



**Faculdade de Medicina da UFMG**

**Avaliação morfológica e  
morfométrica de oócitos  
humanos e predição da  
qualidade embrionária pré-  
implantação em  
procedimentos de injeção  
intracitoplasmática de  
espermatozóides**

**MARIA DAS GRAÇAS ROCHA  
DE SANTANA CAMARGOS**

Belo Horizonte

2007

**MARIA DAS GRAÇAS ROCHA DE SANTANA CAMARGOS**

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA  
DE OÓCITOS HUMANOS E PREDIÇÃO DA  
QUALIDADE EMBRIONÁRIA PRÉ-IMPLANTAÇÃO  
EM PROCEDIMENTOS DE INJEÇÃO  
INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZÓIDES**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina - Saúde da Mulher, do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Fernando Marcos dos Reis.

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Márcia Mendonça Carneiro.

Belo Horizonte

Faculdade de Medicina - UFMG

2007

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Aos meus três amores,  
Aroldo, André e Marcelo.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu marido, Aroldo, por estar sempre ao meu lado me incentivando, apoiando e ajudando, através de seu carinho, força, determinação e competência.

Ao Professor Fernando Marcos dos Reis, meu orientador, pelo apoio e incentivo constantes durante a execução deste trabalho.

À Professora Márcia Mendonça Carneiro, minha co-orientadora, pela correção, auxílio e sugestões dadas a este trabalho.

À Dr<sup>a</sup> Cláudia Navarro Carvalho Duarte Lemos, minha amiga, que tanto me apoiou e me incentivou.

A todo o corpo clínico do Laboratório de Reprodução Humana, professores, médicos e residentes, pela seleção dos pacientes e constante incentivo.

Ao Dr. Francisco Pereira Nunes, por toda a disponibilidade e consultoria na área de informática.

Às monitoras de graduação, Elisa Moraes Leão, Camila Neiva Moreira de Araújo, Aline Cristina Vieira, e Bioquímica Juliana Polisseni, pelo tempo dispensado no laboratório na realização das filmagens.

À Bióloga e amiga, Verônica Nere de Magalhães Lobach, pelo seu valioso trabalho de digitação e seleção de imagens e constante incentivo.

À Secretária Juliana Alves Oliveira, Enfermeira Edna Câmara Sant'Anna, Bioquímico Marco Aurélio Fernandes Vieira e Patologista Simone França, pelos suportes administrativos e técnicos.

À minha família pelo carinho, apoio e força durante a realização deste trabalho.

## RESUMO

A preocupação atual dos laboratórios de Reprodução Humana é selecionar o melhor embrião para transferência, a fim de reduzir-se o número de embriões transferidos. Existe também a preocupação com a qualidade oocitária devido à legislação existente em alguns países, onde é permitido somente inseminar reduzido número de oócitos. A proposta deste estudo é correlacionar os parâmetros morfológicos e morfométricos dos oócitos com a ocorrência de fecundação e aspectos morfológicos de zigotos e embriões do segundo dia de cultivo em procedimentos de ICSI. Foi realizada uma avaliação morfológica e morfométrica de 220 oócitos previamente à realização da injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), usando-se o *software Cronus*<sup>Tm3</sup>. Esses oócitos foram provenientes de 27 pacientes do Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da UFMG, candidatas à ICSI. Os zigotos mais bem classificados foram gerados de oócitos maiores, ( mediana 75,6  $\mu\text{m}$ ,  $p < 0,01$ ) com espaço perivitelino menor (mediana 5,3  $\mu\text{m}$ ,  $p < 0,01$ ). Entretanto, a medida da zona pelúcida e do corpúsculo polar não se associaram com a qualidade desses zigotos. Os zigotos mais bem classificados foram gerados independentemente dos achados morfológicos dos oócitos (granulação citoplasmática, vacúolos, inclusões citoplasmáticas e corpúsculos polares fragmentados). As ocorrências de fertilização e clivagem de embriões no segundo dia de cultivo não se correlacionaram com os dados morfométricos (medida do diâmetro do oócito, espaço perivitelino, zona pelúcida e corpúsculo polar) e morfológicas (granulações citoplasmáticas, vacúolos, inclusões citoplasmáticas e fragmentação do corpúsculo polar) dos oócitos.

A avaliação morfométrica de oócitos pode ser preditiva da qualidade de zigotos. Entretanto, a avaliação morfológica não se associa com presença de fecundação, formação de zigoto e desenvolvimento embrionário de segundo dia de cultivo.

Palavras-chave: Morfologia e morfometria de oócitos. Reprodução humana. Injeção intracitoplasmática de espermatozoides.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHO	Bloqueio hipotalâmico-ovariano
BLST	Blastômero
CCO	<i>Complexo cumulus oophorus</i>
CG	Células da granulosa
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CP	Corpúsculo polar
CPF	Corpúsculo polar fragmentado
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
E	Espermatozóide
EPV	Espaço perivitelino
ESCA	Esterelidade sem causa aparente
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo-estimulante
G	Granulações
HC	Hospital das Clínicas
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
hMG	Gonadotrofina da menopausa
IC	Inclusões citoplasmáticas
ICSI	Injeção intracitoplasmática
LH	Hormônio luteinizante
LHRH	Hormônio liberador de hormônio luteinizante
MCI	Massa celular interna
N	Nucléolo
Nu	Núcleo
PH	Pipeta de Holding
PI	Pipeta de injeção
PN	Pró-núcleo
PVP	Polivinilpirrolidona
rpm	Rotação por minuto
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>

STB	Salpingotripsia bilateral
TRA	Técnica de reprodução assistida
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
V	Vacúolo
VG	Vesícula germinativa
ZP	Zona pelúcida

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Figuras

Figura 1 - Injeção intracitoplasmática de espermatozóides.....	29
Figura 2 - Oócito em estágio de prófase I (VG).....	30
Figura 3 - Oócito em metáfase I.....	30
Figura 4 – Oócito em metáfase II.....	32
Figura 5 - Oócito em metáfase II com citoplasma granuloso.....	33
Figura 6 - Oócito em metáfase II apresentando fragmentação do corpúsculo polar.....	34
Figura 7 - Oócito em metáfase II com presença de vacúolo no ooplasma.....	35
Figura 8 - Oócito em metáfase II apresentando inclusões citoplasmáticas.....	36
Figura 9 - Oócito fertilizado com presença de dois pró-núcleos.....	37
Figura 10 - Disposição dos pró-núcleos: centralizados.....	38
Figura 11 - Disposição dos pró-núcleos: não centralizados.....	39
Figura 12 - Disposição dos pró-núcleos: separados.....	40
Figura 13 - Disposição dos pró-núcleos: tamanhos diferentes.....	41
Figura 14 - Disposição dos pró-núcleos: fragmentado.....	42
Figura 15 - Disposição dos nucléolos: grandes e alinhados.....	43
Figura 16 - Disposição dos nucléolos: grandes e dispersos.....	44
Figura 17 - Disposição dos nucleolus: alinhados e outro disperso.....	45
Figura 18 - Disposição dos nucléolos: pequenos e dispersos.....	46
Figura 19 - Disposição dos pró-núcleos em relação ao corpúsculo polar, alinhamento longitudinal.....	47
Figura 20 - Disposição dos pró-núcleos em relação ao corpúsculo polar, alinhamento perpendicular.....	48
Figura 21 - Embrião no segundo dia de cultivo (duas células).....	50
Figura 22 - Embrião no segundo dia cultivo (quatro células).....	51
Figura 23 - Embrião no terceiro dia de cultivo (oito células).....	52
Figura 24 - Embrião no quinto dia de cultivo.....	53

## **Gráficos**

Gráfico 1 - Relação medida do oócito e fertilização (p=0,218).....	56
Gráfico 2 - Relação entre medida do espaço perivitelino e fertilização (p=0,319).....	57
Gráfico 3 - Relação entre medida da zona pelúcida e fertilização (p=0,395).....	58
Gráfico 4 - Relação entre medida do corpúsculo polar e fertilização (p=0,885).....	59
Gráfico 5 - Relação entre a medida do oócito e classificação do zigoto (p<0,01, Teste de Mann Whitney).....	61
Gráfico 6 - Relação entre a medida do oócito e classificação do zigoto..	62
Gráfico 7 - Relação entre medida do espaço perivitelino e classificação do zigoto (p < 0,01, Teste Mann Whitney).....	63
Gráfico 8 - Relação entre a medida da zona pelúcida e a classificação do zigoto.....	64
Gráfico 9 - Relação entre a medida do corpúsculo polar e classificação do zigoto (p=0,76).....	65
Gráfico 10 - Medida do oócito e clivagem no segundo dia após a inseminação (p=0,080).....	67
Gráfico 11 - Medida do espaço perivitelino e clivagem no segundo dia após a inseminação (p=0,108).....	68
Gráfico 12 - Medida da zona pelúcida e clivagem no segundo dia após a inseminação (p=0,504).....	69
Gráfico 13 - Medida do corpúsculo polar e clivagem no segundo dia após a inseminação (p=0,559).....	70

## **Quadro**

Quadro 1 - Classificação do zigoto.....	49
---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de casos de acordo com o tipo de diagnóstico.....	25
Tabela 2 - Idade dos pacientes (anos).....	25
Tabela 3 - Características da amostra.....	26
Tabela 4 - Oócitos fertilizados.....	55
Tabela 5 - Parâmetros morfológicos do oócito em relação à ocorrência de fertilização.....	60
Tabela 6 - Parâmetros morfológicos do oócito em relação à classificação do zigoto.....	66
Tabela 7 - Parâmetros morfológicos do oócito em relação à ocorrência de clivagem no segundo dia após a inseminação.....	71
Tabela 8 - Análise multivariada dos fatores potencialmente associados à presença de zigotos bem classificados(classe de 1 a 6).....	71

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVO.....	23
3 PACIENTES E MÉTODOS.....	24
3.1 Pacientes.....	24
3.1.1 Critérios de inclusão.....	24
3.1.2 Critérios de exclusão.....	24
3.1.3 Características da amostra.....	25
3.2 Metodologia.....	26
3.2.1 Hiperestimulação ovariana.....	26
3.2.2 Aspiração follicular.....	27
3.2.3 Preparo do sêmen.....	28
3.2.4 Técnica de ICSI.....	28
3.2.5 Avaliação morfométrica dos oócitos.....	31
3.2.5.1 Diâmetro do oócito.....	31
3.2.5.2 Zona pelúcida.....	31
3.2.5.3 Espaço perivitelino.....	31
3.2.5.4 Corpúsculo polar.....	32
3.2.6 Avaliação morfológica dos oócitos.....	32
3.2.6.1 Granulações citoplasmáticas.....	33
3.2.6.2 Fragmentação do corpúsculo polar.....	34
3.2.6.3 Vacúolos.....	35
3.2.6.4 Inclusões citoplasmáticas.....	36
3.2.7 Avaliação morfológica do zigoto.....	37
3.2.7.1 Disposição dos pró-núcleos.....	38
3.2.7.2 Disposição dos nucléolos.....	43
3.2.7.3 Disposição dos pró-núcleos em relação ao corpúsculo polar.....	47
3.2.8 Avaliação morfométrica dos embriões no segundo dia de cultivo...	50
3.2.9 Avaliação morfológica dos embriões no segundo dia de cultivo.....	51
3.2.10 Avaliação de desfechos.....	53

3.2.11 Análise estatística.....	54
4 RESULTADOS.....	55
4.1 Parâmetros morfométricos e morfológicos dos oócitos em relação à fertilização.....	55
4.1.1 Parâmetros morfométricos.....	55
4.1.2 Parâmetros morfológicos.....	60
4.2 Parâmetros morfométricos e morfológicos dos oócitos em relação à classificação do zigoto.....	60
4.2.1 Parâmetros morfométricos.....	60
4.2.2 Parâmetros morfológicos.....	66
4.3 Parâmetros morfométricos e morfológicos em relação à clivagem de embrião do segundo dia após a ICSI.....	66
4.3.1 Parâmetros morfométricos.....	66
4.3.2 Parâmetros morfológicos.....	70
5 DISCUSSÃO.....	72
5.1 Morfologia e morfometria de oócitos em relação à fertilização.....	72
5.2 Morfologia e morfometria do oócito em relação à classificação do zigoto.....	75
5.3 Morfologia e morfometria dos oócitos em relação a ocorrência de clivagem de embrião do segundo dia de cultivo.....	76
6 CONCLUSÕES.....	78
REFERÊNCIAS.....	79
APÊNDICES E ANEXO.....	82

## 1 INTRODUÇÃO

Desde o início do aparecimento das técnicas de reprodução assistida (TRA), tem-se demonstrado constante preocupação em avaliar todas as etapas envolvidas no processo para melhor determinar qual ou quais variáveis podem interferir na escolha do melhor embrião para transferência.

