N.G., et al., *A new real-time morphology classification for human spermatozoa: a link for fertilization and improved embryo quality*. *Fertil Steril*, 2009. **92**(5): p. 1616-25.
56. El-Ghobashy, A.A. and C.R. West, *The human sperm head: a key for successful fertilization*. *J Androl*, 2003. **24**(2): p. 232-8.
57. Sakkas, D., et al., *Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development*. *Hum Reprod*, 1998. **13 Suppl 4**: p. 11-9.
58. Lopes, S., A. Jurisicova, and R.F. Casper, *Gamete-specific DNA fragmentation in unfertilized human oocytes after intracytoplasmic sperm injection*. *Hum Reprod*, 1998. **13**(3): p. 703-8.
59. Dittrich, R., et al., *Individual assessment of sperm morphology of single spermatozoa used for intracytoplasmic sperm injection*. *Andrologia*, 2005. **37**(1): p. 53-6.
60. Menezo, Y. and Y. Barak, *Comparison between day-2 embryos obtained either from ICSI or resulting from short insemination IVF: influence of maternal age*. *Hum Reprod*, 2000. **15**(8): p. 1776-80.
61. Piette, C., et al., *In-vitro fertilization: influence of women's age on pregnancy rates*. *Hum Reprod*, 1990. **5**(1): p. 56-9.
62. Janny, L. and Y.J. Menezo, *Maternal age effect on early human embryonic development and blastocyst formation*. *Mol Reprod Dev*, 1996. **45**(1): p. 31-7.
63. Miller, J.E. and T.T. Smith, *The effect of intracytoplasmic sperm injection and semen parameters on blastocyst development in vitro*. *Hum Reprod*, 2001. **16**(5): p. 918-24.
64. Loutradi, K.E., et al., *The effects of sperm quality on embryo development after intracytoplasmic sperm injection*. *J Assist Reprod Genet*, 2006. **23**(2): p. 69-74.
65. Aitken, R.J. and G.N. De Iuliis, *Origins and consequences of DNA damage in male germ cells*. *Reprod Biomed Online*, 2007. **14**(6): p. 727-33.
66. Tesarik, J., *Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo*. *Reprod Biomed Online*, 2005. **10**(3): p. 370-5.
67. van der Westerlaken, L., et al., *Conventional in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in patients with borderline semen: a randomized study using sibling oocytes*. *Fertil Steril*, 2006. **85**(2): p. 395-400.
68. Verheyen, G., et al., *Controlled comparison of conventional in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in patients with asthenozoospermia*. *Hum Reprod*, 1999. **14**(9): p. 2313-9.
69. Plachot, M., et al., *Outcome of conventional IVF and ICSI on sibling oocytes in mild male factor infertility*. *Hum Reprod*, 2002. **17**(2): p. 362-9.
70. Aboulghar, M.A., et al., *Intracytoplasmic sperm injection and conventional in vitro fertilization for sibling oocytes in cases of unexplained infertility and borderline semen*. *J Assist Reprod Genet*, 1996. **13**(1): p. 38-42.
71. Kastrop, P.M., et al., *Comparison between intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization (IVF) with high insemination concentration after total fertilization failure in a previous IVF attempt*. *Hum Reprod*, 1999. **14**(1): p. 65-9.

72. Kihaille, P.E., et al., *Comparison of sibling oocyte outcomes after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization in severe teratozoospermic patients in the first cycle.* Int J Androl, 2003. **26**(1): p. 57-62.
73. Molloy, D., et al., *The predictive value of idiopathic failure to fertilize on the first in vitro fertilization attempt.* Fertil Steril, 1991. **56**(2): p. 285-9.
74. Ben-Shlomo, I., et al., *Failure to fertilize in vitro in couples with male factor infertility: what next?* Fertil Steril, 1992. **58**(1): p. 187-9.
75. Lipitz, S., et al., *Complete failure of fertilization in couples with unexplained infertility: implications for subsequent in vitro fertilization cycles.* Fertil Steril, 1993. **59**(2): p. 348-52.
76. Lipitz, S., et al., *Complete failure of fertilization in couples with mechanical infertility: implications for subsequent in vitro fertilization cycles.* Fertil Steril, 1994. **61**(5): p. 863-6.
77. Calderon, G., et al., *Intracytoplasmic sperm injection versus conventional in-vitro fertilization: first results.* Hum Reprod, 1995. **10**(11): p. 2835-9.
78. Roest, J., et al., *Treatment policy after poor fertilization in the first IVF cycle.* J Assist Reprod Genet, 1998. **15**(1): p. 18-21.
79. Liu, J., et al., *Analysis of 76 total fertilization failure cycles out of 2732 intracytoplasmic sperm injection cycles.* Hum Reprod, 1995. **10**(10): p. 2630-6.
80. Vandervorst, M., et al., *Patients with absolutely immotile spermatozoa and intracytoplasmic sperm injection.* Hum Reprod, 1997. **12**(11): p. 2429-33.
81. Flaherty, S.P., Payne, D and Mathews, C.D., *Fertilization failures after ICSI, in Treatment of Infertility: The New Frontiers.*, M.a.F. Filicori, C., Editor. 1998, Communications Media for Education Inc: New Jersey, USA. p. 269-282.
82. Goker, E.N., et al., *Comparison of the ICSI outcome of ejaculated sperm with normal, abnormal parameters and testicular sperm.* Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2002. **104**(2): p. 129-36.
83. Aboulghar, M.A., et al., *Fertilization and pregnancy rates after intracytoplasmic sperm injection using ejaculate semen and surgically retrieved sperm.* Fertil Steril, 1997. **68**(1): p. 108-11.
84. Balaban, B., et al., *Blastocyst transfer following intracytoplasmic injection of ejaculated, epididymal or testicular spermatozoa.* Hum Reprod, 2001. **16**(1): p. 125-129.
85. Sukcharoen, N., et al., *Prediction of the in-vitro fertilization (IVF) potential of human spermatozoa using sperm function tests: the effect of the delay between testing and IVF.* Hum Reprod, 1996. **11**(5): p. 1030-4.
86. Joshi, N., et al., *The importance of computer-assisted semen analysis and sperm function testing in an IVF program.* Int J Fertil Menopausal Stud, 1996. **41**(1): p. 46-52.
87. Oehninger, S., *Clinical and laboratory management of male infertility: an opinion on its current status.* J Androl, 2000. **21**(6): p. 814-21.
88. Oehninger, S., et al., *Sperm function assays and their predictive value for fertilization outcome in IVF therapy: a meta-analysis.* Hum Reprod Update, 2000. **6**(2): p. 160-8.
89. Hirano, Y., et al., *Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro.* J Assist Reprod Genet, 2001. **18**(4): p. 213-8.
90. Foresta, C., et al., *Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men.* Int J Androl, 1992. **15**(4): p. 330-7.
91. Ahmadi, A. and S.C. Ng, *Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa.* J Exp Zool, 1999. **284**(6): p. 696-704.
92. Griffiths, T.A., A.P. Murdoch, and M. Herbert, *Embryonic development in vitro is compromised by the ICSI procedure.* Hum Reprod, 2000. **15**(7): p. 1592-6.
93. Shoukir, Y., et al., *Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence?* Hum Reprod, 1998. **13**(6): p. 1632-7.
94. van Loendersloot, L.L., et al., *Predictive factors in in vitro fertilization (IVF): a systematic review and meta-analysis.* Hum Reprod Update, 2010. **16**(6): p. 577-89.
95. Braude, P., V. Bolton, and S. Moore, *Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development.* Nature, 1988. **332**(6163): p. 459-61.
96. Primakoff, P. and D.G. Myles, *Cell-cell membrane fusion during mammalian fertilization.* FEBS Lett, 2007. **581**(11): p. 2174-80.

97. Veeck, L., *Atlas of the human oocyte and early conceptus.*, ed. W. Wilkins. 1991, Baltimore.
98. *Manual de Procedimentos de Laboratório de Reprodução Assistida.* 2006: Red Latinoamericana de Reproducción Asistida.
99. Fisch, J.D., et al., *The Graduated Embryo Score (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage-stage embryos.* Hum Reprod, 2001. **16**(9): p. 1970-5.
100. Isiklar, A., et al., *Early cleavage of human embryos to the two-cell stage. A simple, effective indicator of implantation and pregnancy in intracytoplasmic sperm injection.* J Reprod Med, 2002. **47**(7): p. 540-4.
101. Lundin, K., C. Bergh, and T. Hardarson, *Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF.* Hum Reprod, 2001. **16**(12): p. 2652-7.
102. Sakkas, D., et al., *Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection.* Fertil Steril, 2001. **76**(6): p. 1150-6.
103. Sakkas, D., et al., *Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability.* Hum Reprod, 1998. **13**(1): p. 182-7.
104. Ziebe, S., et al., *Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization.* Hum Reprod, 1997. **12**(7): p. 1545-9.
105. Puissant, F., et al., *Embryo scoring as a prognostic tool in IVF treatment.* Hum Reprod, 1987. **2**(8): p. 705-8.
106. Graham, J., et al., *Day 3 morphology is a poor predictor of blastocyst quality in extended culture.* Fertil Steril, 2000. **74**(3): p. 495-7.
107. Scott, L.A. and S. Smith, *The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval.* Hum Reprod, 1998. **13**(4): p. 1003-13.
108. Tesarik, J. and E. Greco, *The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology.* Hum Reprod, 1999. **14**(5): p. 1318-23.
109. Fu, J., et al., *The influence of early cleavage on embryo developmental potential and IVF/ICSI outcome.* J Assist Reprod Genet, 2009. **26**(8): p. 437-41.
110. Van Montfoort, A.P., et al., *Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers.* Hum Reprod, 2004. **19**(9): p. 2103-8.
111. Fancsovits, P., et al., *Early pronuclear breakdown is a good indicator of embryo quality and viability.* Fertil Steril, 2005. **84**(4): p. 881-7.
112. Salumets, A., et al., *Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures.* Hum Reprod, 2003. **18**(4): p. 821-5.
113. Tesarik, J., et al., *Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a simple, non-invasive examination of pronuclear morphology.* Hum Reprod, 2000. **15**(6): p. 1396-9.
114. Hammoud, I., et al., *How viable are zygotes in which the PN are still intact at 25 hours? Impact on the choice of embryo for transfer.* Fertil Steril, 2008. **90**(3): p. 551-6.
115. Gardner, D.K., et al., *Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers.* Fertil Steril, 1998. **69**(1): p. 84-8.

6- JUSTIFICATIVA:

A associação entre os parâmetros seminais e o desenvolvimento embrionário não está clara, os estudos apresentam grande divergência de informações, resultados conflitantes e populações heterogêneas. Não há dados nítidos na literatura sobre o efeito dos parâmetros seminais no desenvolvimento embrionário (clivagem precoce até o terceiro dia de desenvolvimento), considerando todas as características do desenvolvimento. A maioria dos estudos prefere avaliar pontualmente alguma característica (clivagem, blastulação ou fragmentação), como se o desenvolvimento fosse segmentado e uma etapa não dependesse da outra.

Como sabemos o processo de desenvolvimento embrionário é contínuo e depende de fatores masculinos e femininos. O melhor entendimento dos fatores masculinos vai nos permitir entender melhor o processo e futuramente, poder orientar melhor os casais inférteis.

7- OBJETIVOS

Principal:

Correlacionar os parâmetros seminais (concentração, motilidade, motilidade A+B) com o desenvolvimento embrionário (clivagem precoce, escore embrionário total e escore médio embrionário)

Secundários:

Estabelecer relação entre os parâmetros seminais e taxa de fertilização e clivagem.

8- HIPÓTESE NULA:

Não existe correlação entre os parâmetros seminais e desenvolvimento embrionário em pacientes submetidos a FIV ou ICSI

9- ARTIGO VERSÃO EM PORTUGUÊS

Parâmetros seminais como um fator prognóstico para desenvolvimento embrionário em pacientes submetidos a FIV ou ICSI

Stein, AC; Koff WJ; Silva DS; Santos KSD; Cunha Filho JS

Objetivo:: Avaliar a relação entre parâmetros seminais como fator prognóstico para o desenvolvimento embrionário em casais no primeiro ciclo de reprodução assistida submetidos a ICSI ou FIV convencional

Desenho: Estudo de coorte prospectivo

Local: Centro de Reprodução Humana Insemine

Pacientes: 290 casais com indicação de reprodução assistida.

Principal medida de desfecho: Parâmetros seminais e desenvolvimento embrionário.

Resultado(s): Analisando os parâmetros seminais após preparo e sua associação com clivagem precoce houve correlação com motilidade ($P=0,006$) e concentração ($P=0,002$). Entretanto não houve correlação com porcentagem de espermatozoides classificados como A+B ($P=0,075$). Em relação aos parâmetros seminais e clivagem precoce no grupo da FIV convencional existe correlação para motilidade ($P=0.028$) e concentração ($P=0.001$) e no grupo da ICSI não foi significativo para nenhum parâmetro. Com relação aos parâmetros seminais e escore embrionário médio, no grupo da FIV convencional existe correlação com a motilidade ($P=0.0001$) e motilidade A+B ($P=0.0001$), na ICSI apenas a concentração ($P=0.022$).

Conclusão(ões): Nosso estudo concluiu que existe correlação dos parâmetros seminais com a clivagem precoce no grupo da FIV convencional e nenhuma correlação destes parâmetros no grupo da ICSI. Em relação ao escore embrionário médio apresenta correlações tanto na FIV convencional quanto na ICSI.

Palavra Chaves: Parâmetros seminais, desenvolvimento embrionário, clivagem precoce, ICSI, FIV convencional, escore embrionário

Introdução

Estima-se que 10 a 15 % dos casais do mundo sejam inférteis [1], sendo que a infertilidade por causa masculina ocorre em cerca 50% dos casais [2] e em 30% destes ocorre uma associação de causas masculinas e femininas [3]. Na maioria dos centros de reprodução humana, o fator masculino é avaliado, principalmente, através da análise seminal, onde são analisados (concentração, morfologia e motilidade), seguindo critérios da OMS 1999 [4] e Kruger 1986 [5].

O desenvolvimento embrionário está na dependência de fatores masculinos e femininos. Dos fatores mais estudados como prognósticos para gestação, está o padrão do embrião no terceiro dia (dia da transferência) [6, 7], bem como clivagem precoce e evolução a blastocisto [8], associado a sua capacidade de prever gestação. O estudo da correlação destes fatores ao desfecho gravidez é muito difícil, uma vez que o número de pacientes estudados teria que ser muito grande, e na maioria das vezes ele ocorre em apenas 30% por embrião transferido.

Recentemente, foi realizada uma revisão sistemática para avaliar fatores associados com o sucesso na Fertilização *in vitro* [9], surpreendentemente os autores somente incluíram fatores relacionados a mulher. Isso mostra que, mesmo o fator masculino sendo responsável por 50% das causas de infertilidade, e levando-se em conta, que o desenvolvimento embrionário é um processo contínuo, e depende tanto do genoma feminino como do masculino, que é a incorporação do DNA paterno que se dá a partir de 4 células (segundo dia) [10], estes fatores estão sendo pouco avaliados.

Alguns autores já correlacionaram parâmetros seminais com o desenvolvimento a blastocisto, outros com clivagem precoce [8, 11-15], entretanto até agora nenhum autor correlacionou os parâmetros seminais com o desenvolvimento embrionário total.

O presente estudo tem como objetivo avaliar os parâmetros seminais como um fator prognóstico ao desenvolvimento embrionário (do momento da fecundação até a sua transferência) em pacientes submetidos a ICSI ou FIV.

Material e métodos

Delineamento/Pacientes

Foi realizado um estudo prospectivo (coorte) no Período de janeiro de 2009 até agosto de 2010 com casais inférteis (n=290) que foram submetidos ao primeiro ciclo de Reprodução Assistida (FIV ou ICSI) no Centro de Reprodução Humana Insemine. Como critérios de exclusão: falha na coleta masculina (n=1), ausência de resposta ovariana (n=3) e casais que quiseram se retirar do estudo (n=1), além de todos os homens azoospermicos (n=28). Todos os casais assinaram termo de consentimento livre e esclarecido para participar deste estudo.

Procedimentos

Todas as pacientes foram submetidas a hiperestimulação ovariana com uso de agonistas ou antagonistas do GnRH associado com gonadotrofina recombinante. O controle da indução foi feito com uso de ultra-som transvaginal e dosagem hormonal de estradiol, LH e progesterona. Quando, pelo menos 3 folículos atingiram 17mm de diâmetro médio, 1 ampola subcutânea de hCG recombinante (Ovidrel) foi administrada e a punção folicular realizada 36h após [16].

Punção Folicular e procura dos cumulus-oócitos (CCOs)

Os complexos *cumulus*-oócitos (CCO) foram recuperados por aspiração com uma agulha (CCD®) acoplada a um guia de ultrassom transvaginal 36h após a administração do hCG. Após punção de todos os folículos e a recuperação dos CCO, estes foram lavados em meio G-MOPS (Vitrolife®) e incubados na estufa a 37°C contendo 6% de CO₂ em ar e umidade saturada durante 3 a 6 horas.

Preparo Seminal

A amostra seminal do ejaculado foi obtida através de masturbação após 3 a 5 dias de abstinência, coletada entre sete e nove horas da manhã, e enviada imediatamente ao laboratório. Todas as amostras foram avaliadas pela mesma embriologista (DSS), seguindo os critérios da OMS, 1999 [4]. As variáveis utilizadas no nosso estudo foram: concentração (número de

espermatozóides em milhão/ml), motilidade (número total de espermatozóides móveis) e motilidade A+B (A=número de espermatozóides com movimento rápido e progressivo e B=número de espermatozóides com movimento lento e progressivo) [4].

O processamento de sêmen utilizado foi o do gradiente de densidade (Isolate – Irvine®), com 1mL do gradiente de 90% na porção inferior e 1mL do gradiente 50%, menos denso, sobre este. O sêmen foi depositado sobre o conjunto. O gradiente juntamente com o sêmen foi centrifugado a 1200rpm por 20 minutos, para separar os espermatozóides do plasma seminal, de outros elementos celulares e de debris. Obteve-se, no fundo do tubo, um sedimento contendo a fração de espermatozóides móveis. O sedimento resultante contendo os espermatozóides móveis foi re-suspendido em 1mL de G-IVF (Vitrolife®) e armazenado a 37°C até o momento da fertilização ou injeção.

Após o preparo do sêmen, sua concentração foi ajustada para que o material inseminado (FIV) possuísse um total de espermatozóides móveis entre 100.000 a 200.000 para cada oócito.

Injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI)

Minutos antes da ICSI, as células do *cumulus* dos oócitos foram removidas com hialuronidase a 1% (Hyase - Vitrolife®) por 30 segundos. Após este período as células foram retiradas pipetando-se os oócitos várias vezes com o auxílio de uma pipeta com diâmetro próximo ao do oócito. Os oócitos desnudos foram avaliados quanto à presença do primeiro corpúsculo polar, indicando estar em estágio de metáfase II .

Avaliações e cultivo embrionário

A avaliação embrionária foi realizada conforme escore embrionário apresentado por Fisch 2001 [8], sendo atribuído valores aos embriões, que no máximo podem atingir 100 pontos. Para tornar as pacientes comparáveis entre si (pois o número de embriões é diferente para as pacientes, variando de um a três.) criamos um escore médio embrionário.

Os embriões com maior pontuação foram transferidos, no terceiro dia de cultivo embrionário (media de 2 [1-3]). Foi utilizado progesterona micronizada na dose de 600 mg/dia

intravaginal. Sendo que embriões viáveis excedentes foram congelados. A clivagem precoce foi avaliada no primeiro dia (25-27h pós FIV convencional ou ICSI). Foi considerada clivagem precoce embriões que apresentavam duas células.

Análise estatística

Dados categóricos foram analisados com os testes qui-quadrado ou exato de Fisher. Variáveis contínuas foram comparadas com testes t de Student ou Mann-Whitney-U, dependendo de suas características. Foi utilizado o programa estatístico SPSS 12.0 e a análise dos dados foi considerada estatisticamente significativa quando $P < 0,05$.

Resultados

Foram analisados 290 ciclos de Reprodução Assistida (FIV ou ICSI) na sua primeira tentativa de forma prospectiva de janeiro de 2009 até agosto de 2010, onde obtivemos 1798 óvulos e 989 embriões. A média de idade (\pm desvio padrão) foi de 34 ± 5 anos para as mulheres e 39 ± 4 anos para os homens. Sessenta e oito por cento realizaram FIV convencional e 32% ICSI. As causas de infertilidade estão relatadas na tabela 1. A média de oócitos recuperados após punção folicular foi de $6,2 \pm 4,6$ com taxa de fertilização de 55% e clivagem de 97%. A taxa geral de gravidez clínica foi de 34% com taxa de implantação de 16%. O escore total embrionário (daqueles embriões transferidos) foi de 137 ± 80 .

Analisando os parâmetros seminais após preparo e sua associação com clivagem precoce (teste Spearman), houve correlação com motilidade ($CC=0,172$, $P=0,006$) e concentração ($CC=0,222$, $P=0,002$). Entretanto não houve correlação com porcentagem de espermatozoides classificados como A+B ($P=0,075$). O mesmo foi feito considerando como desfecho o escore embrionário total daqueles embriões transferidos. Todos os parâmetros estudados mostraram correlação significativa: motilidade ($CC=0,242$, $P=0,001$), A+B ($CC=0,215$, $P=0,001$) e concentração ($CC=0,145$, $P=0,032$). As características seminais estudadas estão apresentadas na tabela 2.

Depois, foi realizada uma análise dos casos submetidos a FIV convencional ou ICSI, para determinar se existe uma associação entre as técnicas utilizadas e o desenvolvimento embrionário. Os resultados reprodutivos são mostrados na tabela 3. Para determinar o impacto dos diferentes parâmetros seminais nos diferentes procedimentos (FIV ou ICSI) nos desfechos embrionários (escores embrionários e clivagem precoce), fez-se a correlação (Spearman) individualizando-se os procedimentos, como mostram as tabelas 4 a, b e c.

Discussão:

Nosso estudo demonstra, pela primeira vez na literatura, uma correlação dos parâmetros seminais com a clivagem precoce, exibindo relação significativa entre motilidade e concentração no grupo da FIV e nenhuma correlação destes parâmetros no grupo da ICSI.

Revisando a literatura, observamos que este é o primeiro trabalho que relaciona os parâmetros seminais com escore embrionário, avaliando o desenvolvimento embrionário como um todo. Sendo que nos demais trabalhos esta comparação se faz de maneira pontual, desfechos únicos e não relacionando o desenvolvimento embrionário desde sua primeira divisão celular até o momento da transferência. Outra particularidade de nosso estudo é que incluímos pacientes submetidos a FIV convencional e ICSI. Já outros autores [8], analisaram apenas mulheres submetidas a ICSI.

Comparando nossos achados com os outros autores, fica bem evidente que existe uma grande variedade observada nos parâmetros seminais, e o papel que eles apresentam como fatores prognósticos de fertilidade masculina, o que é um problema em debate contínuo [17-21]. Alguns estudos têm demonstrado que uma baixa concentração espermática, motilidade e morfologia foram bons preditores de baixas taxas de fertilização após FIV convencional ou ICSI [5, 22, 23].

Alguns autores demonstraram que os parâmetros seminais, índices de teratozoospermia e deformidade espermática não foram bons preditores na precisão para identificar resultados da FIV

[24], que não há influencia importante de nenhum parâmetro seminal nos resultados da ICSI. Evidenciado a falta de correlação ou ausência da mesma[25].

Ao passo que outros evidenciaram que nos casos de astenospermia há um alto risco de ausência de fertilização com FIV convencional (50%) [26], que a avaliação do índice de acrossoma maior que 7% associado a uma morfologia estrita menor que 5% tem significativa taxa de fertilização após FIV convencional de 70%, comparada a 40% quando o índice de acrossoma era menor que 7% [27], que no caso de casais com sêmen sub-fértil, o tratamento dos oócitos deve ser feito por ambas as técnicas FIV convencional e ICSI para a mesma paciente, para prevenir desta forma a falência total na fertilização após FIV convencional [28].

A influência da qualidade do gameta masculino no processo de formação de blastocistos fica bem evidente e demonstrada por diversos autores. Mulheres submetidas a ICSI com espermatozóides com origem testicular tem pior desempenho embrionário do que aquelas com gameta ejaculado [29-31].

O desenvolvimento embrionário é um processo contínuo, e que depende de fatores masculinos e femininos. A falta de correlação demonstrada em nosso estudo entre os parâmetros seminais e escore embrionário total no grupo da ICSI vem corroborar com os achados previamente descritos e clássicos de que o embrião humano, durante os estágios iniciais de desenvolvimento, é controlado pelo RNA-m herdado maternamente, bem como o genoma embrionário não é ativado até o estágio de 4 células [10].

Entretanto, alguns estudos têm demonstrado que proteínas presentes no espermatozóide (izumo, DE, anti ADAM) parecem ter papel importante no processo de fertilização [32]. Os estudos que demonstraram diminuição das taxas de clivagem e fertilização associadas a pobres parâmetros seminais, sugerem um início muito cedo dos efeitos paternos no desenvolvimento embrionário [33-35], porém cabe lembrar que a ICSI por si só também pode comprometer o desenvolvimento embrionário [36].

Acreditamos que o escore de avaliação proposto por Fisch [8], traduz melhor, bem como avalia melhor o desenvolvimento embrionário, já que o faz de forma contínua e desde fases

inicias. Outro autor [11] que avaliou apenas clivagem precoce demonstrou que existia uma significativa percentagem de embriões de boa qualidade nos grupos que clivam precocemente, bem como maior taxa de gestação por transferência, associada a uma alta taxa de gestação(38%)com único embrião do grupo de clivagem precoce e baixas taxas de gestação múltipla (18%); determinando que a clivagem precoce é um forte indicador de qualidade embrionária.

A avaliação da clivagem simétrica e menos de 20% de fragmentação na primeira divisão celular estavam entre os mais importantes parâmetros e foi atribuído maior significado, como demonstrado por outros autores [14, 37, 38]. Ao utilizarmos a avaliação embrionária proposta por Fisch, associado ao escore embrionário médio, proposto por nós, estamos permitindo a comparação mais efetiva entre os pacientes, uma vez que podemos comparar as taxas de fertilização, clivagem e gestação entre grupos onde foram transferidos um, dois ou três embriões, tornando estes grupos comparáveis entre si.

Alguns achados e características encontradas em nosso estudo devem ser comentados. Um deles, quanto ao número baixo de oócitos recuperados da punção, provavelmente explicado por sermos um centro de referência, onde temos um número muito grande de pacientes mau-responderas. Outro está relacionado aos próprios parâmetros seminais, e a grande variabilidade que existe com relação a estes.

Quando utilizamos os parâmetros seminais, deixamos de fora a morfologia, pois todos os parâmetros foram avaliados no dia do procedimento (ICSI ou FIV convencional) e a morfologia, por questões técnicas não é realizada neste dia, ela já vem avaliada pré tratamento de 2 a 3 meses antes. Nosso objetivo era justamente avaliar os diferentes parâmetros seminais após preparo do sêmen, no momento do procedimento reprodutivo (FIV ou ICSI).

Em conclusão, determinamos que existe correlação dos parâmetros seminais com a clivagem precoce, exibindo relação significativa entre motilidade e concentração no grupo da FIV e nenhuma correlação destes parâmetros no grupo da ICSI. Em relação ao escore embrionário

médio, existe correlação entre motilidade e motilidade (A+B) no grupo da FIV convencional e apenas a concentração no grupo da ICSI.

Nosso estudo abre uma nova perspectiva para um melhor entendimento de diversos fatores associados a fisiologia masculina envolvidos desenvolvimento embrionário, bem como na necessidade de estudarmos melhor fatores masculinos como prognósticos em casais submetidos a técnicas de reprodução assistida [35, 39-45]. A partir desses dados podemos sugerir um estudo grande englobando tantos os parâmetros masculinos, como os femininos, com relação ao desfecho final gestação.

Tabela 1 – Causas de infertilidade dos casais atendidos

	%
Endometriose	16
Ovulatória	16,6
Tubária	16
Masculina	20,7
Múltipla	28
Outras	2,7

Tabela 2 Características seminais antes e apos preparo do sêmen (media ±DP)

	Antes	Após
Motilidade (%)	60±17	85±12
A+B (%)	39±19	70±20
Concentração (milhão/ml)	44±30	82±48

P=0,001 em todas as análises comparado aos valores antes do preparo do sêmen. Teste t para amostras pareadas. Dados apresentados como média± DP.

Tabela 3 comparação entre os desfechos reprodutivos em mulheres submetidas a FIV convencional e ICSI (media \pm DP)

	FIV	ICSI	Estatística (P)**
Numero de oócitos (MII)	6,5 \pm 4	6,0 \pm 5	0,384
Fertilização (%)**	58	47	0,006
Clivagem precoce (%)**	86	71	0,004
Clivagem (%)	96	96	0,893
Escore embrionário total **	148 \pm 78	110 \pm 75	0,0001
Escore embrionário médio **	72 \pm 21	64 \pm 23	0,009
Implantação (%)	19	16	0,658
Gestação (%)	35	33	0,804

** t-student test para dados contínuos e qui-quadrado para categóricos. P<0,05.

Dados apresentados como média \pm DP.

FIV= Fertilização *in vitro*. ICSI= Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide

Tabela 4a Coeficiente de correlação (CC) dos parâmetros seminais após preparo para ICSI ou FIV e escore embrionário total. *P<0,05

Escore embrionário total	FIV	ICSI
Motilidade	CC=0,232	CC=0,09
	P=0,002 *	P=0,518
A+B	CC=0,194	CC=0,085
	P=0,010 *	P=0,545
Concentração	CC=0,133	CC=0,242
	P=0,078	P=0,109

FIV= Fertilização *in vitro*. ICSI= Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide

Tabela 4b Coeficiente de correlação (CC) dos parâmetros seminais após preparo para ICSI ou FIV e escore embrionário médio. *P<0,05

Escore embrionário médio	FIV	ICSI
Motilidade	CC=0,297	CC=0,113
	P=0,0001 *	P=0,438
A+B	CC=0,332	CC=0,093
	P=0,0001 *	P=0,530
Concentração	CC=0,144	CC=0,357
	P=0,062	P=0,022 *

FIV= Fertilização *in vitro*. ICSI= Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide

Tabela 4c Coeficiente de correlação (CC) dos parâmetros seminais após preparo para ICSI ou FIV e clivagem precoce. *P<0,05

Clivagem precoce	FIV	ICSI
Motilidade	CC=0,160	CC=0,122
	P=0,028 *	P=0,370
A+B	CC=0,063	CC=0,070
	P=0,653	P=0,610
Concentração	CC=0,234	CC=0,104
	P=0,001 *	P=0,489

FIV= Fertilização *in vitro*. ICSI= Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide

Bibliografia

1. Chambers, G.M., et al., *The economic impact of assisted reproductive technology: a review of selected developed countries*. *Fertil Steril*, 2009. **91**(6): p. 2281-94.
2. Kim, E.D. and L.I. Lipshultz, *Male subfertility: diagnostic and therapeutic advances*. *Br J Urol*, 1997. **80**(4): p. 633-41.
3. Razvi, K., et al., *The clinical management of male infertility*. *Singapore Med J*, 1999. **40**(4): p. 291-7.
4. *WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction.*, W.H. Organization., Editor. 1993, 1999, Cambridge University Press: New York. p. 13-80.
5. Kruger, T.F., et al., *Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization*. *Fertil Steril*, 1986. **46**(6): p. 1118-23.
6. Veeck, L., *Atlas of the human oocyte and early conceptus.*, ed. W. Wilkins. 1991, Baltimore.