O sucesso das técnicas de reprodução assistida depende da eficiência individual de cada procedimento. Apesar dos grandes avanços obtidos nas TRAs, as taxas de gravidez/ciclo permanecem em torno de 25-30%. A transferência de um número maior de embriões é uma estratégia para assegurar boas taxas de gravidez, mas resulta no aumento de gestações múltiplas.

O controle adequado da hiperestimulação ovariana, da coleta ovular, condições de cultura e transferência embrionária viabiliza o aumento das taxas de gravidez.

Métodos não invasivos para avaliar o melhor embrião têm sido utilizados em Medicina Reprodutiva, baseando-se na simples observação da morfologia oocitária e dinâmica do desenvolvimento embrionário.

Selecionar o melhor embrião para transferência reduz o número de embriões transferidos e, conseqüentemente, a incidência de gravidez múltipla.

Várias classificações referentes a diferentes critérios de avaliação embrionária são utilizadas em Reprodução Assistida<sup>1-3</sup>.

Os parâmetros que se seguem geralmente são os que mais influenciam a seleção de embriões de boa qualidade:

- Característica do oócito.
- Aparência do citoplasma (vacúolos, granulações) e zona pelúcida.
- Estrutura e localização do corpúsculo polar.
- Morfologia dos pró-núcleos.
- Tempo de clivagem.
- Número de blastômeros relacionados com os dias de cultivo.
- Tamanho, simetria e fragmentação dos blastômeros.
- Compactação e expansão dos blastômeros.
- Multinucleação - mais de um núcleo em cada blastômero.

Esses parâmetros serão descritos a seguir, de acordo com os trabalhos encontrados na literatura.

Uma boa correlação entre o aumento do diâmetro do folículo e a taxa de fertilização independente da morfologia do *complexo cumulus oophorus* foi encontrada por Scott (2003)<sup>4</sup>. Essa morfologia não afetou significativamente a taxa de fertilização quando o folículo dominante possuía diâmetro  $\geq 16$  mm. Medir os folículos antes da coleta ovular pode ser eficaz para prever o potencial de fertilização de oócitos em ciclos de FIV. Portanto, somente oócitos obtidos de folículos maiores poderiam ser inseminados, evitando-se assim número exagerado de oócitos na coleta ovular<sup>5</sup>.

A doplervelocimetria dos vasos foliculares pode indicar boa qualidade oocitária<sup>4</sup>.

A qualidade do oócito foi avaliada pela incidência de apoptose nas células da granulosa e prognóstico desse oócito quando inseminado por injeção intracitoplasmática (ICSI) ou fertilização *in vitro* (FIV) convencional. A maturidade do oócito foi descrita, conforme a observação do *complexo cumulus oophorus*, como: oócito maduro-células do *cumulus* expandida e solta, oócito imaturo-células do *cumulus* densa e pequena. As células do *cumulus* foram retiradas do líquido folicular, lavadas, fixadas e avaliadas ao microscópio. A qualidade do oócito foi definida pela incidência de células apoptóticas da granulosa, definidas como aquelas com fragmentação, núcleo denso ou fragmentado. Os embriões de boa qualidade que foram provenientes de oócitos que possuíam células da granulosa apoptóticas obtiveram melhor resultado no procedimento de ICSI do que em procedimento de FIV convencional. A inseminação pela técnica de FIV pode afetar adversamente os oócitos devido à alta concentração de várias enzimas produzidas pela concentração e exposição de espermatozóides no meio de cultivo. O autor sugere que seja devido a esse fato que o número de oócitos com células da granulosa apoptóticas seja maior em procedimentos de FIV. Apesar desses achados, a taxa de gravidez nos dois grupos foi similar<sup>6</sup>.

A correlação entre as células do *complexo cumulus oophorus* (CCO) e a maturidade nuclear dos oócitos desnudados para ICSI foi realizada em um estudo prospectivo. As células do *cumulus* foram classificadas de acordo com o grau de expansão, usando-se pontuações de zero a quatro. O CCO foi então classificado como imaturo, maduro e pós-maduro. Após essa classificação, os

oócitos foram desnudados e classificados de acordo com a maturidade (prófase, metáfase I e metáfase II). Esse estudo sugere que a aparência do CCO não pode prever maturidade nuclear, fertilização e capacidade de desenvolvimento embrionário dos oócitos que foram obtidos desse *complexo* avaliado, devido à grande subjetividade na avaliação dos seus parâmetros do CCO<sup>7</sup>.

Após a desnudação dos oócitos para a realização da técnica de ICSI, algumas anormalidades foram detectadas, como: granulosidade excessiva, inclusões citoplasmáticas e vacúolos. Em oócitos contendo granulosidade homogênea ou central no citoplasma, observou-se taxa normal de fertilização após ICSI. Oócitos com inclusões citoplasmáticas podem ter fertilização normal com ICSI, mas não alcançam a gravidez. O resultado da ICSI é dependente da qualidade dos oócitos coletados<sup>8</sup>.

Estudos mostram que, acessando a maturidade nuclear e citoplasmática dos oócitos, existe correlação entre a qualidade dos oócitos, qualidade embrionária e taxa de gravidez. A maturidade do citoplasma foi definida como citoplasma claro, com estrutura uniforme e granulosidade homogênea e fina. A imaturidade do citoplasma foi definida como a presença de vacúolos e fragmentos no citoplasma. Essas pesquisas concluíram que uma análise acurada da maturidade do oócito nuclear e citoplasmática aumenta a taxa de gravidez em oócitos de boa qualidade, comparada com aqueles de morfologia alterada<sup>9</sup>.

Um estudo prospectivo foi realizado para testar se o uso da morfologia de oócitos é indicador de fertilização, desenvolvimento embrionário e potencial de implantação. Os parâmetros considerados na avaliação dos oócitos foram: granulosidade do oócito - presença de áreas heterogêneas no citoplasma. De acordo com a localização de granulações no citoplasma, foram definidas pontuações de um a três para classificá-los. A existência de vacúolos ou inclusões citoplasmáticas também foi considerada na avaliação do oócito. Foi examinada a correlação usando oócitos de escores separados com a fertilização e características de desenvolvimento embrionário. Quando duas anormalidades foram encontradas nos oócitos, houve redução na taxa de fertilização. Um outro escore morfológico foi examinado correlacionando a ruptura da membrana plasmática no momento da ICSI, usando características como ruptura normal, fácil e difícil. A combinação de resultados sugere que oócitos com granulosidade de um lado do citoplasma, sem vacúolo, vesícula ou inclusões citoplasmáticas e

ruptura fácil no momento da ICSI traduz um oócito de melhor qualidade. A morfologia dos oócitos correlaciona-se com a morfologia de zigotos e qualidade embrionária no segundo dia de cultivo. Os dados indicam que a análise morfológica de oócitos para selecionar oócitos de melhor qualidade pode aumentar a taxa de gravidez em pacientes provenientes de procedimentos de ICSI<sup>10</sup>.

As variações observadas na morfologia dos oócitos após a remoção das células do *cumulus* foram: zona pelúcida escura, espaço perivitelino alargado, vacúolos, inclusões citoplasmáticas e forma irregular do oócito. Essas variações não se correlacionaram nem com a taxa de fertilização nem com o escore de qualidade embrionária quando comparadas com oócitos considerados morfológicamente ideais (oócito de forma regular, zona pelúcida clara, espaço perivitelino estreito, ooplasma claro, granulidade homogênea e corpúsculo polar arredondado ou oval e sem fragmentações). Mesmo oócitos com morfologia alterada associados à baixa taxa de fertilização em ciclos de FIV foram fertilizados por ICSI. Esse estudo retrospectivo sugere que casais com falha de FIV ou aqueles com oócitos com morfologia alterada podem se beneficiar da ICSI<sup>11-13</sup>.

A avaliação da incidência de granulidade no espaço perivitelino do oócito em diferentes estágios de maturidade (prófase, metáfase I e metáfase II) foi investigada e correlacionada com os resultados de ICSI, verificando-se que a granulidade do espaço perivitelino pode ser devida à maturação fisiológica sem efeito na fertilização, clivagem e qualidade embrionária, podendo ser realçada com altas dosagens de gonadotrofina da menopausa (hMG) na hiperestimulação ovariana. A natureza dessas granulidades necessita ser determinada com clareza<sup>14</sup>.

Foi analisada a morfologia dos oócitos e do corpúsculo polar (CP). Na morfologia do oócito, descreveram-se: granulidade, espessura da zona pelúcida, formas irregulares e inclusões citoplasmáticas. O corpúsculo polar foi classificado de acordo com quatro critérios morfológicos: a) CP oval ou redondo e superfície lisa; b) CP oval ou redondo e superfície irregular; c) CP fragmentado; d) espaço perivitelino aumentado. Uma associação significativa foi encontrada entre oócitos classificados com base na morfologia do primeiro corpúsculo polar e qualidade embrionária<sup>15</sup>.

Um estudo retrospectivo em pacientes de ICSI foi realizado para verificar a correlação entre o primeiro corpúsculo polar, qualidade embrionária, gravidez e taxa de implantação. O primeiro CP foi classificado de acordo com o grau de fragmentação, forma e tamanho. Essa morfologia foi checada duas vezes. A primeira observação foi realizada no momento da desnudação do oócito e a segunda no momento da ICSI. O tempo entre a coleta ovular e a ICSI também foi avaliado. Não houve relação significativa entre a morfologia do primeiro corpúsculo polar, taxa de fertilização, taxa de clivagem, qualidade embrionária, taxa de gravidez e taxa de implantação. Uma significativa correlação foi encontrada entre a frequência da fragmentação do primeiro corpúsculo polar e o tempo marcado entre a desnudação dos oócitos e ICSI. As taxa de gravidez foram maiores quando os oócitos foram injetados entre cinco e sete horas após desnudação dos oócitos<sup>16</sup>.

A variabilidade da zona pelúcida mostrou-se um parâmetro na seleção de embriões para transferência usando o método descrito por Cohen (1989). Quando o cálculo da variação da espessura da zona pelúcida é maior, há melhora na taxa de implantação<sup>17</sup>.

A morfologia de zigotos de 16 a 18 horas após a inseminação pode ser usada para pré-selecionar-se embriões com alto potencial de implantação. Usando um sistema de escore para classificar os pró-núcleos de acordo com o tamanho e posicionamento dos nucléolos, pode-se selecionar esses embriões limitando-se o número de embriões transferidos e, conseqüentemente, evitando-se gravidez múltipla<sup>18</sup>.

Zigotos foram classificados em cinco categorias, de acordo com o alinhamento e tamanho dos pró-núcleos, alinhamento e distribuição dos nucléolos e posição dos pró-núcleos dentro dele. Após a classificação, os zigotos foram comparados com a morfologia embrionária do terceiro dia de cultivo e habilidade de desenvolvimento até estágio de blastocisto. Os embriões de terceiro dia de cultivo receberam classificação de um a cinco, de acordo com o número e tamanho de blastômeros, grau de fragmentação e multinucleação. Os embriões foram selecionados para transferência com base primeiramente no terceiro dia de cultivo e também a partir da avaliação do zigoto e morfologia embrionária simultaneamente. Quando o zigoto obteve classificação inadequada, prevaleceu a

escolha do embrião para a transferência com base na morfologia embrionária (embrião de terceiro e quinto dias de cultivo)<sup>18</sup>.

Existe relação entre a morfologia do embrião do terceiro dia de cultivo, a habilidade do desenvolvimento desse embrião em estágio de blastocisto e a classificação do zigoto. A habilidade de o embrião desenvolver-se *in vitro* até o estágio de blastocisto e a capacidade de implantar-se estão diretamente relacionadas com a morfologia do zigoto nesse trabalho<sup>18</sup>.

Os zigotos foram classificados em sete tipos, de acordo com a distribuição dos nucléolos nos pró-núcleos, para verificar o potencial de implantação desse estágio. Aqueles com pró-núcleos contendo  $\leq 7$  nucléolos polarizados mostraram taxa mais alta de gravidez e implantação, comparada com aqueles em que esse tipo de pró-núcleo não foi encontrado para transferência. A seleção de embriões para transferência não deve se ater somente à morfologia embrionária. Outros critérios como morfologia dos pró-núcleos também devem ser considerados. A combinação da morfologia embrionária e zigoto pode ter valor preditivo melhor na seleção de embriões para transferência<sup>19-22</sup>.

A presença ou ausência de “halo citoplasmático” - área densa que aparece após a fertilização - é indicador da ocorrência de redistribuição de mitocôndrias e rotação dos pró-núcleos para orientação em relação ao corpúsculo polar. Zigotos com presença de “halo citoplasmático” têm melhor orientação dos pró-núcleos, desenvolvimento rápido e escore morfológico melhor do que aqueles que não possuem “halo citoplasmático”. A presença do “halo citoplasmático” está associada ao aumento de desenvolvimento embrionário e potencial de implantação. A morfologia dos pró-núcleos tem efeito significativo na habilidade do desenvolvimento embrionário *in vitro*<sup>4,21</sup>.