7. Puissant, F., et al., *Embryo scoring as a prognostic tool in IVF treatment*. Hum Reprod, 1987. **2**(8): p. 705-8.
8. Fisch, J.D., et al., *The Graduated Embryo Score (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage-stage embryos*. Hum Reprod, 2001. **16**(9): p. 1970-5.
9. van Loendersloot, L.L., et al., *Predictive factors in in vitro fertilization (IVF): a systematic review and meta-analysis*. Hum Reprod Update, 2010. **16**(6): p. 577-89.
10. Braude, P., V. Bolton, and S. Moore, *Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development*. Nature, 1988. **332**(6163): p. 459-61.
11. Fu, J., et al., *The influence of early cleavage on embryo developmental potential and IVF/ICSI outcome*. J Assist Reprod Genet, 2009. **26**(8): p. 437-41.
12. Fancsovits, P., et al., *Early pronuclear breakdown is a good indicator of embryo quality and viability*. Fertil Steril, 2005. **84**(4): p. 881-7.
13. Salumets, A., et al., *Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures*. Hum Reprod, 2003. **18**(4): p. 821-5.
14. Tesarik, J., et al., *Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a simple, non-invasive examination of pronuclear morphology*. Hum Reprod, 2000. **15**(6): p. 1396-9.
15. Hammoud, I., et al., *How viable are zygotes in which the PN are still intact at 25 hours? Impact on the choice of embryo for transfer*. Fertil Steril, 2008. **90**(3): p. 551-6.
16. Olivennes, F., et al., *The use of GnRH antagonists in ovarian stimulation*. Hum Reprod Update, 2002. **8**(3): p. 279-90.
17. Guzick, D.S., et al., *Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men*. N Engl J Med, 2001. **345**(19): p. 1388-93.
18. Menkveld, R., et al., *Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds*. Hum Reprod, 2001. **16**(6): p. 1165-71.
19. Repping, S., et al., *Use of the total motile sperm count to predict total fertilization failure in in vitro fertilization*. Fertil Steril, 2002. **78**(1): p. 22-8.
20. Keegan, B.R., et al., *Isolated teratozoospermia does not affect in vitro fertilization outcome and is not an indication for intracytoplasmic sperm injection*. Fertil Steril, 2007. **88**(6): p. 1583-8.
21. van Weert, J.M., et al., *A prediction model for ongoing pregnancy after in vitro fertilization in couples with male subfertility*. J Reprod Med, 2008. **53**(4): p. 250-6.
22. Strassburger, D., et al., *Very low sperm count affects the result of intracytoplasmic sperm injection*. J Assist Reprod Genet, 2000. **17**(8): p. 431-6.
23. Freeman, M.R., et al., *Male partner screening before in vitro fertilization: preselecting patients who require intracytoplasmic sperm injection with the sperm penetration assay*. Fertil Steril, 2001. **76**(6): p. 1113-8.
24. Chen, X., et al., *Predictive value of semen parameters in in vitro fertilisation pregnancy outcome*. Andrologia, 2009. **41**(2): p. 111-7.
25. Nagy, Z., et al., *Using ejaculated, fresh, and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection*. Fertil Steril, 1995. **63**(4): p. 808-15.
26. Verheyen, G., et al., *Controlled comparison of conventional in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in patients with asthenozoospermia*. Hum Reprod, 1999. **14**(9): p. 2313-9.
27. Soderlund, B. and K. Lundin, *Acrosome index is not an absolute predictor of the outcome following conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection*. J Assist Reprod Genet, 2001. **18**(9): p. 483-9.

28. van der Westerlaken, L., et al., *Conventional in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in patients with borderline semen: a randomized study using sibling oocytes*. Fertil Steril, 2006. **85**(2): p. 395-400.
29. Miller, J.E. and T.T. Smith, *The effect of intracytoplasmic sperm injection and semen parameters on blastocyst development in vitro*. Hum Reprod, 2001. **16**(5): p. 918-24.
30. Goker, E.N., et al., *Comparison of the ICSI outcome of ejaculated sperm with normal, abnormal parameters and testicular sperm*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2002. **104**(2): p. 129-36.
31. Balaban, B., et al., *Blastocyst transfer following intracytoplasmic injection of ejaculated, epididymal or testicular spermatozoa*. Hum Reprod, 2001. **16**(1): p. 125-129.
32. Ron-el, R., et al., *Delayed fertilization and poor embryonic development associated with impaired semen quality*. Fertil Steril, 1991. **55**(2): p. 338-44.
33. Loutradi, K.E., et al., *The effects of sperm quality on embryo development after intracytoplasmic sperm injection*. J Assist Reprod Genet, 2006. **23**(2): p. 69-74.
34. Sakkas, D., et al., *Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development*. Hum Reprod, 1998. **13 Suppl 4**: p. 11-9.
35. Ahmadi, A. and S.C. Ng, *Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa*. J Exp Zool, 1999. **284**(6): p. 696-704.
36. Griffiths, T.A., A.P. Murdoch, and M. Herbert, *Embryonic development in vitro is compromised by the ICSI procedure*. Hum Reprod, 2000. **15**(7): p. 1592-6.
37. Zaninovic, N., Veeck, L.L., Clarke, R. et al, *Early assessment of human pre-embryos as an indicator for potential blastocyst development (Abstract)*. Fertil Steril, 2000. **74**((Suppl. 1)).
38. Wittemer, C., et al., *Zygote evaluation: an efficient tool for embryo selection*. Hum Reprod, 2000. **15**(12): p. 2591-7.
39. Primakoff, P. and D.G. Myles, *Cell-cell membrane fusion during mammalian fertilization*. FEBS Lett, 2007. **581**(11): p. 2174-80.
40. El-Ghobashy, A.A. and C.R. West, *The human sperm head: a key for successful fertilization*. J Androl, 2003. **24**(2): p. 232-8.
41. Lopes, S., A. Jurisicova, and R.F. Casper, *Gamete-specific DNA fragmentation in unfertilized human oocytes after intracytoplasmic sperm injection*. Hum Reprod, 1998. **13**(3): p. 703-8.
42. Schoysman, R., *Clinical situations challenging the established concept of epididymal physiology in the human*. Acta Eur Fertil, 1993. **24**(2): p. 55-60.
43. Florman, H.a.D., T., *Mammalian Fertilization*, in *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, J.D. Neill, Ed, Editor. 2006, Elsevier, Inc. p. 55-112.
44. Balaban, B., et al., *In-vitro culture of spermatozoa induces motility and increases implantation and pregnancy rates after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection*. Hum Reprod, 1999. **14**(11): p. 2808-11.
45. Hu, Y., et al., *Clinical application of intracytoplasmic sperm injection using in vitro cultured testicular spermatozoa obtained the day before egg retrieval*. Fertil Steril, 1999. **72**(4): p. 666-9.

10- ARTIGO VERSÃO EM INGLÊS

Seminal parameters as prognostic factors for embryo development in IVF or ICSI patients

Stein AC, Koff WJ, Silva DS, Santos KSD, Cunha Filho JS

Objective: To evaluate the relationship among seminal parameters as prognostic factors for embryonic development in couples undergoing conventional IVF or ICSI during their first cycle of assisted reproduction.

Design: Prospective cohort study.

Setting: Insemine Center for Human Reproduction.

Patients: 290 couples with an indication for assisted reproduction.

Main Outcome Measure: Seminal parameters and embryonic development.

Results: By analyzing the seminal parameters after semen preparation and assessing their association with early cleavage, correlations occurred with motility ($P = 0.006$) and concentration ($P = 0.002$). However, there was no correlation with the percentage of sperm classified as A + B ($P = 0.075$). In assessing the semen parameters and early cleavage in the conventional IVF group, there were correlations with motility ($P = 0.028$) and concentration ($P = 0.001$); however, there were no correlations found in the ICSI group. With regard to seminal parameters and average embryonic scoring, there were correlations with sperm motility ($P = 0.0001$) and motility A + B ($P = 0.0001$) in the conventional IVF group, and there was a correlation with concentration ($P = 0.022$) in the ICSI group.

Conclusions: Our study found correlations between seminal parameters and early cleavage in the conventional IVF group but no correlation in the ICSI group. There were correlations in both conventional IVF and ICSI groups with regards to the average embryonic scoring.

Key Words: seminal parameters, embryo development, early cleavage, ICSI, conventional IVF, embryonic scoring.

Introduction

It is estimated that 10-15% of couples in the world are infertile [1], with male infertility occurring in about 50% of couples [2] and a combination of male and female causes in 30% of couples [3]. In most centers for human reproduction, the male factor is evaluated mainly by seminal analysis, which analyzes the concentration, motility and morphology of the semen, following World Health Organization [4] and Kruger [5] criteria.

Embryonic development depends on male and female factors. The morphology of a third-day embryo (day of transfer) [6, 7], early cleavage and developing blastocyst [8] are the most studied factors in embryonic development and are associated with their ability to predict pregnancy. The correlation between these factors and pregnancy outcome is very difficult, since the number of patients would have to be very large and, in most times, pregnancy occurs in only 30% of the transferred embryos.

Recently a systematic review has intended to study factors associated with pregnancy outcomes in IVF cycles [9]. Surprisingly, authors have included only female factors that could alter embryonic development. It shows that, even though, male factors are involved in 50% of infertility cases and embryonic development is a continuous process that depends on male and female genome, the incorporation of male DNA in the human embryo occurs after the 4 cell stage [10], male factors have been neglected from recent literature [9].

Some authors have studied the correlation between seminal parameters with blastocyst formation, others with early cleavage [8, 11-15]. However, no author has tried to correlate seminal parameters with the complete embryonic development.

This study evaluated semen parameters as prognostic factors in embryonic development from the moment of conception until transfer into patients undergoing IVF or intracytoplasmic sperm injection (ICSI).

Materials and methods

Design / patients

A prospective study was conducted from January 2009 to August 2010 on infertile couples (n = 290) who underwent their first cycle of assisted reproduction (IVF or ICSI) at the Insemine Center for Human Reproduction. Exclusion criteria included the following: failure to collect semen (n = 1), absence of ovarian response (n = 3), couples whom withdrew from the study (n = 1), and azoospermic men (n=28). All couples signed an informed consent form to participate in this study.

Procedures

All patients underwent ovarian hyperstimulation with the use of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonists or antagonists associated with recombinant gonadotropins. The control of ovarian induction was performed with a transvaginal ultrasound and hormonal doses of estradiol, luteinizing hormone (LH) and progesterone. When a minimum of three follicles reached 17 mm in diameter, an ampoule of subcutaneous, recombinant human chorionic gonadotropin (hCG, Ovidrel) was administered, and follicle puncture was performed 36 hours later [16].

Follicle puncture and recovery of the cumulus-oocyte complexes

The cumulus-oocyte complexes (COCs) were recovered by aspiration with a needle (CCD[®]) attached to a transvaginal ultrasound guide 36 hours after hCG administration. After puncturing all follicles and recovering the COCs, the COCs were washed in G-MOPS medium (Vitrolife[®]) and incubated at 37°C in 6% CO₂ and saturated humidity for 3 to 6 hours.

Semen Preparation

The ejaculated semen samples were obtained by masturbation, with three to five days of abstinence, between seven and nine A.M. and sent immediately into the laboratory. All samples were analyzed by the same embryologist (D.S.S), following W.H.O 1999 criteria [4]. Variables studied were concentration (millions/ml), motility (total number of motile spermatozoa), and A+B motility (A=number of rapid and progressive movement spermatozoa; B=number of slow progressive movement spermatozoa).

The semen was processed using a density gradient (Isolate, Irvine®) with 1 ml of the 90% gradient (in the lower portion) and 1 ml of the less dense 50% gradient. The semen was deposited across the gradient. The gradient and semen were centrifuged at 1,200 rpm for 20 minutes to separate the sperm from the seminal plasma, other cellular elements and debris. A pellet containing the motile sperm fraction was collected at the bottom of the tube. The resulting pellet was resuspended in 1 ml of G-IVF (Vitrolife®) and stored at 37°C until the moment of fertilization or injection.

After semen preparation, their concentrations were adjusted so that inseminated material (IVF) would present a total, motile sperm count from 100,000 to 200,000 for each oocyte.

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI)

Minutes before ICSI, the COCs were removed with hyaluronidase (1%, Hyase, Vitrolife®) for 30 seconds. After this period, cells were removed by pipetting the oocytes several times with the aid of a pipette with a diameter close to that of the oocyte. The denuded oocytes were evaluated for the presence of their first polar body, indicating the metaphase II stage.

Evaluations and embryo development

The embryonic evaluation was performed according to the embryonic scoring presented by Fisch (2001) [8], with values assigned to embryos that reach up to 100 points. We created an average embryonic score for patients to be comparable with each other, since the number of embryos is different for each patient (ranging from one to three). The embryos with the highest scores (an average of two) were transferred on the third day of embryonic development (1-3), and micronized progesterone was administered at a dose of 600 mg/day intravaginally. Any excess viable embryos were frozen. Early cleavage was evaluated checking zygotes in the afternoon of day 1 (25-27h after insemination/microinjection), and embryos displaying two cells at inspection were considered as early cleaved.

Statistical analysis

Categorical data were analyzed using the chi-square or Fisher's exact test. Continuous variables were compared using Student's t-test or the Mann-Whitney U test, depending on their characteristics. The SPSS 12.0 statistical software was used, and data analysis was considered statistically significant when $P < 0.05$.

Results

We prospectively analyzed 290 cycles of assisted reproduction (IVF or ICSI) in its first attempt from January 2009 to August 2010, which obtained 1,798 eggs and 989 embryos. The mean ages (\pm SD) were 34 ± 5 years for women and 39 ± 4 years for men. Of these cases, 68% underwent conventional IVF and 32% were submitted to ICSI. The causes of infertility are reported in Table 1. The mean number of oocytes recovered after follicle puncture was 6.2 ± 4.6 , the fertilization rate was 55% and the cleavage rate was 97%. The overall clinical pregnancy rate was 34%, and the implantation rate was 16%. The total embryonic score of the transferred embryos was 137 ± 80 .

Analysis of the seminal parameters after preparation and their association with early cleavage (Spearman's rank correlation test) were performed. Correlations were found between motility (CC = 0.172, $P = 0.006$) and concentration (CC = 0.222, $P = 0.002$). However, there was no correlation between the percentage of sperm classified as A + B ($P = 0.075$) and early cleavage. When considering the total embryonic score of the transferred embryos as an outcome, all parameters studied showed significant correlations. These correlations were as follows: motility (CC = 0.242, $P = 0.001$), A + B (CC = 0.215, $P = 0.001$) and concentration (CC = 0.145, $P = 0.032$). The seminal characteristics are presented in Table 2.

Analyses were performed on the cases undergoing conventional IVF or ICSI treatment to determine whether an association existed between these techniques and embryonic development. These reproductive results are shown in Table 3. To determine the impact of the different seminal parameters on the two types of procedures (IVF or ICSI) and on the embryonic outcomes (early

cleavage and embryonic scores), the Spearman's rank correlation test was performed (Table 4 a, b and c).

Discussion:

Our study demonstrates, for the first time, a correlation between seminal parameters and early cleavage. We demonstrated that early cleavage has a significant relationship between sperm concentration and motility in the IVF group and no correlation between these parameters in the ICSI group. In other studies, this comparison was performed with a single outcome and did not look at embryonic development from its first cell division until the time of transfer. Moreover, our study included patients who underwent conventional IVF and ICSI, while other studies analyzed only women who underwent ICSI [8].

When comparing our results to others, much variation is observed in using seminal parameters as prognostic factors in male fertility, which is an issue that is still under discussion [17-21]. Some studies have shown that low sperm concentration, motility and morphology are good predictors for low rates of fertilization after conventional IVF or ICSI [5, 22, 23]. In addition, this is the first study that relates seminal parameters with embryonic scoring and evaluates the embryonic development as a whole.

Some authors have shown that seminal parameters, teratozoospermia and sperm deformity rates are not accurate predictors for identifying IVF outcomes [24] and that these rates do not significantly influence ICSI results [25]. Patients who presented asthenospermia have high risk of lack of fertilization in conventional IVF cycles (50%) [26]. An acrosome index greater than 7% associated with normal strict morphology of less than 5% is associated with a 70% fertilization rate after conventional IVF, compared to 40% when the acrosome index is less than 7% [27]. In couples with sub-fertile sperm, the oocyte treatment should be performed by both conventional IVF and ICSI techniques for the same patient to prevent a total failure of fertilization after conventional IVF [28]. The influence of the male gamete quality on the process of blastocyst formation is evident

and has been demonstrated by several authors. Women undergoing ICSI with testicular sperm show worse performance than those with ejaculated sperm [29-31].

Embryonic development is a continuous process, which depends on male and female factors. This lack of correlation between seminal parameters and total embryonic score in the ICSI group corroborates with earlier findings. These studies describe classic findings during the early stages of development. The most important study regarding human embryo genomic development demonstrated that human embryo is controlled by inherited maternal m-RNA, and the embryonic genome is not activated until the 4-cell stage [10].

However, some studies have shown that proteins present in sperm (Izumo, DE, anti ADAM) have an important role in the fertilization process [32]. Studies that show lower rates of fertilization and cleavage and are associated with poor seminal parameters suggest a very early onset of paternal effects on embryonic development [33-35]. It is worth noting that the ICSI procedure itself may affect embryonic development [36].

We think that the Fisch evaluation score better translates and evaluates embryonic development because it evaluates embryo development continuously since the early stages [8]. Another study evaluated only early cleavage and showed that there were a significant percentage of good quality embryos in groups that cleave early [11]. This study also showed higher pregnancy rates per transfer, which were associated with a high, single-embryo pregnancy rate (38%) and low rates of multiple pregnancies (18%) in the early cleavage group. This suggests that early cleavage is a strong indicator of embryo quality [11].

The symmetric cleavage evaluation and the fact of having less than 20% fragmentation in the first cellular division are among the most important parameters evaluated in embryonic development, as demonstrated by other authors [14, 37, 38]. By using the embryonic evaluation proposed by Fisch and the average embryonic scoring proposed by us, a more effective comparison among patients occurs. This is because the rates of fertilization, cleavage and pregnancy are compared within the groups where one, two or three embryos are transferred, making these groups comparable among each other.

Some findings and characteristics found in our study should be mentioned. First, the low number of oocytes retrieved from the puncture is probably due to the patients being from a reference center, and there are a high number of nonresponsive patients. Secondly, there is great variability in the seminal parameters. Seminal parameters were all evaluated on the day of the procedure. Morphology was excluded from our analysis because precise evaluation of this parameter is the procedure day is not possible due to technical difficulties and in our center, this criterion is evaluated two to three months before treatment. Our goal was to precisely evaluate the different seminal parameters at the time of reproductive procedures (IVF or ICSI).

In conclusion, we determined a correlation between seminal parameters and early cleavage and showed a significant relationship between sperm concentration and motility in the IVF group but not the ICSI group. In using the average embryonic score there is a correlation between total motility and (A + B) motility in the conventional IVF group and between this score and concentration in the ICSI group were observed.

Our study shows a new perspective on understanding the various factors associated with male physiology in embryonic development and the need to better study male factors as prognostic factors in couples undergoing assisted reproductive technology (ART) [35, 39-45]. From this data, we suggest a larger study that encompasses both male and female parameters to evaluate the final outcome of pregnancy.

Table 1. Causes of infertility in treated couples.

Cause	%
Endometriosis	16
Ovulation	16.6
Tubal	16
Masculine	20.7
Multiple	28
Other	2.7

Table 2. Seminal characteristics before and after semen preparation.

Characteristic	Before	After
Motility (%)	60 ± 17	85 ± 12
A+B (%)	39 ± 19	70 ± 20
Concentration (million / ml)	44 ± 30	82 ± 48

P = 0.001 for all analyses compared to values before semen preparation

Student's t-test performed for paired samples.

Data presented as mean ± SD.

Table 3. Comparisons from the reproductive outcomes in women undergoing conventional IVF and ICSI .

Reproductive Outcome	IVF	ICSI	P value
Number of oocytes (MII)	6.5 ± 4	6.0 ± 5	0.384
Fertilization (%) **	58	47	0.006
Early cleavage (%) **	86	71	0.004
Cleavage (%)	96	96	0.893
Total embryonic score **	148 ± 78	110 ± 75	0.0001
Average embryonic score **	72 ± 21	64 ± 23	0.009
Implantation (%)	19	16	0.658
Pregnancy (%)	35	33	0.804

** Student's t- test was performed for the continuous data and the chi-square test for the categorical data. P<0.05

Data are presented as mean ± SD.

IVF = *in vitro* fertilization. ICSI = intracytoplasmic sperm injection.

Table 4a. Correlation coefficients (CCs) of the seminal parameters after preparation for ICSI or IVF and total embryonic score. * P<0,05

total embryonic score	IVF	ICSI
Motility	CC = 0.232	CC = 0.09
	P = 0.002 *	P = 0.518
A+B	CC = 0.194	CC = 0.085
	P = 0.010 *	P = 0.545
Concentration	CC = 0.133	CC = 0.242
	P = 0.078	P = 0.109

IVF = *in vitro* fertilization. ICSI = intracytoplasmic sperm injection

Table 4b. Correlation coefficients (CCs) of the seminal parameters after preparation for ICSI or IVF and average embryonic score. * P<0,05

average embryonic score	IVF	ICSI
Motility	CC = 0.297	CC = 0.113
	P = 0.0001 *	P = 0.438
A+B	CC = 0.332	CC = 0.093
	P = 0.0001 *	P = 0.530
Concentration	CC = 0.144	CC = 0.357
	P = 0.062	P = 0.022 *

IVF = *in vitro* fertilization. ICSI = intracytoplasmic sperm injection

Table 4c. Correlation coefficients (CCs) of the seminal parameters after preparation for IVF and ICSI and early cleavage. * P<0,05

Early cleavage	IVF	ICSI
Motility	CC = 0.160	CC = 0.122
	P = 0.028 *	P = 0.370
A+B	CC = 0.063	CC = 0.070
	P = 0.653	P = 0.610
Concentration	CC = 0.234	CC = 0.104
	P = 0.001 *	P = 0.489

IVF = *in vitro* fertilization. ICSI = intracytoplasmic sperm injection.

Bibliography

1. Chambers, G.M., et al., *The economic impact of assisted reproductive technology: a review of selected developed countries*. Fertil Steril, 2009. **91**(6): p. 2281-94.
2. Kim, E.D. and L.I. Lipshultz, *Male subfertility: diagnostic and therapeutic advances*. Br J Urol, 1997. **80**(4): p. 633-41.
3. Razvi, K., et al., *The clinical management of male infertility*. Singapore Med J, 1999. **40**(4): p. 291-7.

4. WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction., W.H. Organization., Editor. 1993, 1999, Cambridge University Press: New York. p. 13-80.
5. Kruger, T.F., et al., *Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization*. Fertil Steril, 1986. **46**(6): p. 1118-23.
6. Veeck, L., *Atlas of the human oocyte and early conceptus.*, ed. W. Wilkins. 1991, Baltimore.
7. Puissant, F., et al., *Embryo scoring as a prognostic tool in IVF treatment*. Hum Reprod, 1987. **2**(8): p. 705-8.
8. Fisch, J.D., et al., *The Graduated Embryo Score (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage-stage embryos*. Hum Reprod, 2001. **16**(9): p. 1970-5.
9. van Loendersloot, L.L., et al., *Predictive factors in in vitro fertilization (IVF): a systematic review and meta-analysis*. Hum Reprod Update, 2010. **16**(6): p. 577-89.
10. Braude, P., V. Bolton, and S. Moore, *Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development*. Nature, 1988. **332**(6163): p. 459-61.
11. Fu, J., et al., *The influence of early cleavage on embryo developmental potential and IVF/ICSI outcome*. J Assist Reprod Genet, 2009. **26**(8): p. 437-41.
12. Fancsovits, P., et al., *Early pronuclear breakdown is a good indicator of embryo quality and viability*. Fertil Steril, 2005. **84**(4): p. 881-7.
13. Salumets, A., et al., *Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures*. Hum Reprod, 2003. **18**(4): p. 821-5.
14. Tesarik, J., et al., *Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a simple, non-invasive examination of pronuclear morphology*. Hum Reprod, 2000. **15**(6): p. 1396-9.
15. Hammoud, I., et al., *How viable are zygotes in which the PN are still intact at 25 hours? Impact on the choice of embryo for transfer*. Fertil Steril, 2008. **90**(3): p. 551-6.
16. Olivennes, F., et al., *The use of GnRH antagonists in ovarian stimulation*. Hum Reprod Update, 2002. **8**(3): p. 279-90.
17. Guzick, D.S., et al., *Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men*. N Engl J Med, 2001. **345**(19): p. 1388-93.
18. Repping, S., et al., *Use of the total motile sperm count to predict total fertilization failure in in vitro fertilization*. Fertil Steril, 2002. **78**(1): p. 22-8.
19. Keegan, B.R., et al., *Isolated teratozoospermia does not affect in vitro fertilization outcome and is not an indication for intracytoplasmic sperm injection*. Fertil Steril, 2007. **88**(6): p. 1583-8.
20. van Weert, J.M., et al., *A prediction model for ongoing pregnancy after in vitro fertilization in couples with male subfertility*. J Reprod Med, 2008. **53**(4): p. 250-6.
21. Menkveld, R., et al., *Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds*. Hum Reprod, 2001. **16**(6): p. 1165-71.
22. Strassburger, D., et al., *Very low sperm count affects the result of intracytoplasmic sperm injection*. J Assist Reprod Genet, 2000. **17**(8): p. 431-6.

23. Freeman, M.R., et al., *Male partner screening before in vitro fertilization: preselecting patients who require intracytoplasmic sperm injection with the sperm penetration assay*. Fertil Steril, 2001. **76**(6): p. 1113-8.
24. Chen, X., et al., *Predictive value of semen parameters in in vitro fertilisation pregnancy outcome*. Andrologia, 2009. **41**(2): p. 111-7.
25. Nagy, Z., et al., *Using ejaculated, fresh, and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection*. Fertil Steril, 1995. **63**(4): p. 808-15.
26. Verheyen, G., et al., *Controlled comparison of conventional in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in patients with asthenozoospermia*. Hum Reprod, 1999. **14**(9): p. 2313-9.
27. Soderlund, B. and K. Lundin, *Acrosome index is not an absolute predictor of the outcome following conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection*. J Assist Reprod Genet, 2001. **18**(9): p. 483-9.
28. van der Westerlaken, L., et al., *Conventional in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in patients with borderline semen: a randomized study using sibling oocytes*. Fertil Steril, 2006. **85**(2): p. 395-400.
29. Miller, J.E. and T.T. Smith, *The effect of intracytoplasmic sperm injection and semen parameters on blastocyst development in vitro*. Hum Reprod, 2001. **16**(5): p. 918-24.
30. Goker, E.N., et al., *Comparison of the ICSI outcome of ejaculated sperm with normal, abnormal parameters and testicular sperm*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2002. **104**(2): p. 129-36.
31. Balaban, B., et al., *Blastocyst transfer following intracytoplasmic injection of ejaculated, epididymal or testicular spermatozoa*. Hum Reprod, 2001. **16**(1): p. 125-129.
32. Ron-el, R., et al., *Delayed fertilization and poor embryonic development associated with impaired semen quality*. Fertil Steril, 1991. **55**(2): p. 338-44.
33. Loutradi, K.E., et al., *The effects of sperm quality on embryo development after intracytoplasmic sperm injection*. J Assist Reprod Genet, 2006. **23**(2): p. 69-74.
34. Sakkas, D., et al., *Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability*. Hum Reprod, 1998. **13**(1): p. 182-7.
35. Ahmadi, A. and S.C. Ng, *Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa*. J Exp Zool, 1999. **284**(6): p. 696-704.
36. Griffiths, T.A., A.P. Murdoch, and M. Herbert, *Embryonic development in vitro is compromised by the ICSI procedure*. Hum Reprod, 2000. **15**(7): p. 1592-6.
37. Zaninovic, N., Veeck, L.L., Clarke, R. et al, *Early assessment of human pre-embryos as an indicator for potential blastocyst development (Abstract)*. Fertil Steril, 2000. **74**((Suppl. 1)).
38. Wittemer, C., et al., *Zygote evaluation: an efficient tool for embryo selection*. Hum Reprod, 2000. **15**(12): p. 2591-7.
39. Primakoff, P. and D.G. Myles, *Cell-cell membrane fusion during mammalian fertilization*. FEBS Lett, 2007. **581**(11): p. 2174-80.
40. El-Ghobashy, A.A. and C.R. West, *The human sperm head: a key for successful fertilization*. J Androl, 2003. **24**(2): p. 232-8.

41. Lopes, S., A. Jurisicova, and R.F. Casper, *Gamete-specific DNA fragmentation in unfertilized human oocytes after intracytoplasmic sperm injection*. Hum Reprod, 1998. **13**(3): p. 703-8.
42. Schoysman, R., *Clinical situations challenging the established concept of epididymal physiology in the human*. Acta Eur Fertil, 1993. **24**(2): p. 55-60.
43. Florman, H.a.D., T., *Mammalian Fertilization*, in *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, J.D. Neill, Ed, Editor. 2006, Elsevier, Inc. p. 55-112.
44. Balaban, B., et al., *In-vitro culture of spermatozoa induces motility and increases implantation and pregnancy rates after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection*. Hum Reprod, 1999. **14**(11): p. 2808-11.
45. Hu, Y., et al., *Clinical application of intracytoplasmic sperm injection using in vitro cultured testicular spermatozoa obtained the day before egg retrieval*. Fertil Steril, 1999. **72**(4): p. 666-9.

11- CONCLUSÕES

1- Com relação aos parâmetros seminais analisados (concentração, motilidade e motilidade A+B) após preparo e escore embrionário total:

1.1- No grupo da FIV convencional houve correlação entre motilidade, motilidade A+B e escore embrionário total

1.2- No grupo da FIV convencional não houve correlação entre concentração e escore embrionário total

1.3- No grupo da ICSI não houve correlação entre nenhum parâmetro analisado e escore embrionário total

2- Com relação aos parâmetros seminais analisados (concentração, motilidade e motilidade A+B) após preparo e escore embrionário médio:

2.1- No grupo da FIV convencional houve correlação entre motilidade, motilidade A+B e escore embrionário médio.