A comparação obtida a partir de um estudo randomizado entre a morfologia pró-nuclear e a velocidade de clivagem embrionária inicial mostrou não haver diferença entre as taxas de gravidez entre os grupos<sup>22</sup>.

A morfologia dos pró-núcleos e nucléolos parece ser de grande importância para determinar a formação de blastocisto. Existe significativa associação entre singamia ou clivagem 25 horas após a inseminação e clivagem 42 horas após inseminação, indicando que embriões lentos não alcançam estágios mais avançados<sup>23</sup>.

Durante a avaliação morfológica de embriões de segundo e terceiro dia de cultivo, verificaram-se blastômeros anucleados, mononucleados ou multinucleados. A multinucleação indica quebra de um ou mais eventos celulares, podendo ser resultado de eventos mitóticos anormais envolvendo o fuso. Os embriões contendo blastômeros multinucleados foram analisados por Fish *et al.*,<sup>24</sup> que usaram várias sondas para determinar se a presença de blastômeros multinucleados indicaria anormalidades cromossômicas em blastômeros com aparência normal e mononucleado. A incidência de anormalidades cromossômicas foi a mesma entre embriões com dois, três ou mais núcleos.

Os embriões em que foi detectada a multinucleação no segundo ou terceiro dia de desenvolvimento têm mais incidência de anormalidades cromossômicas do que os sem multinucleação. A taxa de implantação e de gravidez de embriões transferidos com blastômeros multinucleados é mais baixa do que aquelas envolvendo embriões mononucleados<sup>4,25,26</sup>.

A multinucleação é melhor analisada quando o embrião é visualizado no segundo dia após a inseminação. Assim, foi detectada em 87% da amostra estudada (32,7% de FIV e 34,5 % de ICSI). Quando os fatores masculinos e femininos estavam presentes, 32,2% dos embriões estavam multinucleados; quando existia somente o fator masculino, 34,7% dos embriões estavam multinucleados; e quando existia apenas o fator feminino, 32,7% estavam multinucleados, mostrando que o fator da infertilidade não é determinante para o aparecimento da multinucleação. A indução de ovulação  $\leq 15$  dias de uso de gonadotrofina resulta em porcentagem mais alta de embriões multinucleados. A hiperestimulação ovariana que usou maior número de ampolas de gonadotrofina foi associada ao aumento de multinucleação. Um número  $\geq 10$  oócitos coletados possuiu porcentagem mais alta de embriões multinucleados. A maior incidência de embriões mononucleados coincidiu com a melhor divisão embrionária e melhor taxa de implantação<sup>27</sup>.

No desenvolvimento embrionário, ocorrem mudanças nas funções metabólicas, anabólicas e catabólicas. Nos primeiros estágios, os embriões usam piruvato e depois glicose, produzindo lactato. O uso da glicose, do piruvato e o aparecimento do lactato estão relacionados com a qualidade embrionária. Vários sistemas de score embrionário são utilizados em reprodução assistida para a escolha de embriões para transferência. Um dos sistemas mais utilizados é o da

Veeck (1999),<sup>13</sup> em que há classificação gradativa da morfologia embrionária. Essa classificação segue os seguintes parâmetros:

- Grau 1 - embrião com blastômeros iguais, sem fragmentação citoplasmática;
- Grau 2 - embrião com blastômeros iguais,  $\leq 15\%$  fragmentação citoplasmática;
- Grau 3 - embrião com blastômeros desiguais, fragmentações variadas.
- Grau 4 - embrião com blastômeros de tamanhos iguais ou desiguais e  $\geq 20\%$  de fragmentação citoplasmática.
- Grau 5 - embrião com poucos blastômeros  $\geq 50\%$  de fragmentação citoplasmática<sup>13</sup>.

O grau de fragmentação pode ser usado para selecionar embriões em estágio de clivagem. A fragmentação pode ser devida a condições de cultura não adequada, a qual induz multinucleação e morte celular ou apoptose. Se a fragmentação envolver muitas células, o embrião pode ser prejudicado no seu desenvolvimento. Se o embrião continuar desenvolvendo esses fragmentos, estes podem ser excluídos assim que as células se compactarem para formar blastocisto<sup>4</sup>.

Foram identificados alguns prognósticos variáveis da probabilidade de gravidez após transferência de embrião, como: idade da paciente, causa da infertilidade, número de embriões transferidos e escore médio da morfologia embrionária. O escore médio da morfologia e o número de embriões transferidos tiveram melhor valor preditivo para a probabilidade de gravidez do que o escore cumulativo de embrião. A idade da paciente foi a mais importante variável avaliada<sup>28</sup>.

A taxa de implantação nos embriões provenientes de ICSI e FIV é similar nos dois grupos, apesar dos embriões de FIV possuírem melhor taxa de clivagem e melhor escore em morfologia. Os embriões de mulheres mais velhas demonstraram significativo prejuízo em termos de clivagem<sup>29</sup>. Os embriões humanos foram avaliados por meio de um escore gradativo de qualidade, no primeiro e segundo dias de cultivo, observando-se número de células, morfologia e porcentagem de fragmentação.

A primeira avaliação foi realizada 16-18 horas após a inseminação e constatado alinhamento nucleolar ao longo do eixo pronuclear. A segunda avaliação ocorreu 25-27 horas após a inseminação, identificando-se clivagem simétrica ou assimétrica e pelo grau de fragmentação. A avaliação final ocorreu 64-67 horas após a inseminação e foram observadas as características morfológicas, como o número de células e grau de fragmentação. O resultado dos ciclos (gravidez em andamento e taxa de implantação) foi comparado com base em: dias de transferência, alinhamento nucleolar, clivagem, grau do embrião no terceiro dia de cultivo e escore gradativo dos embriões. Nesse estudo<sup>30</sup>, a transferência de um ou mais embriões que possuíam o escore gradativo de embriões  $\geq 70$  obteve maior valor preditivo de taxa de gravidez e implantação do que a avaliação simples da morfologia do terceiro dia de cultivo. Essa revisão da literatura mostra que o processo de fertilização *in vitro* merece ser mais investigado.

Os parâmetros que determinam a qualidade embrionária e, conseqüentemente, uma boa taxa de gravidez clínica até então foram obtidos, na maioria das vezes, de estudos retrospectivos, nos quais, não raro, o tamanho amostral não era adequado para permitir conclusões valiosas.

Em alguns países como Alemanha, Itália e Suíça, a legislação restringe número máximo de embriões para transferência. Na Itália, somente três oócitos podem ser inseminados, portanto, há grande preocupação em obter-se critério rigoroso na seleção dos oócitos para os procedimentos de ICSI ou FIV.

Novos estudos prospectivos e multicêntricos necessitam ser realizados para determinarem-se efetivamente as variáveis que indicam uma boa taxa de gravidez.

## **2 OBJETIVO**

Correlacionar os parâmetros morfológicos e morfométricos dos oócitos com a ocorrência de fecundação e aspectos morfológicos de zigotos e embriões no segundo dia de cultivo, em procedimentos de ICSI.

## 3 PACIENTES E MÉTODOS

### 3.1 Pacientes

Trata-se de um estudo prospectivo, descritivo, envolvendo 32 pacientes provenientes do Serviço de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais que se submeteram ao tratamento de infertilidade utilizando a técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI).

#### 3.1.1 Critérios de inclusão

- Assinatura, pelo casal, no consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A).
- Mulheres maiores de 37 anos que se submeteram ao teste do citrato de clomifeno mostrando a somatória das medidas do hormônio folículo-estimulante (FSH) inferior a 26 e a concentração do FSH no 10º dia inferior à do terceiro dia do ciclo menstrual.
- Ciclo de indução longo com hiper-estímulo ovariano utilizando FSH recombinante (dose aproximada de 1800 UI), gonadotrofina coriônica humana (hCG) recombinante (dose de 250 mg) e análogo do hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH) via nasal (nafarelina) na dose de 400 mcg/ dia.
- Espermatozóides utilizados para o procedimento de ICSI considerados de morfologia normal em exame a fresco.

#### 3.1.2 Critérios de exclusão

- Retirada do consentimento livre e esclarecido pelo casal.

- Emprego de hormônio luteinizante (LH) recombinante, hCG urinário ou FSH urinário no ciclo de indução.
- Emprego do ciclo de indução do tipo *flare up*.
- Portadoras de síndrome dos ovários policísticos.
- Espermograma com morfologia alterada.

### 3.1.3 Características da amostra

Os casais selecionados possuíam os seguintes diagnósticos:

TABELA 1

Número de casos de acordo com o tipo de diagnóstico

<b>Tipo de diagnóstico</b>	<b>Nº. de casos</b>
Oligoastenozoospermia	19
Azoospermia obstrutiva	02
Endometriose	01
Salpingotripsia bilateral (STB)	03
Obstrução tubária	01
Esterilidade sem causa aparente (ESCA)	01
Receptora	05
<b>Total</b>	<b>32</b>

TABELA 2

Idade dos pacientes (anos)

<b>Parâmetro</b>	<b>Idade da mulher (n=27)*</b>	<b>Idade do homem (n=32)</b>
Mínimo	24	26
Máximo	38	56
Média	33	38
Desvio-padrão	3	7
Distribuição normal	sim	sim

\*Excluindo os 5 casos de receptores de oócitos.

TABELA 3  
Características da amostra

<b>Parâmetros</b>	<b>Valor</b>
Número de oócitos	258
Número de oócitos selecionados para ICSI	220
Número de oócitos fertilizados	155
Número de embriões transferidos	92
Número de embriões congelados	17
Taxa de gravidez/ciclo	40,6%

### 3.2 Metodologia

Este estudo foi aprovado pela Câmara do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG, parecer ETIC nº 485/05 (ANEXO A).

Foram incluídos casais participantes do Programa de Fertilização Assistida do Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Os participantes somente foram incluídos após leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A).

Os dados de cada paciente encontram-se no APÊNDICE B.

#### 3.2.1 Hiperestimulação ovariana

O bloqueio hipotalâmico ovariano (BHO) realizado com análogo do LHRH (nafarelina) via nasal na dose de 400 mcg/dia foi iniciado no 21º dia do ciclo menstrual. Após o término do fluxo menstrual, em ciclo sob ação do LHRH, realizou-se ecografia endovaginal para diagnóstico do BHO indicado pela espessura menor que 4 mm do endométrio e ausência do crescimento folicular.

Reconhecido o BHO, foi iniciada a indução do hiperestímulo com FSH recombinante (Gonal F ®) na dose de 300 UI por três dias e 150 UI nos dias subseqüentes.

O crescimento folicular foi acompanhado por ecografia endovaginal diária iniciada no quinto dia de uso do FSH. Quando pelo menos um folículo dominante atingiu o diâmetro de 18 mm, foi interrompido o emprego do FSH e do análogo LHRH e foi administrado o hCG recombinante na dose de 250 mg (Ovidrel ®).

### 3.2.2 Aspiração folicular

A paciente foi colocada em posição de litotomia, seguida de colocação de campo cirúrgico.

A anestesia utilizada foi venosa, com emprego de propofol sem intubação endotraqueal.

Os folículos foram puncionados aproximadamente 36 horas após a injeção do hCG, utilizando agulha de punção folicular de 17 gauge conectada a uma sonda transvaginal e a uma bomba de Craft (*Craft Suction Unit*) com pressão de 100 mmHg.

Coletou-se o líquido folicular em tubos de ensaios de 15 mL (Falcon®) aquecidos e mantidos em banho-maria a seco à temperatura de 37°C.

Os oócitos foram identificados em disco de cultura usando-se lupa estereomicroscópica. Após a identificação, foram colocados em placa de quatro poços (Nunc® Nunclon) em meio de cultivo (G-Fert ® Vitrolife) ou em microgotas cobertas com óleo mineral (Ovoil ® Vitrolife). Esses oócitos foram deixados por duas horas em estufa de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) à temperatura de 37°C e concentração de 6%. Após esse período, as células do *cumulus* e da *corona radiata* dos oócitos foram retiradas usando-se pipetas de Pasteur de diferentes calibres e hialuronidase (Hyase® -Vitrolife). Os oócitos em metáfase II foram microinjetados, conforme descrito por Steirteghem *et al.* (1993).

### 3.2.3 Preparo do sêmen

O preparo do sêmen foi realizado utilizando-se a técnica de *Swim-up*. O material coletado foi colocado em tubo de ensaio de 15 mL (Falcon®), acrescido de solução tampão (*Dulbecco's Phosphato buffered Saline-DPBS®*), o qual foi homogeneizado e centrifugado a 1.500 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos. Após essa centrifugação, o sobrenadante foi retirado e novamente acrescentados 2 mL de solução tampão a 37°C. Realizou-se mais uma centrifugação por cinco minutos. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* (sedimento resultante da centrifugação) foi suspenso em 1 mL de meio de cultivo, centrifugado por três minutos e deixado em estufa de CO<sub>2</sub> por aproximadamente 45 minutos. Após esse período, o sobrenadante foi retirado e mantido em estufa de CO<sub>2</sub> até o momento da ICSI.