2.2- No grupo da FIV convencional não houve correlação entre concentração e escore embrionário médio

2.3- No grupo da ICSI houve correlação entre concentração e escore embrionário médio.

2.4- No grupo da ICSI não houve correlação entre motilidade, motilidade A+B e escore embrionário médio.

3- Com relação aos parâmetros seminais analisados (concentração, motilidade e motilidade A+B) após preparo e clivagem precoce:

3.1- No grupo da FIV convencional houve correlação entre motilidade, concentração e clivagem precoce

3.2- No grupo da FIV convencional não houve correlação entre motilidade A+B e clivagem precoce

3.3- No grupo da ICSI não houve correlação entre nenhum parâmetro seminal (motilidade, motilidade A+B e concentração) e clivagem precoce.

12- ANEXOS

12.1- Rotinas de laboratório e avaliação do embrião

Punção Folicular e procura dos complexos cumulus-oócitos (CCOs)

Os complexos *cumulus*-oócitos (CCO) foram recuperados por aspiração com uma agulha (CCD®) acoplada a um guia de ultrassom transvaginal 36h após a administração do hCG. Após punção de todos os folículos e a recuperação dos CCO, estes foram lavados em meio G-MOPS (Vitrolife®) e incubados na estufa a 37°C contendo 6% de CO₂ em ar e umidade saturada durante 3 a 6 horas. Essa incubação era feita para facilitar a maturação citoplasmática e nuclear final antes de ser realizada a FIV ou ICSI. Durante a maturação dos oócitos e a finalização do processo meiótico, o aglomerado de células da granulosa (*cumulus*) que os circunda, sofre um processo de dispersão, fato que assume uma importância prática como indicador indireto da evolução morfológica da maturação.

Coleta de sêmen

A amostra seminal do ejaculado foi obtida através de masturbação e enviada imediatamente ao laboratório. O processamento de sêmen utilizado foi o do gradiente de densidade (Isolate – Irvine®), com 1mL do gradiente de 90% na porção inferior e 1mL do gradiente 50%, menos denso, sobre este. O sêmen foi depositado sobre o conjunto. O gradiente juntamente com o sêmen foi centrifugado a 1200rpm por 20 minutos, para separar os espermatozoides do plasma seminal, de outros elementos celulares e de debris. Obteve-se, no fundo do tubo, um sedimento contendo a fração de espermatozoides móveis. O sedimento resultante contendo os espermatozoides móveis foi ressuspenso em 1mL de G-IVF (Vitrolife®) e armazenado a 37°C até o momento da fertilização ou injeção. Após o preparo do sêmen, sua concentração foi ajustada para que o material inseminado (FIV) possuísse um total de espermatozoides móveis entre 100.000 a 200.000 para cada oócitos.

Injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI)

Minutos antes da ICSI, as células do *cumulus* dos oócitos foram removidas com hialuronidase a 1% (Hyase - Vitrolife®) por 30 segundos. Após este período as células foram retiradas pipetando-se os oócitos várias vezes com o auxílio de uma pipeta com diâmetro próximo ao do oócito. Os oócitos desnudos foram avaliados quanto à presença do primeiro corpúsculo polar (seta), indicando estar em estágio de metáfase II (Figura1).



Figura 1

As pipetas de injeção e as utilizadas para segurar o oócito foram adquiridas comercialmente (Cook®). O procedimento de ICSI foi realizado em um microscópio invertido com contraste de Hoffman, micromanipuladores e placa aquecida acoplados. Em uma das gotas de G-MOPS (Vitrolife®) presentes na placa contendo os oócitos, foram adicionados polivinilpirrolidona (ICSI 100 -Vitrolife®), solução densa que facilita a escolha e a imobilização dos espermatozóides. O sêmen do ejaculado preparado, ou então, quando foi utilizado sêmen do epidídimo ou do testículo, foram feitas gotas maiores para colocar os espermatozóides diretamente. O espermatozóide escolhido foi imobilizado pela pipeta de injeção com um golpe na cauda causando sua imobilização. O oócito foi posicionado com o corpúsculo polar às 6 ou às 12h para não causar lesão dos cromossomos. O espermatozóide foi injetado no oócito e o ooplasma foi aspirado e injetado novamente para causar a ativação do oócito. Após a ICSI os oócitos foram incubados na estufa de CO₂.

Avaliações e cultivo embrionário

Dezoito horas após a FIV ou ICSI, os supostos zigotos foram avaliados quanto à fecundação normal, ou seja, pela presença de 2 pro núcleos (Figura 2). Os oócitos que foram fecundados convencionalmente (FIV) foram desnudados com auxílio de um pipetador acoplado a um stripper

(Oxyon®) fazendo sucessivas pipetagens de forma que as células da granulosa fossem liberadas e observava-se ao microscópio, a presença de dois pro núcleos. Cada zigoto foi transferido para única gota de 50µL de meio G1 (Vitrolife®) em placa de petri (30x60mm) coberta por óleo mineral (Ovoil-Vitrolife®).

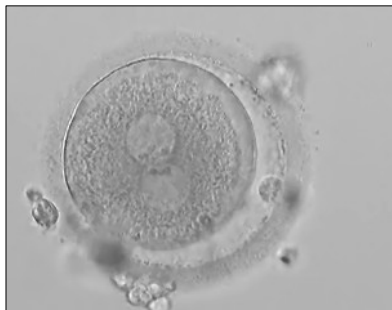


Figura 2

Os pronúcleos são formações elípticas e simétricas, sendo que a distância entre os dois varia em função do tempo decorrido desde a fertilização. Inicialmente, os pro núcleos estão afastados e progressivamente aproximam-se até a fusão. Esse exame tem importância na detecção do fenômeno de polispermia, pela prevenção da transferência de embriões poliplóides (Figura 3).



Figura 3

Após 24h-27h da realização da FIV ou ICSI, os embriões foram novamente avaliados quanto à clivagem precoce (Figura 4) e grau de fragmentação conforme Fisch, 2001.



Figura 4

2º avaliação: 25-27h – Clivagem regular e simétrica

Fragmentação:

Ausente: (30 pontos)

< 20%: (25 pontos)

>25%: (0)

Transferência embrionária

A transferência embrionária foi realizada no D3 (64-67h) com embriões no estágio de 8 células (Figura 5).

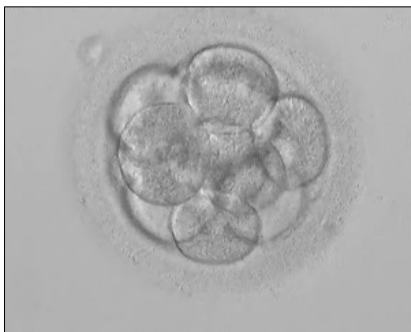


Figura 5 - Embrião D3, 8 células, 100 pontos

Os embriões foram avaliados de acordo com o critério de Grau de Escore Embrionário descrito por Fish, 2001, sendo realizada a 3º e última avaliação 64-67h pós FIV ou ICSI. O número de células e grau de fragmentação foi avaliado obtendo assim a pontuação final dos embriões e escolha dos mais pontuados para a transferência.

Nº células	Fragmentação	Pontuação
7	I (0-10%)	20
8	I (0-10%)	20
8	II (20%)	20
9	I (0-20%)	20

Nº células	Fragmentação	Pontuação
7	II (20%)	10
9	II (20%)	10
10	I (0-10%)	10
11	II (20%)	10

Os embriões viáveis excedentes foram congelados. Os selecionados (1,2 ou 3) para a transferência foram colocados em uma placa contendo meio G2 (Vitrolife®). Após verificação da pontuação total, os embriões foram aspirados com o cateter de transferência e levados até o médico responsável onde este fazia a colocação no terço final do útero com controle ultrasonográfico. As transferências embrionárias foram realizadas com a paciente em decúbito dorsal e sem qualquer sedação.

12.2- Termos de consentimento informado

ANEXO 1:

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
PACIENTES FÉRTEIS**

Estamos lhe convidando a participar do estudo científico "Fragmentação de DNA espermático em homens férteis e inférteis: correlação com hormônio anti-mulleriano (HAM), inibina B e FSH."

Para sua participação se efetivar haverá necessidade de coleta de esperma e de amostra de sangue, para dosagem hormonal. Ao ser submetido a punção venosa para coleta de sangue poderá apresentar hematoma no local. A sua participação não vai trazer outros riscos a sua saúde.

Os dados obtidos com esta análise não interferirão na conduta a ser adotada no atendimento de sua companheira. Os resultados desta pesquisa poderão vir a beneficiar a outros pacientes futuramente, a medida que o tema central deste trabalho puder ser devidamente esclarecido.

A amostra do material biológico (sangue) coletado, não será utilizada para outros fins além da proposta deste projeto.

Neste trabalho a identidade de todos os pacientes é mantida em sigilo.

A coleta de sangue será realizada através de punção de veia e coleta de sêmen pela técnica da masturbação (em local apropriado).

Os exames deste estudo serão custeados pelo HCPA, laboratório Mont Serrat e Insemine.

Como paciente fértil, o senhor não terá nenhum benefício direto, mas estará ajudando aqueles que desejam engravidar, pois através deste estudo poderá se conhecer melhor os mecanismos envolvidos na infertilidade e na fisiologia da fertilidade.

O paciente pode em qualquer momento retirar-se deste estudo, sem isso resultar em prejuízo da avaliação, acompanhamento e ou tratamento de sua companheira.

Porto Alegre,..... dede.....

Eu.....RG de número..... concordo com a minha participação neste estudo científico.

.....
Assinatura do Paciente

Pesquisador responsável pelo projeto: Dr. Alberto da Costa Stein, Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

.....
Assinatura do Pesquisador

Caso o paciente tiver dúvidas pode ligar para o telefone 2101-8286 (serviço de urologia) ou 9968-4858(pesquisador responsável- Alberto Stein) e 3331 1388 insemine.

ANEXO 2:

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA
20 / 01 / 09
x 08507

GPPG - Recebido

14 JAN. 2009

Por R 08-507

ANEXO 2:

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
PACIENTES SUB-FÉRTEIS**

Estamos lhe convidando a participar do estudo científico "Fragmentação de DNA espermático em homens férteis e inférteis: correlação com hormônio anti-mulleriano (HAM), inibina B e FSH."

Para sua participação se efetivar, haverá necessidade de coleta de esperma e de amostra de sangue, para dosagem hormonal. Ao ser submetido a punção venosa para coleta de sangue poderá apresentar hematoma no local. A sua participação não vai trazer outros riscos a sua saúde.

Os dados obtidos com esta análise não interferirão na conduta a ser adotada no seu caso. Os resultados desta pesquisa poderão vir a beneficiar o senhor e a outros pacientes futuramente, a medida que o tema central deste trabalho puder ser devidamente esclarecido.

A amostra do material biológico (sangue) coletado, não será utilizada para outros fins além da proposta deste projeto.

Neste trabalho a identidade de todos os pacientes é mantida em sigilo.

A coleta de sangue será realizada através de punção de veia e coleta de sêmen pela técnica da masturbação (em local apropriado).

Os exames deste estudo serão custeados pelo HCPA, laboratório Mont Serrat e Insemine.

Como paciente infértil (ou sub-fértil), o senhor poderá ter algum benefício indireto se essa pesquisa descobrir o mecanismo que possa estar envolvido na sua dificuldade em ter filhos (infertilidade e/ou sub-fertilidade).

O paciente pode em qualquer momento retirar-se deste estudo, sem isso resultar em prejuízo de sua avaliação e tratamento.

Porto Alegre,..... dede.....

Eu.....RG de número..... concordo com a minha participação neste estudo científico.

.....
Assinatura do Paciente

Pesquisador responsável pelo projeto: Dr. Alberto da Costa Stein, Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

.....
Assinatura do Pesquisador

Caso o paciente tiver dúvidas pode ligar para o telefone 2101-8286 (serviço de urologia) ou 9968-4858(pesquisador responsável- Alberto Stein) e 3331 1388 insemine.

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA
20 / 01 / 03
408507

GPPG - Recebido
14 JAN. 2003

Per (M) 03-507

12.3- Ficha do laboratório e protocolos de meios de cultura

Dados Gerais

Paciente: _____
 Cônjuge: _____
 Causa da Infertilidade: _____
 Médico responsável: _____

Idade: _____
 Tempo: _____
 Tentativas: _____

Punção Follicular

Data: _____ Hora: _____
 N° de folículos abordados: _____
 N° de óocitos recuperados: _____
 Médico: _____
 Embriologista: _____

Tipo de Procedimento: () FIV () ICSI () FIV+ICSI () ICSI-PESA () ICSI-TESA

Sêmen

Hora da Coleta: _____
 Volume: _____
 Motilidade: _____
 A + B: _____
 Concentração: _____

Após o preparo
 Volume: _____
 Motilidade: _____
 A + B: _____
 Concentração: _____

FIV

Gotas: _____
 Óocitos: _____
 Volume sêmen: _____
 Hora da Inseminação: _____

ICSI
 Gotas: _____
 Óocitos: _____
 Hialuronidase: _____
 Início: _____ Fim: _____

CIV
 Hora: _____
 Nº Óocitos: _____
 Gotas: _____

TE

Médico: _____
 Cateter: _____
 Ecografia: _____
 Pozzi: _____

Sangue: _____
 Muco: _____
 Tempo: _____
 Ops: _____

Meios de Cultivo

Punção	Lote
FIV	Lote
Hialuronidase	Lote
PVP	Lote
CIV	Lote
TE	Lote

n° oócito	CCOS				ICSI/IV	Classificação Embrionária						Resultado				
	VG	M I	M II	I a IV		PN (n)	16-18 horas		25-27 horas		n° cél. (I a III)	Score	Total Score	Dia 05	TE	Crio
							Score	EC	Score	Frag						
1																
2																
3																
4																
5																
6																
7																
8																
9																
10																
11																
12																
13																
14																
15																
16																
17																
18																
19																
20																

TEC: _____ Sangue: _____
Médico: _____ Muco _____
Catéter: _____ Tempo: _____
Ecografia: _____ Obs: _____
Pozzi: _____ N° palhetas restantes: _____

G5 Series™ e produtos relacionados com a Vitrolife

Produto	510 (K)#	Proposta
G-MM™	K021894	G-MM™ contém solução de albumina sérica humana recombinante (50 mg/mL) e é indicado para uso em procedimentos de reprodução assistida que incluem manipulação de gametas e embriões. Nestes processos, o G-MM™ é utilizado como suplemento para meios de cultura. Não utilizar como produto injetável.
HSA-solution™	K021896	HSA-solution™ contém solução de albumina sérica humana (100 mg/mL) e é indicado para uso em procedimentos de reprodução assistida que incluem manipulação de gametas e embriões. Nestes processos, o HSA-solution™ é utilizado como suplemento para meios de cultura. Não utilizar como produto injetável. CUIDADO: todos os produtos derivados de sangue devem ser tratados como potencialmente infecciosos. A fonte material da qual este produto é derivado foi testada e o resultado foi negativo de acordo com os atuais testes exigidos pela FDA: HIV, tipos 1 e 2; HCV, e HTLV tipos 1 e 2. Nenhum método de teste conhecido pode oferecer garantia de que o produto derivado de sangue humano não transmitirá agentes infecciosos.
G-IVF™ G-IVF™ PLUS	K022245	Meio para preparação e manuseio de gametas e para FIV.
G-1™ G-1™ PLUS	K022244	Meio para cultura de embriões do estágio de pronúcleo até dia +2 ou +3.
G-2™ G-2™ PLUS	K021890	Meio para cultura de embriões do dia+3 até o estágio de blastocisto.
EmbryoGlue®	K031015	Meio para transferência embrionária
G-MOPS™ G-MOPS™ PLUS	K021893	Meio para manuseio e manipulação de oócitos e embriões em ambiente atmosférico.
G-GAMETE™	K021893	Meio para manuseio e manipulação de oócitos e embriões em ambiente atmosférico.