### 3.2.4 Técnica de ICSI

Com o emprego de uma placa de cultura de 60 mm (Falcon®) foram realizadas microgotas de 50 µL de meio de cultivo (G-Mops®-Vitrolife) cobertos com óleo mineral (Ovoil®-Vitrolife) e deixados em estufa de CO<sub>2</sub> por pelo menos duas horas. Depois disso, os oócitos coletados foram colocados individualmente nas microgotas numeradas para serem microinjetados. Os espermatozóides foram depositados na gota central em solução viscosa polivinil polirridona-ICSI®-vitrolife (PVP) para diminuir a motilidade e facilitar a imobilização dos mesmos. O oócito foi fixado por uma micropipeta de sucção (*holding*) e o espermatozóide aspirado dentro da pipeta de injeção por meio de micromanipulador Narishige e microscópio Nikon com sistema de lentes Hoffmann. A microinjeção foi feita em oócitos em estágio de metáfase II com o seu primeiro corpúsculo polar posicionado em seis ou 12 horas (FIG. 1).

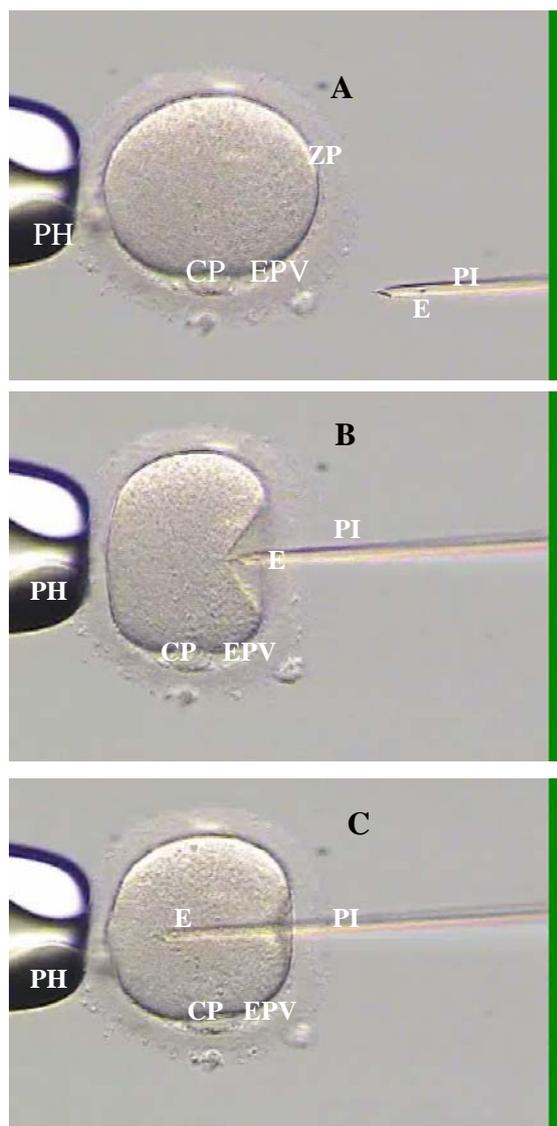


FIGURA 1 - Injeção intracitoplasmática de espermatozóides.

Objetiva 20 X. **1A**-Captura do espermatozóide, **1B**-Início da injeção de espermatozóide, **1C**-ICSI. CP = corpúsculo polar; E = espermatozóide; EPV = espaço perivitelino; PH = pipeta de Holding; PI = pipeta de injeção; ZP = zona pelúcida.

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas (HC) da UFMG.

Os oócitos em estágio de metáfase I (ausência do primeiro corpúsculo polar e vesícula germinativa) e prófase I (vesícula germinativa) foram separados por estarem imaturos para a realização da ICSI (FIG. 2 e 3).



FIGURA 2 - Oócito em estágio de prófase I (VG).

Objetiva 20 X. CG= células da granulosa; VG = vesícula germinativa; ZP = zona pelúcida.

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana do HC da UFMG.



FIGURA 3 - Oócito em metáfase I.

Objetiva 20 X. CG= células da granulosa; EPV = espaço perivitelino; PH = pipeta de Holding; germinativa; ZP = zona pelúcida

Fonte-Laboratório de Reprodução Humana do HC da UFMG.

Antes de ser iniciada a microinjeção, os oócitos foram filmados e fotografados para posterior avaliação morfológica e morfométrica. As imagens foram armazenadas no *software Cronus*<sup>TM3</sup>.

### 3.2.5 Avaliação morfométrica dos oócitos

As medidas e classificações dos oócitos, zigoto e de embrião do segundo, terceiro e quinto dias em cultivo foram realizadas por meio do *software Cronus*<sup>TM3</sup>.

#### 3.2.5.1 Diâmetro do oócito

Foram realizadas duas medidas do diâmetro do oócito em planos diferentes (FIG. 4). A média das medidas foi usada nos cálculos estatísticos.

#### 3.2.5.2 Zona pelúcida

Três medidas foram obtidas em planos aleatórios da zona pelúcida e sua média foi considerada para cálculos estatísticos (FIG. 4).

#### 3.2.5.3 Espaço perivitelino

O espaço perivitelino, quando visualizado, foi submetido a três medidas aleatórias e a média dessas medidas foi usada para cálculo estatístico (FIG. 4).

### 3.2.5.4 Corpúsculo polar

Duas medidas aleatórias do diâmetro do corpúsculo polar foram realizadas e a média dessas medidas foi usada para cálculo estatístico (FIG. 4).

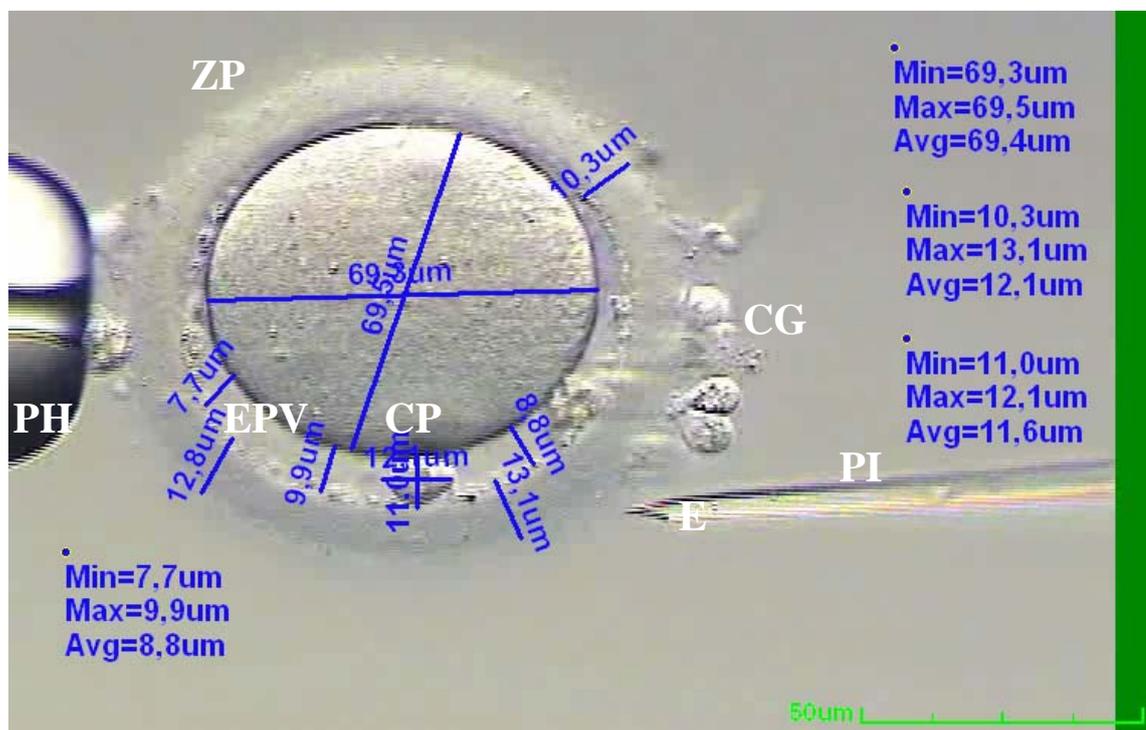


FIGURA 4 - Oócito em metáfase II.

Objetiva 20 X. CG = células da granulosa; CP = corpúsculo polar; E = espermatozóide; EPV= espaço perivitelino; PH = pipeta de Holding; PI = pipeta de injeção; ZP = zona pelúcida.

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana do HC da UFMG.

### 3.2.6 Avaliação morfológica dos oócitos

As características morfológicas do oócito (presente ou ausente) foram avaliadas de acordo com: granulações citoplasmáticas, fragmentação do corpúsculo polar, inclusões citoplasmáticas e vacúolos.

### 3.2.6.1 Granulações citoplasmáticas

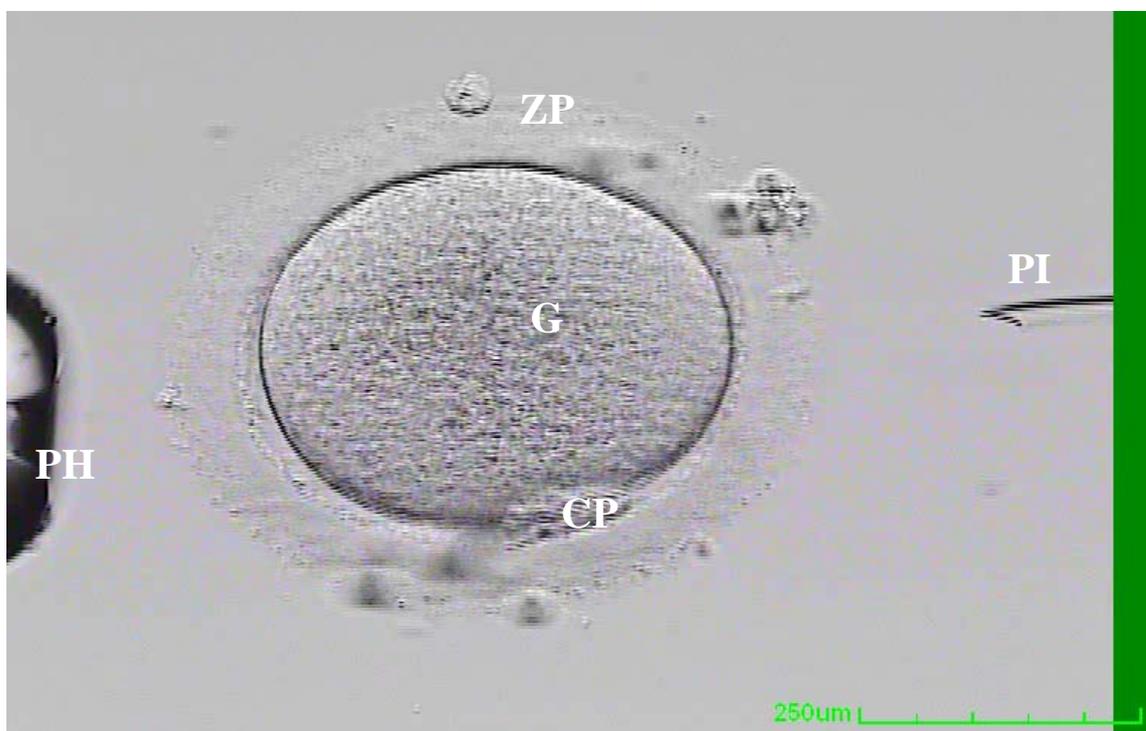


FIGURA 5 - Oócito em metáfase II com citoplasma granuloso.

Objetiva 20X. CP = corpúsculo polar; G = granulações; PH = pipeta de Holding; PI = pipeta de injeção; ZP = zona pelúcida.

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana do HC da UFMG.

### 3.2.6.2 Fragmentação do corpúsculo polar



FIGURA 6 - Oócito em metáfase II apresentando fragmentação do corpúsculo polar.

Objetiva 20 X. CPF = corpúsculo polar fragmentado; PH = pipeta de Holding; PI = pipeta de injeção; ZP = zona pelúcida.

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana do HC da UFMG.