G-RINSE™	K022295	Solução para lavagem de materiais de contato e para lavar o cervix. Não utilizar para cultura.
G-FreezeKit Blast™	K032154	Meio para congelamento de embriões em estágio de blastocisto.
G-ThawKit Blast™	K032155	Meio para descongelamento de embriões em estágio de blastocisto.
G-PGD™	K033101	Meio para biópsia embrionária.
SpermGrad™	K023403	Para separação do sêmen em gradientes de densidade
HYASE™	K000627	Para remoção das células do cumulus.
ICSI™	K043116	Para imobilização e isolamento dos espermatozoides antes da injeção intracitoplasmática de espermatozoides, ICSI.
FREEZEKIT 1™	K000623	Meio para congelamento de embriões em estágio de clivagem.
THAWKIT 1™	K000618	Meio para descongelamento de embriões em estágio de clivagem.
OVOIL™	K991351	Para cobrir o meio de cultura durante os processos de FIV e ICSI.

Produtos adicionais fornecidos por Vitrolife

IVF™	K991348	Para fertilização in vitro, cultura e transferência de embriões.
ASP™	K991345	Para coleta oocitária e lavagem (lavagem folicular).
SpermRinse™	K000621	Para preparação espermática.
CCM™	for research use only	Para cultura do dia +3 ao estágio de blastocisto e transferência.

G-MOPSTM PLUS

EN Medium for handling and maintaining oocytes and embryos in ambient atmosphere.



SUPPLEMENTED WITH:
 GMPSP PLUS contains a balanced mixture of amino acids and glutamine as an energy source.
 Ready to use after equilibration at 43°C and ambient atmosphere.

Storage instructions and stability
 G-MOPSTM PLUS is stable until the expiry date shown on the label. It should be stored at the specific storage conditions.
 These bottles should not be opened after opening.
 Do not store at room temperature after opening.

Directions for use
 The following is the general procedure for handling and maintaining oocytes and embryos in G-MOPSTM PLUS. For more information on the recommended use of G-MOPSTM PLUS, please refer to the 'Vitrolife G-MOPSTM PLUS' manual.
 Vitrolife and any bio-bank through the company's website. In other languages can also be found at the website.

Preparation prior to ICSI, fertilisation assessment.
 Prepare the medium from liquid. G-MOPSTM PLUS into a sterile flask. The bottle must be filled with water to the level of the liquid. The liquid should be placed in a clean container. The liquid should be placed in a clean container. The liquid should be placed in a clean container.

Denaturation of oocyte prior to ICSI
 Wash the oocyte with approximately 1 ml of drops of G-MOPSTM PLUS. The oocyte should be washed with the medium. The oocyte should be washed with the medium. The oocyte should be washed with the medium.

working with and not the embryo together. G-MOPSTM PLUS is a sterile solution and should be used immediately after opening. G-MOPSTM PLUS is a sterile solution and should be used immediately after opening.

Specification	Unit	Value
Batch release	50L (10 ⁶)	2.80
Expiry date (months on day)		2.80
Expiry date (months on day)		2.80

Precautions and warnings
 G-MOPSTM PLUS contains human albumin and gamma globulin.
 G-MOPSTM PLUS contains human albumin and gamma globulin.
 G-MOPSTM PLUS contains human albumin and gamma globulin.

DE: zur Handhabung und Manipulation von G-MOPSTM PLUS
 G-MOPSTM PLUS ist ein steriles Lösungsmittel und sollte sofort nach dem Öffnen verwendet werden. G-MOPSTM PLUS ist ein steriles Lösungsmittel und sollte sofort nach dem Öffnen verwendet werden.

DE: zur Handhabung und Manipulation von G-MOPSTM PLUS
 G-MOPSTM PLUS ist ein steriles Lösungsmittel und sollte sofort nach dem Öffnen verwendet werden. G-MOPSTM PLUS ist ein steriles Lösungsmittel und sollte sofort nach dem Öffnen verwendet werden.

DE: zur Handhabung und Manipulation von G-MOPSTM PLUS
 G-MOPSTM PLUS ist ein steriles Lösungsmittel und sollte sofort nach dem Öffnen verwendet werden. G-MOPSTM PLUS ist ein steriles Lösungsmittel und sollte sofort nach dem Öffnen verwendet werden.

Vorsichtmaßnahmen
 Verwenden Sie G-MOPSTM PLUS nicht, wenn Sie die Packung beschädigt haben. G-MOPSTM PLUS ist ein steriles Lösungsmittel und sollte sofort nach dem Öffnen verwendet werden.

Anwendung der Fertilitäts
 Geben Sie die fertilitäts Eizellen mit einer sterilen Pipette in G-MOPSTM PLUS. Geben Sie die fertilitäts Eizellen mit einer sterilen Pipette in G-MOPSTM PLUS.

Empfehlungen für die Lagerung
 G-MOPSTM PLUS sollte bei 4°C bis 8°C gelagert werden. G-MOPSTM PLUS sollte bei 4°C bis 8°C gelagert werden.

Empfehlungen für die Lagerung
 G-MOPSTM PLUS sollte bei 4°C bis 8°C gelagert werden. G-MOPSTM PLUS sollte bei 4°C bis 8°C gelagert werden.

Empfehlungen für die Lagerung
 G-MOPSTM PLUS sollte bei 4°C bis 8°C gelagert werden. G-MOPSTM PLUS sollte bei 4°C bis 8°C gelagert werden.

Empfehlungen für die Lagerung
 G-MOPSTM PLUS sollte bei 4°C bis 8°C gelagert werden. G-MOPSTM PLUS sollte bei 4°C bis 8°C gelagert werden.

Preparation prior to ICSI, fertilisation assessment.
 Prepare the medium from liquid. G-MOPSTM PLUS into a sterile flask. The bottle must be filled with water to the level of the liquid. The liquid should be placed in a clean container.

Denaturation of oocyte prior to ICSI
 Wash the oocyte with approximately 1 ml of drops of G-MOPSTM PLUS. The oocyte should be washed with the medium. The oocyte should be washed with the medium.

Preparation prior to ICSI, fertilisation assessment.
 Prepare the medium from liquid. G-MOPSTM PLUS into a sterile flask. The bottle must be filled with water to the level of the liquid. The liquid should be placed in a clean container.

Preparation prior to ICSI, fertilisation assessment.
 Prepare the medium from liquid. G-MOPSTM PLUS into a sterile flask. The bottle must be filled with water to the level of the liquid. The liquid should be placed in a clean container.

Preparation prior to ICSI, fertilisation assessment.
 Prepare the medium from liquid. G-MOPSTM PLUS into a sterile flask. The bottle must be filled with water to the level of the liquid. The liquid should be placed in a clean container.

Preparation prior to ICSI, fertilisation assessment.
 Prepare the medium from liquid. G-MOPSTM PLUS into a sterile flask. The bottle must be filled with water to the level of the liquid. The liquid should be placed in a clean container.

EN: Medium for preparation and handling of gametes and for in vitro fertilisation.

G-IVF™ PLUS is a bicarbonate buffered SUPPLEMENTED WITH SEA... albumin and gemmatritin as an antibacterial agent.

Storage instructions and stability

Store dark at +2 to +8°C. G-IVF™ PLUS is stable until the expiry date shown on... Media bottles should not be stored after opening.

Directions for use

The following is the general procedure for using G-IVF™ PLUS. Please refer to the specific Certificate of Analysis for detailed instructions.

Sperm preparation: Wash sperm from epididymus with a good room-temperature medium... Pipette 1.0 ml of semen into the tube. Overlay 2.0 ml of equilibrated G-IVF™ PLUS.

Insemination: Transfer the oocytes to insemination dishes and leave at +37°C and 6% CO2 overnight... Alternatively add equilibrated sperm suspension to the dishes...

Specificities: Specificity: S.A.L. (SI) MZOZ embryos assay (<20) MZOZ extended blastocyst assay (>5)

DO specific test results are available on the Certificate of Analysis provided with each delivery.

Precautions and warnings: Do not use G-IVF™ PLUS if appears cloudy. G-IVF™ PLUS contains human serum albumin and gemmatritin.

and non-reactive for HbsAg, HCV RNA and HIV-1 RNA, and syphilis. No known test methods can be used to detect... Vitrolife recommends that media be opened and used only with aseptic technique.

Vitrolife's W media have not been determined and compared to WHO standards for sperm count and motility. G-IVF™ PLUS has been determined and compared to WHO standards on the order of G.F.S.P.

DE: Zur Vorbereitung und Handhabung von Gameten und für die in vitro-Fertilisation. G-IVF™ PLUS ist ein bicarbonatpufferndes Medium... Vitrolife's W Medien haben nicht bestimmt und verglichen mit WHO Standards für Spermienzahl und -motilität.

Zur Anwendung nach einer Equilibrierung bei +37°C und 6%iger CO2-Atmosphäre.

Lagerung und Haltbarkeit

Vor Licht geschützt bei +2 bis +8°C lagern. G-IVF™ PLUS ist bis zum auf dem Verpackungsetikett angegebenen Verfallsdatum haltbar.

Anwendung: Nachfolgend wird das allgemeine Verfahren für die Spermienvorbereitung... Alternativ kann die Spermiensuspension in die Petrischalen gegeben werden.

Aufbereitung der Spermien: Bei Spermienvorbereitung mit hoher Spermienzahl und Motilität sollte die Swim-up-Methode (Migration) verwendet werden.

Spezifitäten: Spezifität: S.A.L. (SI) MZOZ Embryos Assay (<20) MZOZ extended Blastocyst Assay (>5)

DO spezifische Testergebnisse sind auf dem Zertifikat der Analyse mit jeder Lieferung verfügbar.

Vorsichtsmaßnahmen und Warnungen: Geben Sie das Produkt nicht an Kinder weiter. G-IVF™ PLUS enthält Human Serumalbumin und Gemmatritin.

desprothrombiniertes Plasma. Diese Methode kann zur Wachung aller Proben und zum Überleben der Zellen angewendet werden. Vitrolife empfiehlt, dass Medien nur unter Anwendung aseptischer Techniken geöffnert werden.

49%ige Suspension zu erhalten. Mischen Sie für 4.5 ml G-IVF™ PLUS mit 5.5 ml G-IVF™ PLUS Mischen Sie für 20-40 Minuten bei 300-600rpm, bis die Suspension klar ist.

G-IVF™ PLUS enthält humane Serum-Albumin und Vitrolife Gemmatritin, die als Antikontaminantien wirken.

Die Bakterien werden durch Zugabe von 10^-6 M Penicillin G zu G-IVF™ PLUS beseitigt. Die Qualität und Haltbarkeit werden nicht durch Bestimmung und Vergleich mit WHO Standards für Spermienzahl und -motilität.

Das Medien wird bei +37°C und 6%iger CO2-Atmosphäre eingesetzt.

Anwendung: Folgende allgemeine Methode für die Spermienaufbereitung... Alternativ kann die Spermienaufbereitung in Petrischalen durchgeführt werden.

Spermienvorbereitung mit hoher Spermienzahl und Motilität: Schwimmen Sie die Spermien in G-IVF™ PLUS mit hoher Spermienzahl und Motilität auf.

Spezifitäten: Spezifität: S.A.L. (SI) MZOZ Embryos Assay (<20) MZOZ extended Blastocyst Assay (>5)

DO spezifische Testergebnisse sind auf dem Zertifikat der Analyse mit jeder Lieferung verfügbar.

Vorsichtsmaßnahmen und Warnungen: Geben Sie das Produkt nicht an Kinder weiter. G-IVF™ PLUS enthält Human Serumalbumin und Gemmatritin.

desprothrombiniertes Plasma. Diese Methode kann zur Wachung aller Proben und zum Überleben der Zellen angewendet werden. Vitrolife empfiehlt, dass Medien nur unter Anwendung aseptischer Techniken geöffnert werden.

49%ige Suspension zu erhalten. Mischen Sie für 4.5 ml G-IVF™ PLUS mit 5.5 ml G-IVF™ PLUS Mischen Sie für 20-40 Minuten bei 300-600rpm, bis die Suspension klar ist.

G-IVF™ PLUS enthält humane Serum-Albumin und Vitrolife Gemmatritin, die als Antikontaminantien wirken.

Die Bakterien werden durch Zugabe von 10^-6 M Penicillin G zu G-IVF™ PLUS beseitigt. Die Qualität und Haltbarkeit werden nicht durch Bestimmung und Vergleich mit WHO Standards für Spermienzahl und -motilität.

Das Medien wird bei +37°C und 6%iger CO2-Atmosphäre eingesetzt.

Anwendung: Folgende allgemeine Methode für die Spermienaufbereitung... Alternativ kann die Spermienaufbereitung in Petrischalen durchgeführt werden.

Spermienvorbereitung mit hoher Spermienzahl und Motilität: Schwimmen Sie die Spermien in G-IVF™ PLUS mit hoher Spermienzahl und Motilität auf.

Spezifitäten: Spezifität: S.A.L. (SI) MZOZ Embryos Assay (<20) MZOZ extended Blastocyst Assay (>5)

DO spezifische Testergebnisse sind auf dem Zertifikat der Analyse mit jeder Lieferung verfügbar.

Vorsichtsmaßnahmen und Warnungen: Geben Sie das Produkt nicht an Kinder weiter. G-IVF™ PLUS enthält Human Serumalbumin und Gemmatritin.

desprothrombiniertes Plasma. Diese Methode kann zur Wachung aller Proben und zum Überleben der Zellen angewendet werden. Vitrolife empfiehlt, dass Medien nur unter Anwendung aseptischer Techniken geöffnert werden.

49%ige Suspension zu erhalten. Mischen Sie für 4.5 ml G-IVF™ PLUS mit 5.5 ml G-IVF™ PLUS Mischen Sie für 20-40 Minuten bei 300-600rpm, bis die Suspension klar ist.

G-IVF™ PLUS enthält humane Serum-Albumin und Vitrolife Gemmatritin, die als Antikontaminantien wirken.

Die Bakterien werden durch Zugabe von 10^-6 M Penicillin G zu G-IVF™ PLUS beseitigt. Die Qualität und Haltbarkeit werden nicht durch Bestimmung und Vergleich mit WHO Standards für Spermienzahl und -motilität.

Das Medien wird bei +37°C und 6%iger CO2-Atmosphäre eingesetzt.

Anwendung: Folgende allgemeine Methode für die Spermienaufbereitung... Alternativ kann die Spermienaufbereitung in Petrischalen durchgeführt werden.

Spermienvorbereitung mit hoher Spermienzahl und Motilität: Schwimmen Sie die Spermien in G-IVF™ PLUS mit hoher Spermienzahl und Motilität auf.

Spezifitäten: Spezifität: S.A.L. (SI) MZOZ Embryos Assay (<20) MZOZ extended Blastocyst Assay (>5)

DO spezifische Testergebnisse sind auf dem Zertifikat der Analyse mit jeder Lieferung verfügbar.

Vorsichtsmaßnahmen und Warnungen: Geben Sie das Produkt nicht an Kinder weiter. G-IVF™ PLUS enthält Human Serumalbumin und Gemmatritin.

desprothrombiniertes Plasma. Diese Methode kann zur Wachung aller Proben und zum Überleben der Zellen angewendet werden. Vitrolife empfiehlt, dass Medien nur unter Anwendung aseptischer Techniken geöffnert werden.