## 3.2.6.3 Vacúolos

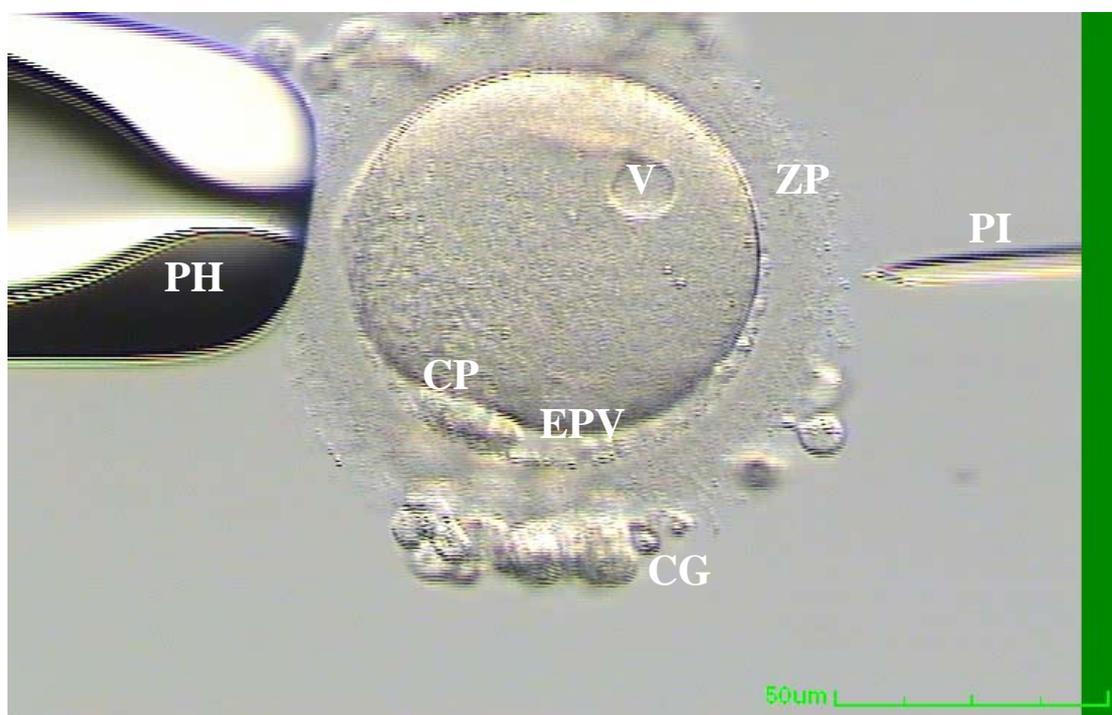


FIGURA 7 - Oócito em metáfase II com presença de vacúolo no ooplasma.

Objetiva 20 X. CG = células da granulosa; CP = corpúsculo polar.; EPV = espaço perivitelino; PH = pipeta de Holding; PI = pipeta de injeção; V = vacúolo; ZP = zona pelúcida.

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana do HC da UFMG.

### 3.2.6.4 Inclusões citoplasmáticas

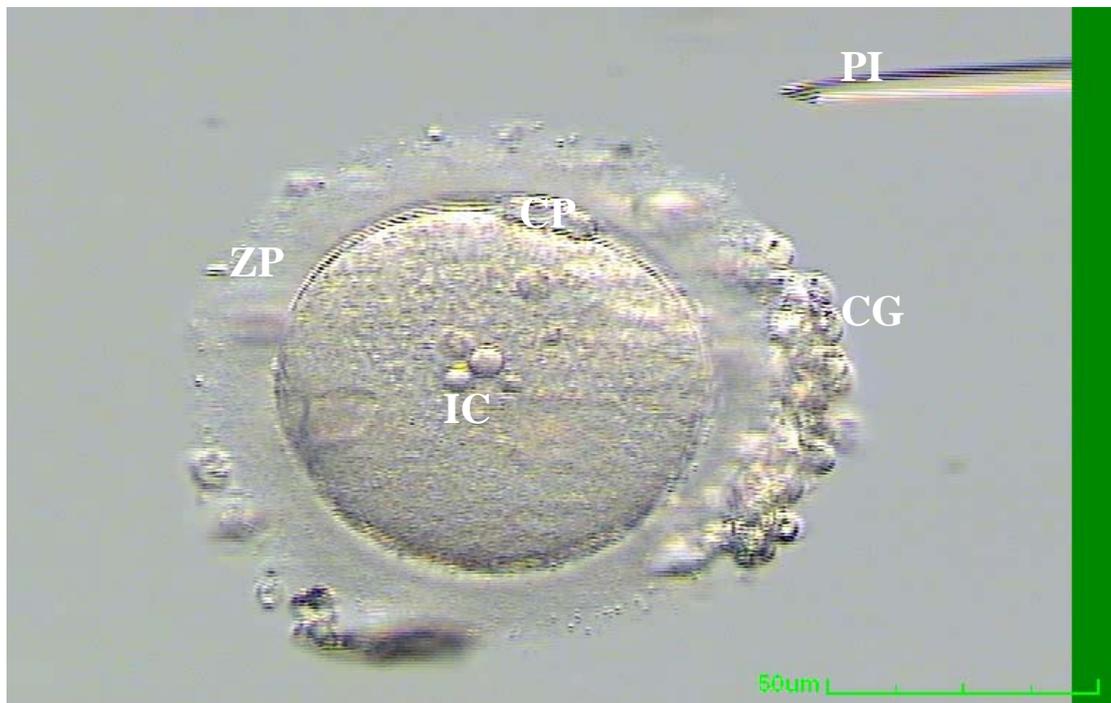


FIGURA 8 - Oócito em metáfase II apresentando inclusões citoplasmáticas.

Objetiva 20 X. CG = células da granulosa; CP = corpúsculo polar; IC = inclusões citoplasmáticas; PI = pipeta de injeção; ZP = zona pelúcida.

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana do HC da UFMG.

Após a microinjeção, os oócitos foram colocados novamente em placa de cultivo contendo microgotas de meio de cultivo (G1® Vitrolife) cobertas com óleo mineral (Ovoil® Vitrolife). As microgotas foram numeradas para posterior identificação dos embriões. Essa placa foi deixada em estufa de CO<sub>2</sub> por 18 a 20 horas, quando então foi visualizada ao microscópio invertido para identificação dos oócitos fertilizados. Os zigotos foram identificados e filmados para posterior classificação e medidas, de acordo com o posicionamento dos pró-núcleos (PN) e nucléolos (FIG. 9).

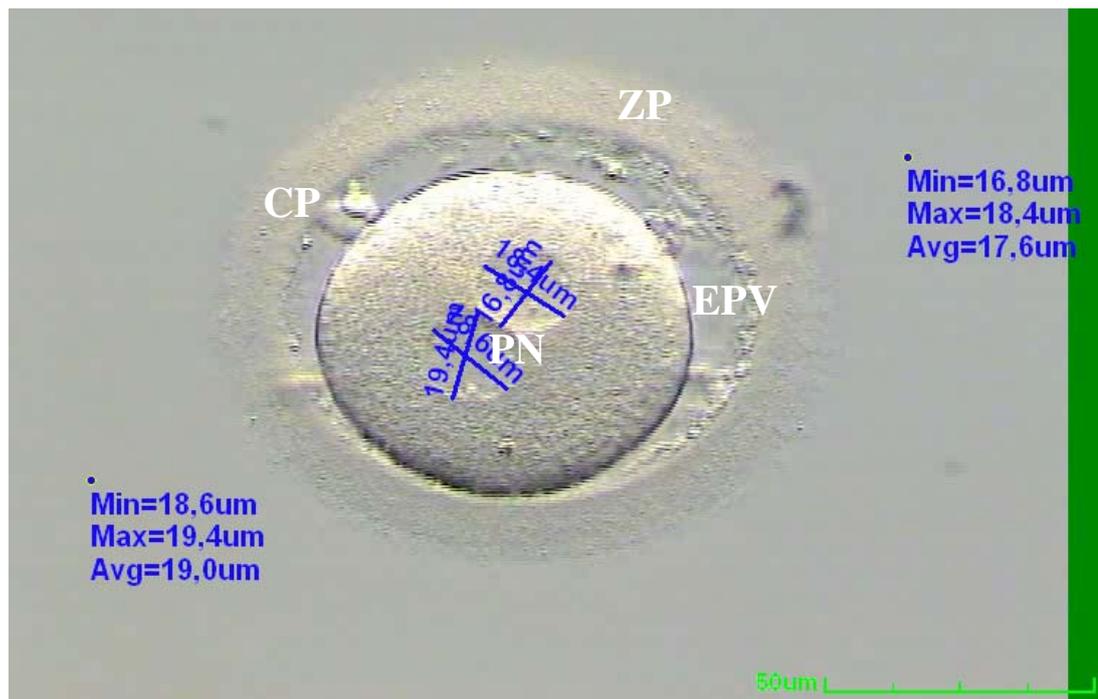


FIGURA 9 - Oócito fertilizado com presença de dois pró-núcleos.

Objetiva 20X. CP = corpúsculo polar; EPV = espaço perivitelino; PN = pró-núcleo; ZP = zona pelúcida.

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana do HC da UFMG.

### 3.2.7 Avaliação morfológica do zigoto

As características morfológicas do zigoto foram avaliadas de acordo com: disposição dos pró-núcleos, disposição dos nucléolos e disposição dos pró-núcleos em relação ao corpúsculo polar.

### 3.2.7.1 Disposição dos pró-núcleos

- Centralizado



FIGURA 10 - Disposição dos pró-núcleos: centralizados.

Objetiva 20 X. CG = células da granulosa; CP = corpúsculo polar; EPV = espaço perivitelino; N = nucléolo; PN = pró-núcleo; ZP = zona pelúcida.

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana do HC da UFMG.

- Não centralizado

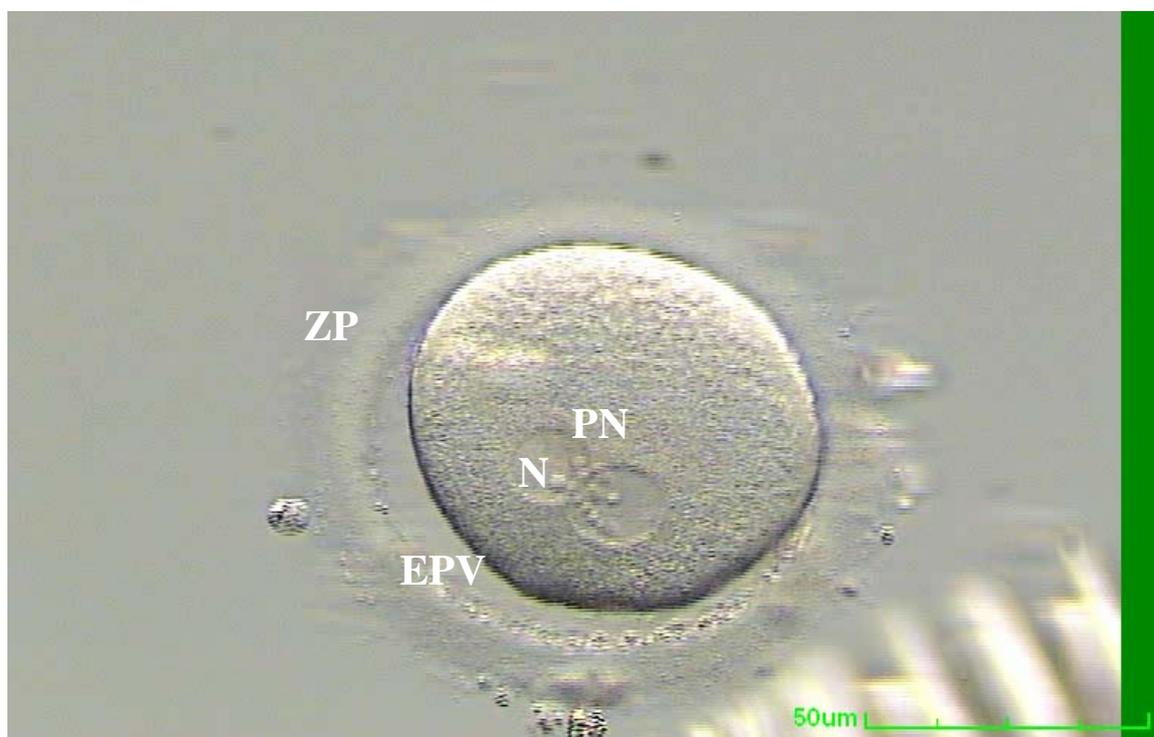


FIGURA 11 - Disposição dos pró-núcleos: não centralizados.

Objetiva 20 X. EPV = espaço perivitelino; N = nucléolo; PN = pró-núcleo; ZP = zona pelúcida.

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana do HC da UFMG.

- Separados

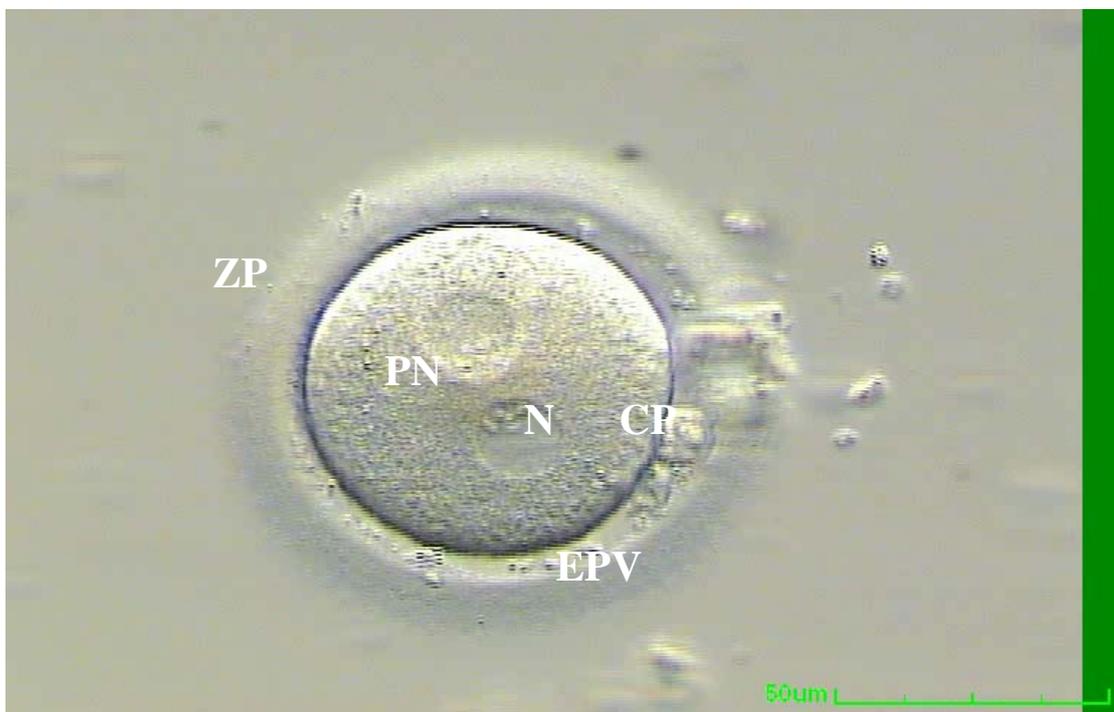


FIGURA 12 - Disposição dos pró-núcleos: separados.

Objetiva 20 X. CP = corpúsculo póla; EPV = espaço perivitelino; N = nucléolo; PN = pró-núcleo; ZP = zona pelúcida.

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana do HC da UFMG.

- Tamanhos diferentes

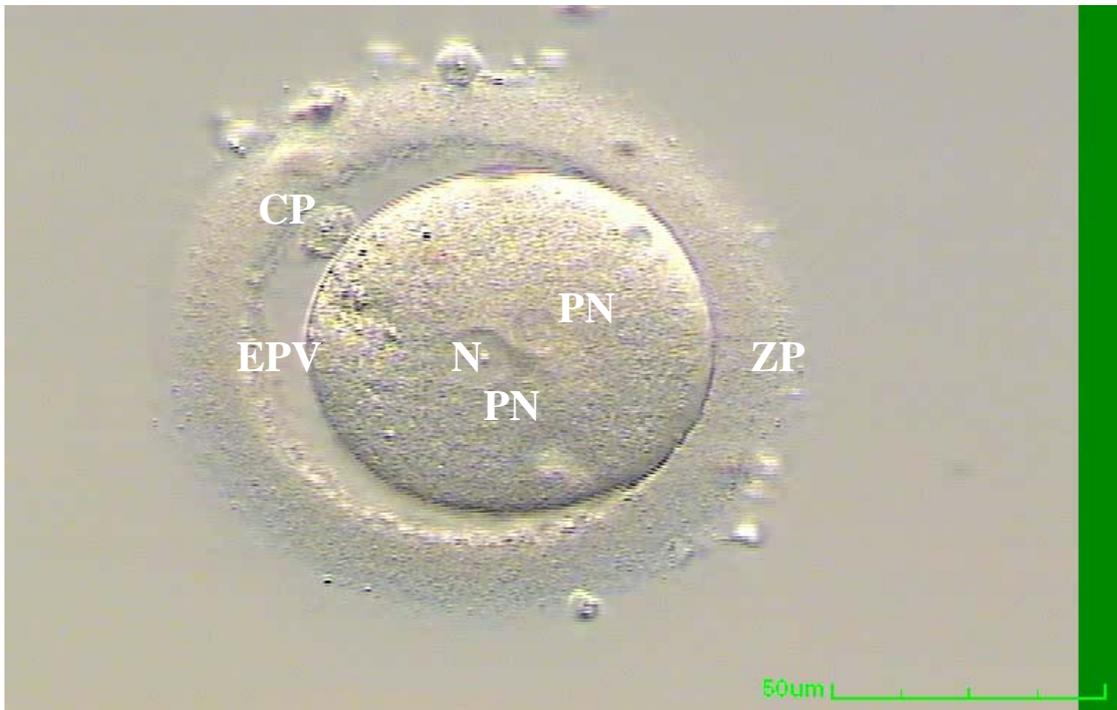


FIGURA 13 - Disposição dos pró-núcleos: tamanhos diferentes.

Objetiva 20 X. CP = corpúsculo polar; EPV = espaço perivitelino; N = nucléolo; PN = pró-núcleo; ZP = zona pelúcida.

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana do HC da UFMG.

- Fragmentado



FIGURA 14 - Disposição dos pró-núcleos: fragmentado.

Objetiva 20 X. CP = corpúsculo polar; N = nucléolo; PN = pró-núcleo; ZP = zona pelúcida.

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana do HC da UFMG.

### 3.2.7.2 Disposição dos nucléolos

- Grandes e alinhados

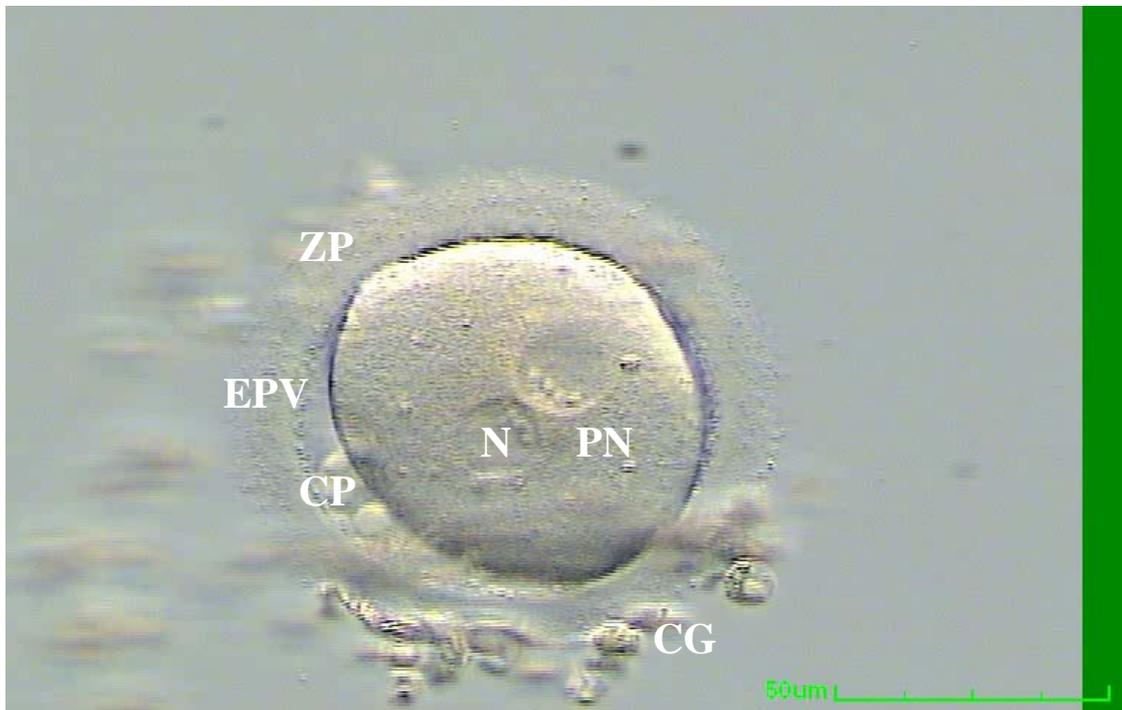


FIGURA 15 - Disposição dos nucléolos: grandes e alinhados.

Objetiva 20 X. CG = células da granulosa; CP = corpúsculo polar; EPV = espaço perivitelino; N = nucléolos; PN = pró-núcleo; ZP = zona pelúcida.

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana do HC da UFMG.

- Grandes e dispersos



FIGURA 16 - Disposição dos nucléolos: grandes e dispersos.

Objetiva 20 X. CG = células da granulosa; CP = corpúsculo polar; EPV = espaço perivitelino; N = nucléolos; PN = pró-núcleo; ZP = zona pelúcida.

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana do HC da UFMG.

- Nucléolos alinhados e outro disperso



FIGURA 17 - Disposição dos nucléolos: alinhados e outro disperso.

Objetiva 20 X. CG = células da granulosa; CP = corpúsculo polar; EPV = espaço perivitelino; N = nucléolos; PN = pró-núcleo; ZP = zona pelúcida.

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana do HC da UFMG.

- Nucléolos pequenos e dispersos



FIGURA 18 - Disposição dos nucléolos: pequenos e dispersos.

Objetiva 20 X. CP = corpúsculo polar; EPV = espaço perivitelino; N = nucléolos; PN = pró-núcleo; ZP = zona pelúcida.

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana do HC da UFMG.

### 3.2.7.3 Disposição dos pró-núcleos em relação ao corpúsculo polar

- Alinhamento longitudinal

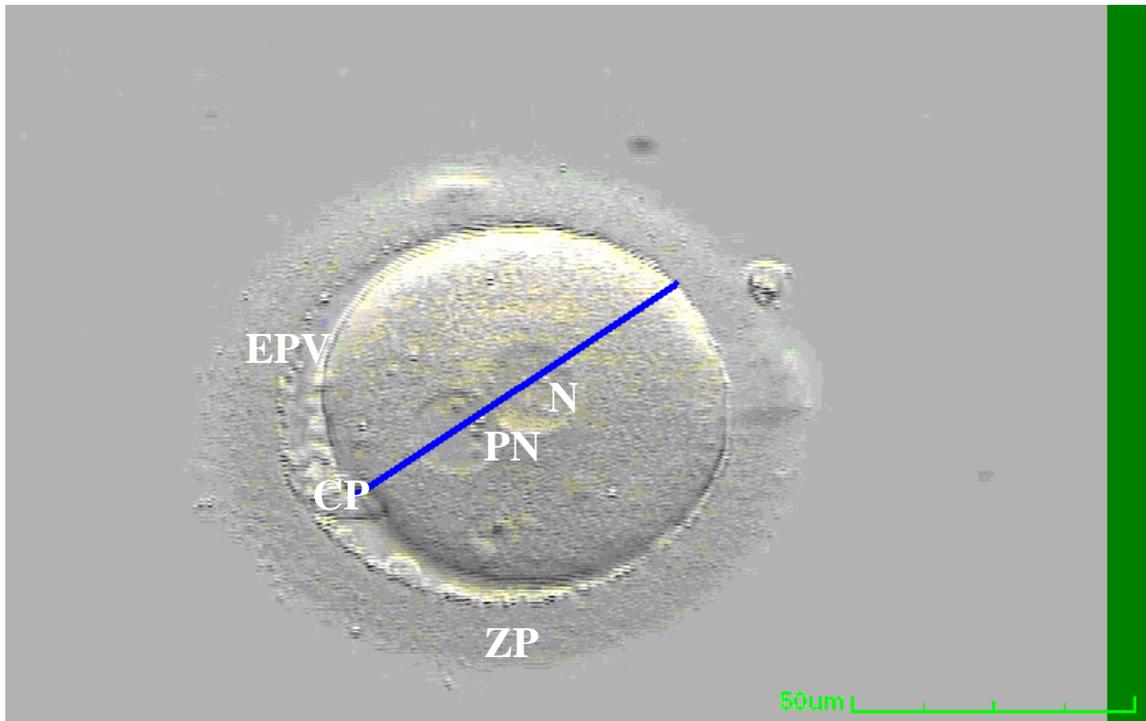


FIGURA 19 - Disposição dos pró-núcleos em relação ao corpúsculo polar, alinhamento longitudinal.

Objetiva 20 X. CP = corpúsculo polar; EPV = espaço perivitelino; N = nucléolos; PN = pró-núcleo; ZP = zona pelúcida.

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana do HC da UFMG.