49%ige Suspension zu erhalten. Mischen Sie für 4.5 ml G-IVF™ PLUS mit 5.5 ml G-IVF™ PLUS Mischen Sie für 20-40 Minuten bei 300-600rpm, bis die Suspension klar ist.

G-IVF™ PLUS enthält humane Serum-Albumin und Vitrolife Gemmatritin, die als Antikontaminantien wirken.

Die Bakterien werden durch Zugabe von 10^-6 M Penicillin G zu G-IVF™ PLUS beseitigt. Die Qualität und Haltbarkeit werden nicht durch Bestimmung und Vergleich mit WHO Standards für Spermienzahl und -motilität.

Das Medien wird bei +37°C und 6%iger CO2-Atmosphäre eingesetzt.

Anwendung: Folgende allgemeine Methode für die Spermienaufbereitung... Alternativ kann die Spermienaufbereitung in Petrischalen durchgeführt werden.

Spermienvorbereitung mit hoher Spermienzahl und Motilität: Schwimmen Sie die Spermien in G-IVF™ PLUS mit hoher Spermienzahl und Motilität auf.

Spezifitäten: Spezifität: S.A.L. (SI) MZOZ Embryos Assay (<20) MZOZ extended Blastocyst Assay (>5)

DO spezifische Testergebnisse sind auf dem Zertifikat der Analyse mit jeder Lieferung verfügbar.

Vorsichtsmaßnahmen und Warnungen: Geben Sie das Produkt nicht an Kinder weiter. G-IVF™ PLUS enthält Human Serumalbumin und Gemmatritin.

desprothrombiniertes Plasma. Diese Methode kann zur Wachung aller Proben und zum Überleben der Zellen angewendet werden. Vitrolife empfiehlt, dass Medien nur unter Anwendung aseptischer Techniken geöffnert werden.

49%ige Suspension zu erhalten. Mischen Sie für 4.5 ml G-IVF™ PLUS mit 5.5 ml G-IVF™ PLUS Mischen Sie für 20-40 Minuten bei 300-600rpm, bis die Suspension klar ist.

G-IVF™ PLUS enthält humane Serum-Albumin und Vitrolife Gemmatritin, die als Antikontaminantien wirken.

Die Bakterien werden durch Zugabe von 10^-6 M Penicillin G zu G-IVF™ PLUS beseitigt. Die Qualität und Haltbarkeit werden nicht durch Bestimmung und Vergleich mit WHO Standards für Spermienzahl und -motilität.

Das Medien wird bei +37°C und 6%iger CO2-Atmosphäre eingesetzt.

Anwendung: Folgende allgemeine Methode für die Spermienaufbereitung... Alternativ kann die Spermienaufbereitung in Petrischalen durchgeführt werden.

Spermienvorbereitung mit hoher Spermienzahl und Motilität: Schwimmen Sie die Spermien in G-IVF™ PLUS mit hoher Spermienzahl und Motilität auf.

Spezifitäten: Spezifität: S.A.L. (SI) MZOZ Embryos Assay (<20) MZOZ extended Blastocyst Assay (>5)

DO spezifische Testergebnisse sind auf dem Zertifikat der Analyse mit jeder Lieferung verfügbar.

Vorsichtsmaßnahmen und Warnungen: Geben Sie das Produkt nicht an Kinder weiter. G-IVF™ PLUS enthält Human Serumalbumin und Gemmatritin.

desprothrombiniertes Plasma. Diese Methode kann zur Wachung aller Proben und zum Überleben der Zellen angewendet werden. Vitrolife empfiehlt, dass Medien nur unter Anwendung aseptischer Techniken geöffnert werden.

49%ige Suspension zu erhalten. Mischen Sie für 4.5 ml G-IVF™ PLUS mit 5.5 ml G-IVF™ PLUS Mischen Sie für 20-40 Minuten bei 300-600rpm, bis die Suspension klar ist.

G-IVF™ PLUS enthält humane Serum-Albumin und Vitrolife Gemmatritin, die als Antikontaminantien wirken.

Die Bakterien werden durch Zugabe von 10^-6 M Penicillin G zu G-IVF™ PLUS beseitigt. Die Qualität und Haltbarkeit werden nicht durch Bestimmung und Vergleich mit WHO Standards für Spermienzahl und -motilität.

Das Medien wird bei +37°C und 6%iger CO2-Atmosphäre eingesetzt.

Anwendung: Folgende allgemeine Methode für die Spermienaufbereitung... Alternativ kann die Spermienaufbereitung in Petrischalen durchgeführt werden.

Spermienvorbereitung mit hoher Spermienzahl und Motilität: Schwimmen Sie die Spermien in G-IVF™ PLUS mit hoher Spermienzahl und Motilität auf.

Spezifitäten: Spezifität: S.A.L. (SI) MZOZ Embryos Assay (<20) MZOZ extended Blastocyst Assay (>5)

DO spezifische Testergebnisse sind auf dem Zertifikat der Analyse mit jeder Lieferung verfügbar.

Vorsichtsmaßnahmen und Warnungen: Geben Sie das Produkt nicht an Kinder weiter. G-IVF™ PLUS enthält Human Serumalbumin und Gemmatritin.

desprothrombiniertes Plasma. Diese Methode kann zur Wachung aller Proben und zum Überleben der Zellen angewendet werden. Vitrolife empfiehlt, dass Medien nur unter Anwendung aseptischer Techniken geöffnert werden.

49%ige Suspension zu erhalten. Mischen Sie für 4.5 ml G-IVF™ PLUS mit 5.5 ml G-IVF™ PLUS Mischen Sie für 20-40 Minuten bei 300-600rpm, bis die Suspension klar ist.

G-IVF™ PLUS enthält humane Serum-Albumin und Vitrolife Gemmatritin, die als Antikontaminantien wirken.

Die Bakterien werden durch Zugabe von 10^-6 M Penicillin G zu G-IVF™ PLUS beseitigt. Die Qualität und Haltbarkeit werden nicht durch Bestimmung und Vergleich mit WHO Standards für Spermienzahl und -motilität.

Das Medien wird bei +37°C und 6%iger CO2-Atmosphäre eingesetzt.

Anwendung: Folgende allgemeine Methode für die Spermienaufbereitung... Alternativ kann die Spermienaufbereitung in Petrischalen durchgeführt werden.

Spermienvorbereitung mit hoher Spermienzahl und Motilität: Schwimmen Sie die Spermien in G-IVF™ PLUS mit hoher Spermienzahl und Motilität auf.

Spezifitäten: Spezifität: S.A.L. (SI) MZOZ Embryos Assay (<20) MZOZ extended Blastocyst Assay (>5)

DO spezifische Testergebnisse sind auf dem Zertifikat der Analyse mit jeder Lieferung verfügbar.

Vorsichtsmaßnahmen und Warnungen: Geben Sie das Produkt nicht an Kinder weiter. G-IVF™ PLUS enthält Human Serumalbumin und Gemmatritin.

G-1™ V5 PLUS

26090.02



EN: Medium for culture of embryos from the pronucleate stage to day 2 or day 3.

SUPPLEMENTED WITH SEA
G-1™ V5 PLUS is a bicarbonate buffered medium containing human serum albumin, hyaluronan and gentamicin as an antibacterial agent.



Ready to use after equilibration at +37°C and 6% CO₂ atmosphere.

Storage instructions and stability

Store dark at 12 to +18°C.
G-1™ V5 PLUS is stable until the expiry date shown on the container labels and the LOT-specific Certificate of Analysis.

Media bottles should not be stored after opening. Discard excess media after completion of the procedure.

Directions for use

The following is the general procedure for embryo culture using G-1™ V5 PLUS.
For more information on the recommended use of G-1™ V5 PLUS, please see Vitrolife G Series™ Manual. Detailed instructions and directions for use in other languages can also be found at the website.

Culture of Cleavage Stage Embryos

All culture dishes (wells or tubes) should be rinsed with G-1™ V5 PLUS and prepared in advance of the procedure. All culture dishes (wells or tubes) should be rinsed with G-1™ V5 PLUS and prepared in advance of the procedure. Use a 60 mm dish with the lid of the patient. It is recommended that dishes of the highest quality be used. Using a pre-rinsed sterile tip, place at least 6 x 25 µL droplets of supplemented G-1™ V5 PLUS into the dish. The droplets are spread evenly over the volume of the dish (25 x 114 mm). The volume of the media should be at least 1.5 times the volume of the dish (42.5 mL). Four droplets should be at the 3, 6, 9 and 12 o'clock positions (for embryo culture), the remaining droplets should be in the middle with 0.5 mL to avoid evaporation. Prepare no more than 2 dishes at one time. Using a new tip for each drop, first rinse the tip into the dish with 25 µL of medium to each original drop. This medium will be aspirated to drain up rather than flatten out.
Immediately place the dish in the incubator at 6% CO₂ and +37°C. Gently remove the lid of the dish and set at an angle on the side of the plate. This will ensure proper equilibration of the media.
Dishes must be returned to the incubator with a sealed lid for a minimum of 6 hrs before the initial measured time for the media to reach correct pH under lid and for a maximum of 18 hours.
Following removal of the cumulus cells and assessment

SUPPLEMENTED WITH SEA

G-1™ V5 PLUS is a bicarbonate buffered medium containing human serum albumin, hyaluronan and gentamicin as an antibacterial agent.

Ready to use after equilibration at +37°C and 6% CO₂ atmosphere.

Lagerung und Haltbarkeit

Von Licht geschützt bei +2 bis +18°C lagern.
G-1™ V5 PLUS ist bis zum angegebenen Verfallsdatum stabil und im Analysenzertifikat der Charge angegeben.

Die Flaschen dürfen nach dem Öffnen nicht aufbewahrt werden. Entsorgen Sie restliches Medium nach Ablauf des Vorgangs.

Anwendung

Nachfolgend wird die allgemeine übliche Vorgehensweise für die Kultivierung von Embryonen mit G-1™ V5 PLUS beschrieben.

Weitere Informationen zur empfohlenen Anwendung von G-1™ V5 PLUS sind im Vitrolife G Series™ Manual erhältlich oder kann auf der Unternehmenswebsite www.vitrolife.com bestellt werden. Die Informationen sind in anderen Sprachen erhältlich. Bitte kontaktieren Sie Ihre Vitrolife-Vertriebsstelle.

Kultivierung der Embryonen im Stadium der Zelleitung

Alle Kultivierungsgefäße (Schalen oder Röhren) müssen vor Beginn der Prozedur mit G-1™ V5 PLUS gewaschen werden.
Schalen höherer Qualität zu verwenden. Verwenden Sie eine vorab gewaschene sterile Spitze und geben Sie die Embryonen in die Schale. Verwenden Sie G-1™ V5 PLUS in der Größe 25 µL. Spülen Sie die Spitze gründlich in eine Entsorgungsbottle ab. Die restlichen Tropfen werden in die Mitte gegeben (Washing). Bedecken Sie die Tropfen sofort mit G-1™ V5 PLUS. Die Tropfen sollten nicht austrocknen. Die Schale sollte nicht mehr als 2 Stunden (ohne Luftzutritt) offen gelassen werden. Die Schale sollte bei 6% CO₂ und +37°C in den Inkubator genommen werden. Die Schale sollte in einem Winkel auf der Seite der Schale aufbewahrt werden. Die Schale sollte richtig equilibriert werden.

Die Schalen müssen im Inkubator bei halboffenen Bedingungen für mindestens 6 Stunden (unter Lid) und maximal 18 Stunden (ohne Lid) offen gelassen werden.

Nach Entfernung der Cumuluszellen und Beurteilung der Fertilisation werden die Embryonen in G-1™ V5 PLUS überführt. Die Überführung sollte in G-1™ V5 PLUS (supplementiertes G-1™ V5 PLUS) durchgeführt werden.

Beim Waschen werden die Embryonen 2-3 Mal herausgenommen und in kleineren Mengen in der Schale hin- und hergeschwenkt.
Die Embryonen sollten anschließend nacheinander in den beiden mittleren Tropfen in der Perischale (3 und 9 Uhr) abgelesen werden.
Tropfen G-1™ V5 PLUS gegeben werden.

Es sollen nicht mehr als fünf Embryonen pro Tropfen kultiviert werden, da dies zu einer erhöhten Vermehrung der Nitrosterole im Kulturmedium führen kann, was wiederum zu einer erhöhten Mortalität von Embryonen führt. Sie die Schale sofort zurück in den Inkubator. Es ist ratsam, Embryonen zum Zentrifugieren zu kultivieren.

Embryonen in 2 Gruppen (3 und 9 Uhr) kultiviert werden. Am Tag 2 oder am Tag 3 können die Embryonen in EmbryoCulture oder in G-2™ V5 PLUS / G-2™ V5 PLUS weiter kultiviert werden. Embryonen am Tag 2 werden in supplementiertes G-2™ V5 PLUS / supplementiertes G-2™ V5 PLUS transferiert werden.

Produktinformationen

Stapel filtert: 54L 10⁷
Mäuse Embryo Assay (1 cell): < 0.25
% expandierte Blastozysten (Tag 3): > 80
Bakterielle Endotoxine (LAL Test): < 0.25
Chargen-spezifische Testergebnisse finden Sie auf dem Analysezentrum, das jeder Lieferung beiliegt.

Vorsichtmaßnahmen

Verwenden Sie G-1™ V5 PLUS nicht, wenn es trübe erscheint.
Hinweise: Alle Blutprodukte sind grundsätzlich als potenziell ansteckend zu betrachten. Das Risiko, dass dieser Produkt enthält HIV-1-Antikörper, getestete und nicht reaktiv auf HIV-1-Antikörper (HIV-1 RNA) und nicht reaktiv auf HIV-1-Antikörper (HIV-1 RNA) ist gering. Es ist nicht möglich, das Risiko vollständig zu eliminieren. Blut-gewonnene Produkte keine Infektionsträger übertragen.
Vitrolife empfiehlt alle Medien nur unter Anwendung von aseptischen Methoden zu öffnen und zu verwenden.

Die Risiken einer Toxizität von V5-Medien in Hinblick auf Reproduktion und Entwicklung, inklusive der Wirkung von Vitrolife, wurden noch nicht bestimmt und gelten als unsicher.

Nicht zur Injektion bestimmt.
Hinweise: Nach US-amerikanischem Gesetz darf dieses Produkt nicht für die Behandlung von Menschen verwendet werden, wenn ein spezifischer Rezeptur nachgewiesen ist.

ES: Medio para el cultivo de embriones desde la fase pronucleate hasta el día 2 y 3.
ENRIQUECIDO CON SEA

G-1™ V5 PLUS es un medio tamponado con bicarbonato que contiene albúmina sérica humana, hialuronano y gentamicina como fármaco antibacteriano.
Listo para usar tras equilibrarlo a +37°C en una atmósfera de CO₂ al 6%.

Instrucciones de conservación y estabilidad
Conservar en un lugar oscuro de +2 a +18°C.
G-1™ V5 PLUS es estable hasta la fecha de caducidad que aparece en el etiquetado del envase y el certificado de análisis del LOT correspondiente.

Los frascos no deben conservarse una vez abiertos. Desocher el exceso de medio después de finalizar el procedimiento.

Instrucciones de uso

A continuación se indica el procedimiento general para el cultivo de embriones mediante G-1™ V5 PLUS.
Para más información sobre el uso recomendado de G-1™ V5 PLUS, consulte por favor el "Manual Vitrolife G Series™". Información detallada de instrucciones de uso puede encontrarse a través de la página web de la empresa www.vitrolife.com. En ella también pueden encontrarse instrucciones de uso en otros idiomas.