- Alinhamento perpendicular

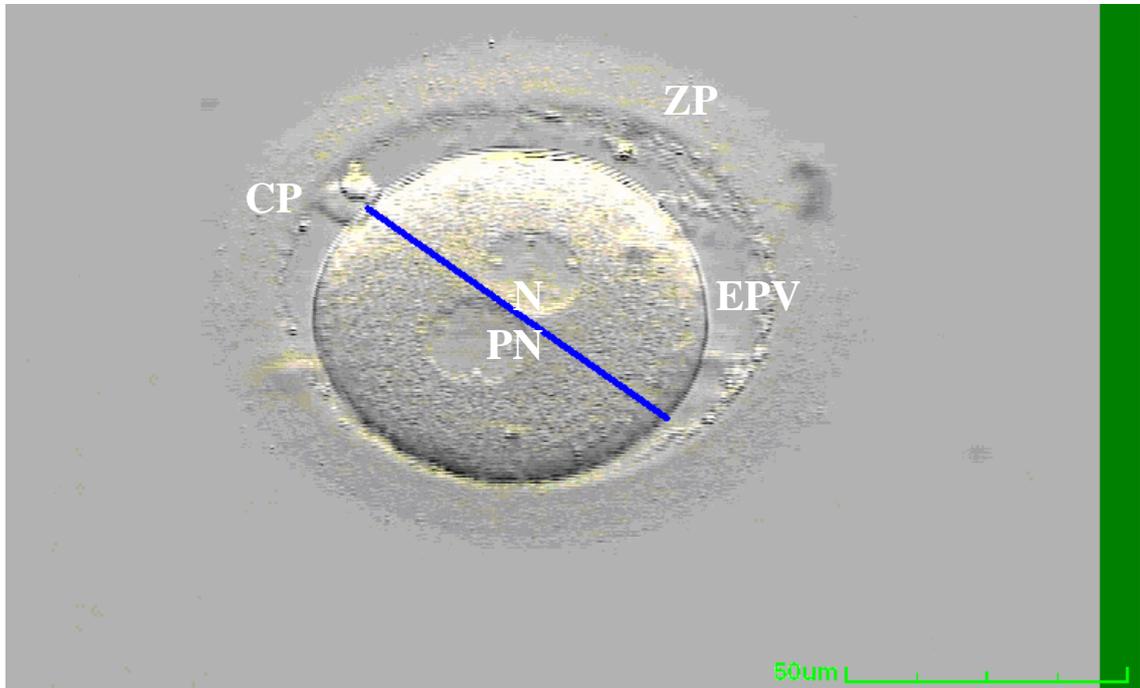


FIGURA 20 - Disposição dos pró-núcleos em relação ao corpúsculo polar, alinhamento perpendicular.

Objetiva 20 X. CP = corpúsculo polar; EPV = espaço perivitelino; N = nucléolos; PN = pró-núcleo; ZP = zona pelúcida.

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana do HC da UFMG.

A classificação do zigoto foi realizada de acordo com o QUADRO 1. Essa classificação está relacionada com a posição dos pró-núcleos, disposição dos nucléolos e posição dos pró-núcleos em relação ao corpúsculo polar.

QUADRO 1  
Classificação do zigoto

Classe	Classificação	Descrição morfológica
01	A1a	Centralizado, grandes alinhados, alinhamento longitudinal
02	A1b	Centralizado, grandes e dispersos, alinhamento perpendicular
03	A2a	Centralizado, grandes e dispersos, alinhamento longitudinal
04	A2b	Centralizado, grandes e dispersos, alinhamento perpendicular
05	A3a	Centralizado, grandes 01 PN alinhado, alinhamento longitudinal
06	A3b	Centralizado, grandes 01 PN alinhado, alinhamento perpendicular
07	A4a	Centralizado, pequenos e dispersos, alinhamento longitudinal
08	A4b	Centralizado, pequenos e dispersos, alinhamento perpendicular
09	B1a	Não centralizado, grandes e alinhados, alinhamento longitudinal
10	B1b	Não centralizado, grandes e alinhado, alinhamento perpendicular
11	B2a	Não centralizado, grandes e dispersos, alinhamento longitudinal
12	B2b	Não centralizado, grandes e dispersos, alinhamento perpendicular
13	B3a	Não centralizado, grandes 01 PN alinhado, alinhamento longitudinal
14	B3b	Não centralizado, grandes 01 PN alinhado, alinhamento perpendicular
15	B4a	Não centralizado, pequenos e dispersos, alinhamento longitudinal
16	B4b	Não centralizado, pequenos e dispersos, alinhamento perpendicular
17	-	<b>Não justapostos</b>
18	-	<b>Tamanhos diferentes</b>
19	-	<b>Fragmentado</b>

A placa de cultivo permaneceu em estufa por mais 24 horas e após esse período ocorreu a singamia e posterior clivagem, possuindo os embriões duas a quatro células. Esses embriões foram filmados para posterior avaliação morfológica e morfométrica (FIG. 21 e 22).

### 3.2.8 Avaliação morfométrica dos embriões no segundo dia de cultivo

Foram realizadas duas medidas aleatórias de dois blastômeros dos embriões e quantificados os números desses blastômeros. Os embriões de segundo dia de cultivo apresentavam dois a quatro blastômeros (FIG. 21 e 22).

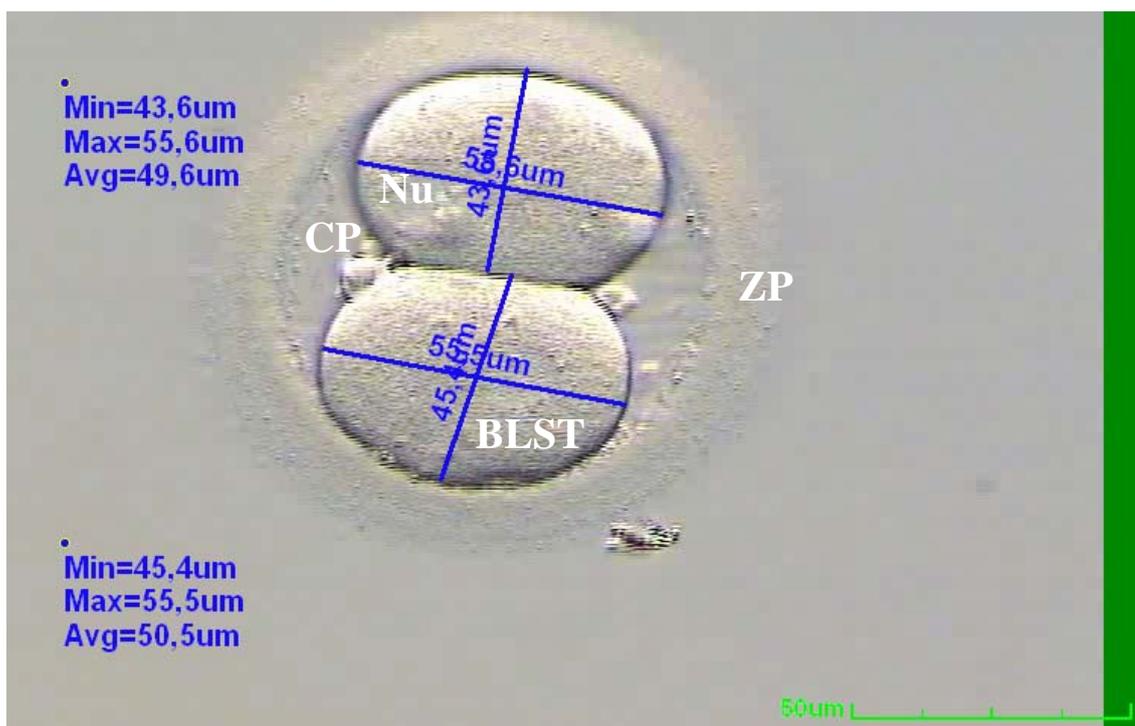


FIGURA 21 - Embrião no segundo dia de cultivo (duas células).

Objetiva 20 X. BLST = blastômeros; CP = corpúsculo polar; Nu = núcleo; ZP = zona pelúcida.

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana do HC da UFMG.

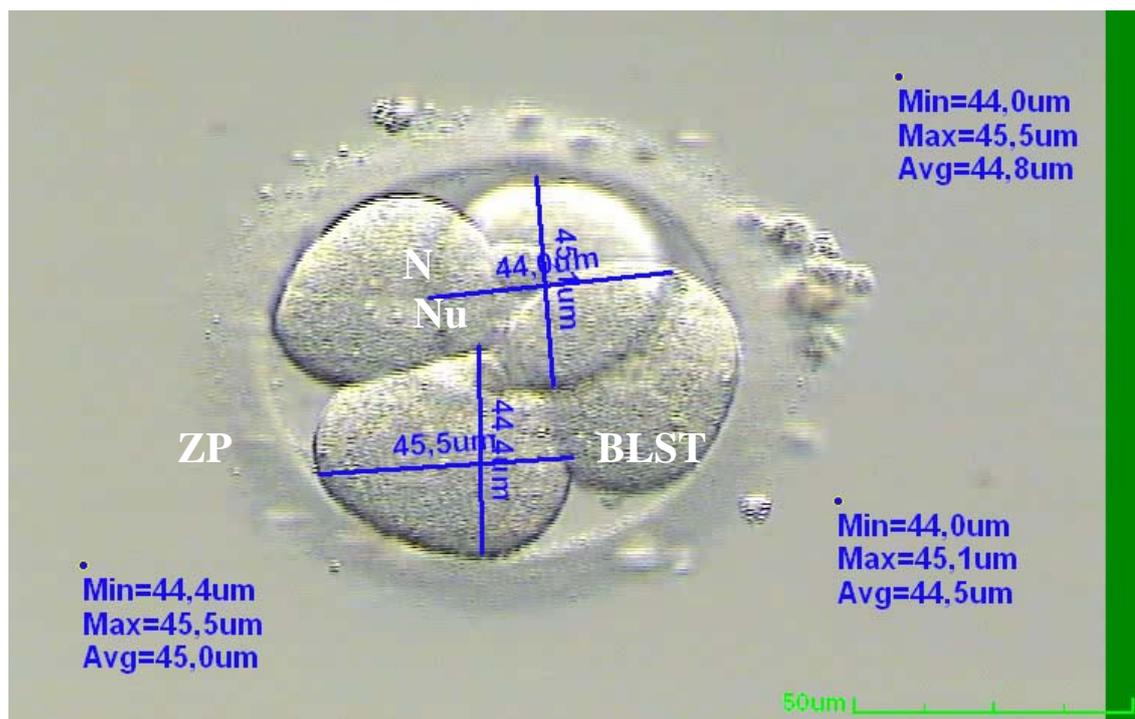


FIGURA 22 - Embrião no segundo dia cultivo (quatro células).

Objetiva 20 X. BLST = blastômeros; N = nucléolo; Nu = núcleo; ZP = zona pelúcida.

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana do HC da UFMG.

### 3.2.9 Avaliação morfológica dos embriões no segundo dia de cultivo

A avaliação morfológica dos embriões observou o grau de fragmentação e simetria dos blastômeros, usando-se os seguintes critérios: blastômeros sem fragmento, com poucos fragmentos, blastômeros desiguais e blastômeros com fragmentação excessiva. Essa classificação foi realizada de acordo com o *software Cronus*<sup>TM3</sup>.

A transferência de embrião ou embriões foi feita no segundo dia de cultivo nas pacientes que obtiveram número reduzido de oócitos e estes produziram até quatro embriões. Os embriões das pacientes que obtiveram mais de quatro para transferência foram colocados em microgotas numeradas contendo meio de cultivo fresco e deixados por mais 24 horas, para serem avaliados novamente. Nesse estágio foram encontrados embriões de seis a oito

células, que foram filmados, avaliados, medidos e classificados de acordo com simetria, medidas dos blastômeros, número de células e grau de fragmentação (FIG. 23).



FIGURA 23 - Embrião no terceiro dia de cultivo (oito células).

Objetiva 20 X. BLST – blastômero; ZP = zona pelúcida.

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana do HC da UFMG.

Foram selecionados até quatro embriões para transferência. Os restantes foram deixados em cultivo para blastocisto (cinco a seis dias). Os que chegaram a este estágio foram congelados pelo método de congelamento lento, usando-se equipamento *Freeze Control CL 5000* programado para diferentes estágios de embrião. Esses congelados foram utilizados em posterior transferência, caso não tenha ocorrido gravidez com aqueles transferidos a fresco (FIG. 24).



FIGURA 24 - Embrião no quinto dia de cultivo.

Objetiva 20 X. B = blastocelo; MCI = massa celular interna; T = trofoectoderma; ZP = zona pelúcida.

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana do HC da UFMG.

### 3.2.10 Avaliação de desfechos

Os desfechos avaliados foram:

- Fertilização definida como dois pró-núcleos visíveis.
- Zigoto com características morfológicas favoráveis, ou seja, classe um a seis, de acordo com a classificação detalhada no QUADRO 1.
- Embrião classificado no segundo dia de cultivo e clivagem adequada, definida como embrião de dois a quatro blastômeros.

Todos os dados referentes aos estágios embrionários de terceiro e quinto dias de cultivo encontram-se no APÊNDICE B e não foram avaliados por não serem objeto de estudo deste trabalho.