Todos los platos (well o tubo) de cultivo deben estar limpios y preparados antes del procedimiento.
Por la tarde día de la colección de óvulos, coloque una placa de 60 mm con el identificador del paciente. Se recomienda utilizar placas de la máxima calidad. Rinsar las placas con G-1™ V5 PLUS, como mínimo, una vez. Coloque un mínimo de 6 gotas de 25 µL de G-1™ V5 PLUS en las placas. Las gotas se colocarán en las posiciones del reloj correspondientes a las 3, 6, 9 y 12 horas (para el cultivo de embriones). Las gotas se enjuagan tomando con la pipeta el volumen necesario para desecar el medio. Cúbralo con las gotas y asegure el medio. Cubrir las gotas inmediatamente con O2/CO₂ para evitar la evaporación. No prepare más de 2 placas a la vez. Usando una nueva punta para cada gota, coloque un mínimo de 6 gotas de 25 µL de G-1™ V5 PLUS en cada gota original. Esta técnica permite que las gotas permanezcan elevadas y no se aplaquen. Coloque inmediatamente la placa en el incubador con CO₂ al 6% y a 37°C. Retire cuidadosamente la tapa de la placa y asegure inmediatamente con el dedo índice. Esto garantiza el correcto equilibrio del medio.

Las placas deben equilibrarse en la incubadora con la tapa semiabierta durante un mínimo de 6 horas (esta es el tiempo mínimo para que los medios alcancen el pH correcto bajo el sealed) y un máximo de 18 horas.
Después de retirar las células del cultivo y de evaluar la fertilización, retire la placa y devuélvala a la incubadora. Coloque una placa de un solo pocillo y se le van en G-1™ V5 PLUS / G-2™ V5 PLUS enriquecido previamente. El lavado supone recoger el embrión 2 o 3 veces con la pipeta en el medio G-1™ V5 PLUS / G-2™ V5 PLUS. Es recomendable lavar los embriones 2 veces por cada transferencia. En las dos gotas centrales de la placa de cultivo, coloque hasta 5 embriones en cada gota de 50 µL de G-1™ V5 PLUS.

Los frascos no deben conservarse una vez abiertos. Desocher el exceso de medio después de finalizar el procedimiento.

Instrucciones de uso

A continuación se indica el procedimiento general para el cultivo de embriones mediante G-1™ V5 PLUS.
Para más información sobre el uso recomendado de G-1™ V5 PLUS, consulte por favor el "Manual Vitrolife G Series™". Información detallada de instrucciones de uso puede encontrarse a través de la página web de la empresa www.vitrolife.com. En ella también pueden encontrarse instrucciones de uso en otros idiomas.

Todos los platos (well o tubo) de cultivo deben estar limpios y preparados antes del procedimiento.
Por la tarde día de la colección de óvulos, coloque una placa de 60 mm con el identificador del paciente. Se recomienda utilizar placas de la máxima calidad. Rinsar las placas con G-1™ V5 PLUS, como mínimo, una vez. Coloque un mínimo de 6 gotas de 25 µL de G-1™ V5 PLUS en las placas. Las gotas se colocarán en las posiciones del reloj correspondientes a las 3, 6, 9 y 12 horas (para el cultivo de embriones). Las gotas se enjuagan tomando con la pipeta el volumen necesario para desecar el medio. Cúbralo con las gotas y asegure el medio. Cubrir las gotas inmediatamente con O2/CO₂ para evitar la evaporación. No prepare más de 2 placas a la vez. Usando una nueva punta para cada gota, coloque un mínimo de 6 gotas de 25 µL de G-1™ V5 PLUS en cada gota original. Esta técnica permite que las gotas permanezcan elevadas y no se aplaquen. Coloque inmediatamente la placa en el incubador con CO₂ al 6% y a 37°C. Retire cuidadosamente la tapa de la placa y asegure inmediatamente con el dedo índice. Esto garantiza el correcto equilibrio del medio.

Las placas deben equilibrarse en la incubadora con la tapa semiabierta durante un mínimo de 6 horas (esta es el tiempo mínimo para que los medios alcancen el pH correcto bajo el sealed) y un máximo de 18 horas.
Después de retirar las células del cultivo y de evaluar la fertilización, retire la placa y devuélvala a la incubadora. Coloque una placa de un solo pocillo y se le van en G-1™ V5 PLUS / G-2™ V5 PLUS enriquecido previamente. El lavado supone recoger el embrión 2 o 3 veces con la pipeta en el medio G-1™ V5 PLUS / G-2™ V5 PLUS. Es recomendable lavar los embriones 2 veces por cada transferencia. En las dos gotas centrales de la placa de cultivo, coloque hasta 5 embriones en cada gota de 50 µL de G-1™ V5 PLUS.

Los frascos no deben conservarse una vez abiertos. Desocher el exceso de medio después de finalizar el procedimiento.

Instrucciones de uso

A continuación se indica el procedimiento general para el cultivo de embriones mediante G-1™ V5 PLUS.
Para más información sobre el uso recomendado de G-1™ V5 PLUS, consulte por favor el "Manual Vitrolife G Series™". Información detallada de instrucciones de uso puede encontrarse a través de la página web de la empresa www.vitrolife.com. En ella también pueden encontrarse instrucciones de uso en otros idiomas.

Todos los platos (well o tubo) de cultivo deben estar limpios y preparados antes del procedimiento.
Por la tarde día de la colección de óvulos, coloque una placa de 60 mm con el identificador del paciente. Se recomienda utilizar placas de la máxima calidad. Rinsar las placas con G-1™ V5 PLUS, como mínimo, una vez. Coloque un mínimo de 6 gotas de 25 µL de G-1™ V5 PLUS en las placas. Las gotas se colocarán en las posiciones del reloj correspondientes a las 3, 6, 9 y 12 horas (para el cultivo de embriones). Las gotas se enjuagan tomando con la pipeta el volumen necesario para desecar el medio. Cúbralo con las gotas y asegure el medio. Cubrir las gotas inmediatamente con O2/CO₂ para evitar la evaporación. No prepare más de 2 placas a la vez. Usando una nueva punta para cada gota, coloque un mínimo de 6 gotas de 25 µL de G-1™ V5 PLUS en cada gota original. Esta técnica permite que las gotas permanezcan elevadas y no se aplaquen. Coloque inmediatamente la placa en el incubador con CO₂ al 6% y a 37°C. Retire cuidadosamente la tapa de la placa y asegure inmediatamente con el dedo índice. Esto garantiza el correcto equilibrio del medio.

Las placas deben equilibrarse en la incubadora con la tapa semiabierta durante un mínimo de 6 horas (esta es el tiempo mínimo para que los medios alcancen el pH correcto bajo el sealed) y un máximo de 18 horas.
Después de retirar las células del cultivo y de evaluar la fertilización, retire la placa y devuélvala a la incubadora. Coloque una placa de un solo pocillo y se le van en G-1™ V5 PLUS / G-2™ V5 PLUS enriquecido previamente. El lavado supone recoger el embrión 2 o 3 veces con la pipeta en el medio G-1™ V5 PLUS / G-2™ V5 PLUS. Es recomendable lavar los embriones 2 veces por cada transferencia. En las dos gotas centrales de la placa de cultivo, coloque hasta 5 embriones en cada gota de 50 µL de G-1™ V5 PLUS.

Los frascos no deben conservarse una vez abiertos. Desocher el exceso de medio después de finalizar el procedimiento.

Instrucciones de uso

A continuación se indica el procedimiento general para el cultivo de embriones mediante G-1™ V5 PLUS.
Para más información sobre el uso recomendado de G-1™ V5 PLUS, consulte por favor el "Manual Vitrolife G Series™". Información detallada de instrucciones de uso puede encontrarse a través de la página web de la empresa www.vitrolife.com. En ella también pueden encontrarse instrucciones de uso en otros idiomas.

Todos los platos (well o tubo) de cultivo deben estar limpios y preparados antes del procedimiento.
Por la tarde día de la colección de óvulos, coloque una placa de 60 mm con el identificador del paciente. Se recomienda utilizar placas de la máxima calidad. Rinsar las placas con G-1™ V5 PLUS, como mínimo, una vez. Coloque un mínimo de 6 gotas de 25 µL de G-1™ V5 PLUS en las placas. Las gotas se colocarán en las posiciones del reloj correspondientes a las 3, 6, 9 y 12 horas (para el cultivo de embriones). Las gotas se enjuagan tomando con la pipeta el volumen necesario para desecar el medio. Cúbralo con las gotas y asegure el medio. Cubrir las gotas inmediatamente con O2/CO₂ para evitar la evaporación. No prepare más de 2 placas a la vez. Usando una nueva punta para cada gota, coloque un mínimo de 6 gotas de 25 µL de G-1™ V5 PLUS en cada gota original. Esta técnica permite que las gotas permanezcan elevadas y no se aplaquen. Coloque inmediatamente la placa en el incubador con CO₂ al 6% y a 37°C. Retire cuidadosamente la tapa de la placa y asegure inmediatamente con el dedo índice. Esto garantiza el correcto equilibrio del medio.

Las placas deben equilibrarse en la incubadora con la tapa semiabierta durante un mínimo de 6 horas (esta es el tiempo mínimo para que los medios alcancen el pH correcto bajo el sealed) y un máximo de 18 horas.
Después de retirar las células del cultivo y de evaluar la fertilización, retire la placa y devuélvala a la incubadora. Coloque una placa de un solo pocillo y se le van en G-1™ V5 PLUS / G-2™ V5 PLUS enriquecido previamente. El lavado supone recoger el embrión 2 o 3 veces con la pipeta en el medio G-1™ V5 PLUS / G-2™ V5 PLUS. Es recomendable lavar los embriones 2 veces por cada transferencia. En las dos gotas centrales de la placa de cultivo, coloque hasta 5 embriones en cada gota de 50 µL de G-1™ V5 PLUS.

Los frascos no deben conservarse una vez abiertos. Desocher el exceso de medio después de finalizar el procedimiento.

Instrucciones de uso

A continuación se indica el procedimiento general para el cultivo de embriones mediante G-1™ V5 PLUS.
Para más información sobre el uso recomendado de G-1™ V5 PLUS, consulte por favor el "Manual Vitrolife G Series™". Información detallada de instrucciones de uso puede encontrarse a través de la página web de la empresa www.vitrolife.com. En ella también pueden encontrarse instrucciones de uso en otros idiomas.

Todos los platos (well o tubo) de cultivo deben estar limpios y preparados antes del procedimiento.
Por la tarde día de la colección de óvulos, coloque una placa de 60 mm con el identificador del paciente. Se recomienda utilizar placas de la máxima calidad. Rinsar las placas con G-1™ V5 PLUS, como mínimo, una vez. Coloque un mínimo de 6 gotas de 25 µL de G-1™ V5 PLUS en las placas. Las gotas se colocarán en las posiciones del reloj correspondientes a las 3, 6, 9 y 12 horas (para el cultivo de embriones). Las gotas se enjuagan tomando con la pipeta el volumen necesario para desecar el medio. Cúbralo con las gotas y asegure el medio. Cubrir las gotas inmediatamente con O2/CO₂ para evitar la evaporación. No prepare más de 2 placas a la vez. Usando una nueva punta para cada gota, coloque un mínimo de 6 gotas de 25 µL de G-1™ V5 PLUS en cada gota original. Esta técnica permite que las gotas permanezcan elevadas y no se aplaquen. Coloque inmediatamente la placa en el incubador con CO₂ al 6% y a 37°C. Retire cuidadosamente la tapa de la placa y asegure inmediatamente con el dedo índice. Esto garantiza el correcto equilibrio del medio.

Las placas deben equilibrarse en la incubadora con la tapa semiabierta durante un mínimo de 6 horas (esta es el tiempo mínimo para que los medios alcancen el pH correcto bajo el sealed) y un máximo de 18 horas.
Después de retirar las células del cultivo y de evaluar la fertilización, retire la placa y devuélvala a la incubadora. Coloque una placa de un solo pocillo y se le van en G-1™ V5 PLUS / G-2™ V5 PLUS enriquecido previamente. El lavado supone recoger el embrión 2 o 3 veces con la pipeta en el medio G-1™ V5 PLUS / G-2™ V5 PLUS. Es recomendable lavar los embriones 2 veces por cada transferencia. En las dos gotas centrales de la placa de cultivo, coloque hasta 5 embriones en cada gota de 50 µL de G-1™ V5 PLUS.

Los frascos no deben conservarse una vez abiertos. Desocher el exceso de medio después de finalizar el procedimiento.

Instrucciones de uso

A continuación se indica el procedimiento general para el cultivo de embriones mediante G-1™ V5 PLUS.
Para más información sobre el uso recomendado de G-1™ V5 PLUS, consulte por favor el "Manual Vitrolife G Series™". Información detallada de instrucciones de uso puede encontrarse a través de la página web de la empresa www.vitrolife.com. En ella también pueden encontrarse instrucciones de uso en otros idiomas.

Todos los platos (well o tubo) de cultivo deben estar limpios y preparados antes del procedimiento.
Por la tarde día de la colección de óvulos, coloque una placa de 60 mm con el identificador del paciente. Se recomienda utilizar placas de la máxima calidad. Rinsar las placas con G-1™ V5 PLUS, como mínimo, una vez. Coloque un mínimo de 6 gotas de 25 µL de G-1™ V5 PLUS en las placas. Las gotas se colocarán en las posiciones del reloj correspondientes a las 3, 6, 9 y 12 horas (para el cultivo de embriones). Las gotas se enjuagan tomando con la pipeta el volumen necesario para desecar el medio. Cúbralo con las gotas y asegure el medio. Cubrir las gotas inmediatamente con O2/CO₂ para evitar la evaporación. No prepare más de 2 placas a la vez. Usando una nueva punta para cada gota, coloque un mínimo de 6 gotas de 25 µL de G-1™ V5 PLUS en cada gota original. Esta técnica permite que las gotas permanezcan elevadas y no se aplaquen. Coloque inmediatamente la placa en el incubador con CO₂ al 6% y a 37°C. Retire cuidadosamente la tapa de la placa y asegure inmediatamente con el dedo índice. Esto garantiza el correcto equilibrio del medio.

Las placas deben equilibrarse en la incubadora con la tapa semiabierta durante un mínimo de 6 horas (esta es el tiempo mínimo para que los medios alcancen el pH correcto bajo el sealed) y un máximo de 18 horas.
Después de retirar las células del cultivo y de evaluar la fertilización, retire la placa y devuélvala a la incubadora. Coloque una placa de un solo pocillo y se le van en G-1™ V5 PLUS / G-2™ V5 PLUS enriquecido previamente. El lavado supone recoger el embrión 2 o 3 veces con la pipeta en el medio G-1™ V5 PLUS / G-2™ V5 PLUS. Es recomendable lavar los embriones 2 veces por cada transferencia. En las dos gotas centrales de la placa de cultivo, coloque hasta 5 embriones en cada gota de 50 µL de G-1™ V5 PLUS.

S819a Stein, Alberto da Costa

Avaliação dos parâmetros seminais no desenvolvimento embrionário em mulheres submetidas à fertilização *in vitro* com estimulação ovariana / Alberto da Costa Stein ; orient. Walter José Koff. – 2010.

83 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

1. Análise do sêmen 2. Desenvolvimento embrionário 3. Indução da ovulação 4. Fertilização *in vitro* I. Koff, Walter José II. Título.

NLM: WQ 208