A taxa de gravidez foi avaliada a partir de  $\beta$ hCG / presença de saco gestacional e esses resultados também se encontram no APÊNDICE B.

### 3.2.11 Análise estatística

Todos os dados morfométricos dos oócitos foram analisados pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, que confirmou não haver distribuição normal dos dados e, dessa forma, foi utilizado o teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos independentes. A comparação de frequências das alterações morfológicas entre dois grupos foi feita pelo teste exato de Fisher. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de  $p < 0,05$ .

Os dados foram obtidos no programa Excel e depois transferidos para o *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS 10, Inc., Chicago, IL, USA).

## 4 RESULTADOS

Para fins de análise, foram considerados os parâmetros avaliados do oócito em relação à ocorrência de fertilização normal (presença de dois pró-núcleos verificada 18 a 20 horas após a inseminação). Foram coletados 258 oócitos, dos quais 220 estavam em metáfase II e, portanto, adequados para a realização da ICSI. Apresentaram fertilização normal 155 (70,5%) - (TAB. 4).

TABELA 4  
Oócitos fertilizados

<b>Fertilização</b>	<b>Nº. oócitos</b>	<b>Porcentagem</b>
ausente	65	29,5
presente	155	70,5
<b>Total</b>	<b>220</b>	<b>100,0</b>

### 4.1 Parâmetros morfométricos e morfológicos dos oócitos em relação à fertilização

Dos 220 oócitos inseminados, 155 apresentaram evidências de fecundação.

#### 4.1.1 Parâmetros morfométricos

Entre as medidas realizadas no oócito (medida do diâmetro do oócito, do espaço perivitelino, da zona pelúcida e do primeiro corpúsculo polar), nenhuma se correlacionou significativamente com a ocorrência de fertilização (GRÁF. 1 a 4).

Não houve diferença significativa entre a medida dos óocitos nos quais ocorreu fertilização (mediana 75,2  $\mu\text{m}$ , intervalo interquartil 73,6-77,0  $\mu\text{m}$ ) e a medida do oócito (mediana 75,9  $\mu\text{m}$ , intervalo interquartil 74,2-77,4  $\mu\text{m}$ ) quando não houve fertilização (GRÁF. 1).

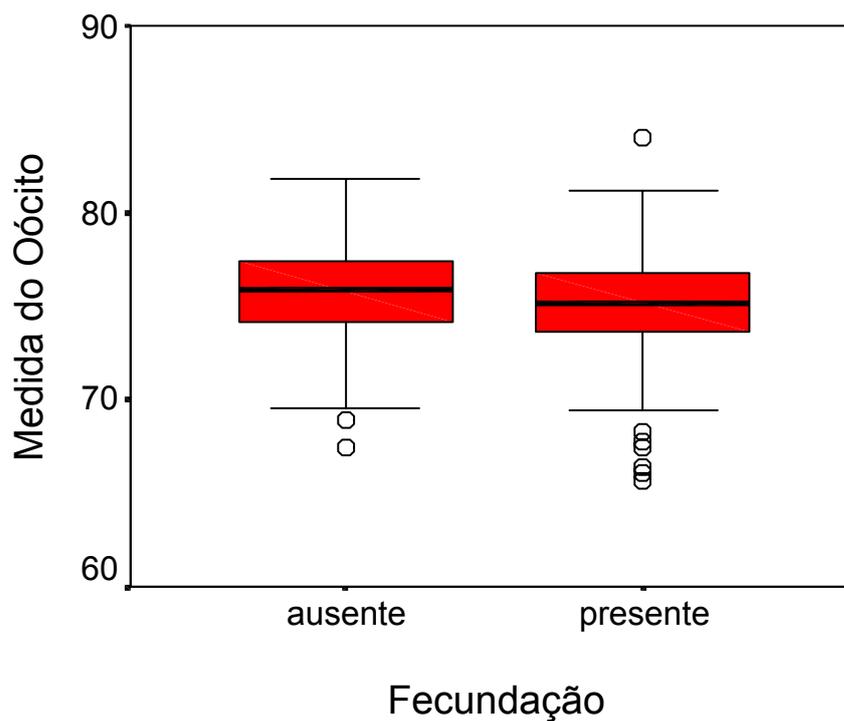


GRÁFICO 1 - Relação medida do oócito e fertilização (p=0,218).

As medidas do espaço perivitelino dos oócitos que resultaram em fecundação (mediana 5,7  $\mu\text{m}$ , intervalo interquartil 4,5-7,2  $\mu\text{m}$ ) e daqueles que não resultaram em fecundação (mediana 5,3  $\mu\text{m}$ , intervalo interquartil 4,3-6,5  $\mu\text{m}$ ) não apresentaram diferença significativa (GRÁF. 2).

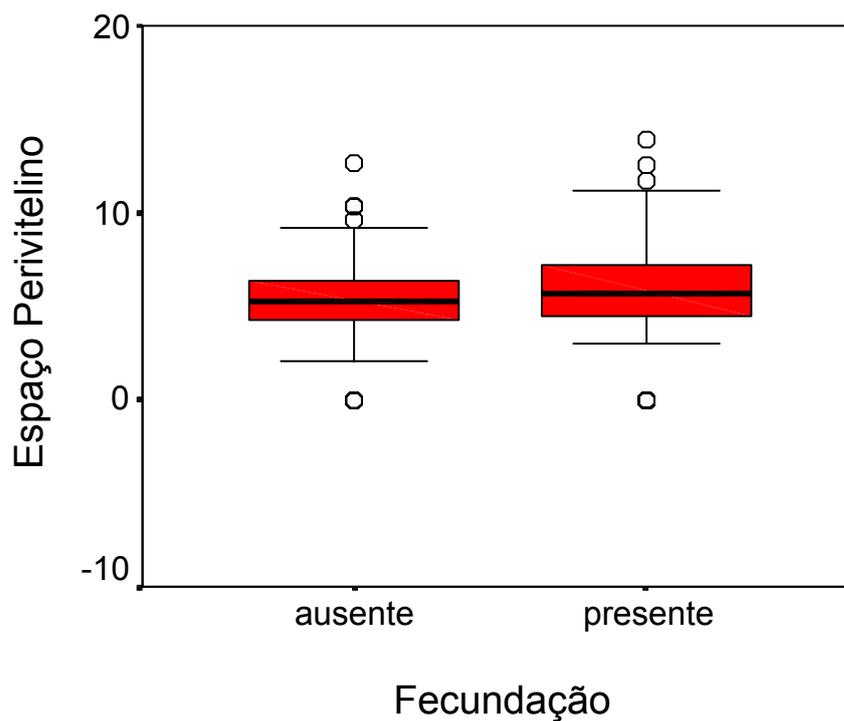


GRÁFICO 2 - Relação entre medida do espaço perivitelino e fertilização  
( $p=0,319$ ).

As medidas da zona pelúcida quando houve fecundação (mediana 12,1  $\mu\text{m}$ , intervalo interquartil 11-13,3  $\mu\text{m}$ ) e quando não houve fecundação (mediana 11,8  $\mu\text{m}$ , intervalo interquartil 10,8-13,1  $\mu\text{m}$ ) não apresentaram diferença significativa (GRÁF. 3).

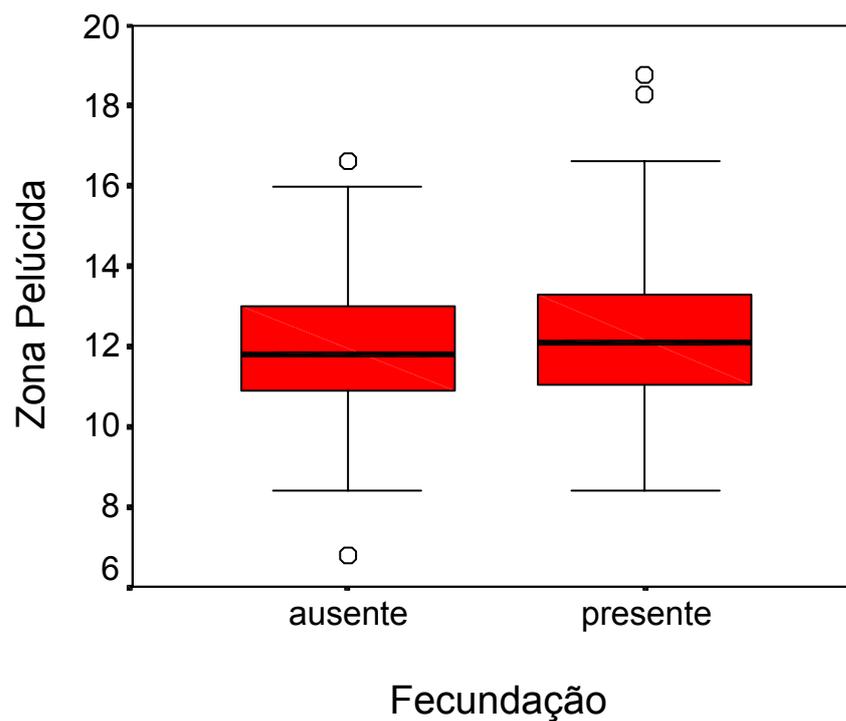


GRÁFICO 3 - Relação entre medida da zona pelúcida e fertilização ( $p=0,395$ ).

As medidas do corpúsculo polar quando houve fecundação (mediana 13,3  $\mu\text{m}$ , intervalo interquartil 12,3-14,3  $\mu\text{m}$ ) e quando não foi visualizada a fecundação (mediana 13,3  $\mu\text{m}$ , intervalo interquartil 12,2-14,0  $\mu\text{m}$ ) não apresentaram diferença significativa (GRÁF. 4).

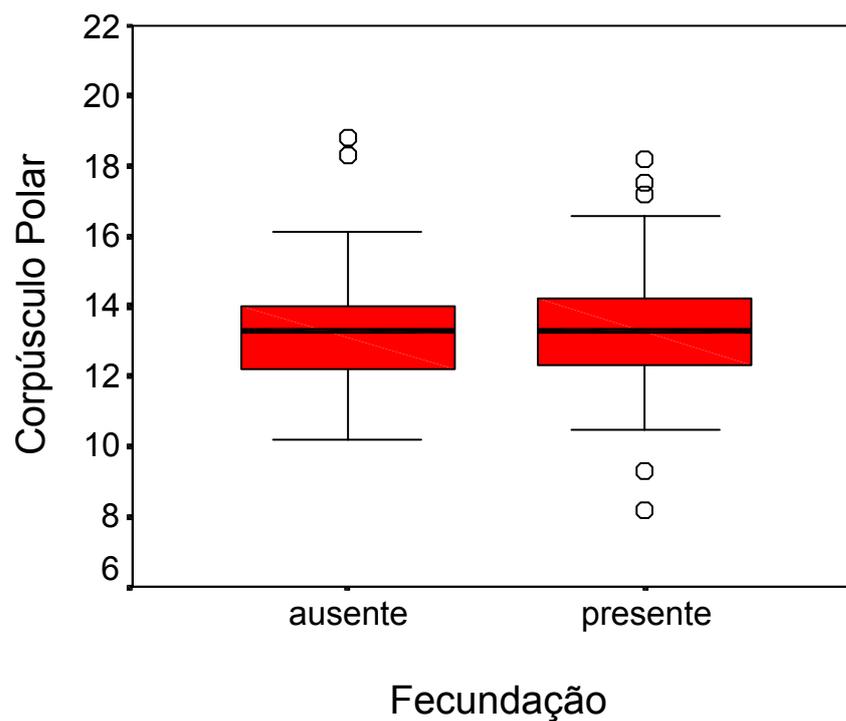


GRÁFICO 4 - Relação entre medida do corpúsculo polar e fertilização ( $p=0,885$ ).

#### 4.1.2 Parâmetros morfológicos

Outras variáveis analisadas foram a presença/ausência de fragmentação do corpúsculo polar, granulações e inclusões citoplasmáticas, além de vacúolos, em relação à ocorrência de fertilização. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre a presença ou ausência das variáveis analisadas e a ocorrência de fertilização (TAB. 5).

TABELA 5

Parâmetros morfológicos do oócito em relação à ocorrência de fertilização

	<b>Fertilização Presente (n =155)</b>	<b>Fertilização Ausente (n =65)</b>	<b>Teste exato de Fisher - p</b>
Fragmentação do corpúsculo polar	71 (45,8%)	27 (41,5%)	0,656
Granulação	126 (81,3%)	54 (83,1%)	0,849
Inclusões citoplasmáticas	33 (21,3%)	20 (30,8%)	0,167
Vacúolos	16 (10,3%)	9 (13,8%)	0,488

#### 4.2 Parâmetros morfométricos e morfológicos dos oócitos em relação à classificação do zigoto

Dos 155 oócitos fertilizados, 144 geraram zigotos que puderam ser classificados de acordo com o QUADRO 1.

Vale ressaltar que o número de zigotos avaliados (n=144) foi inferior ao número de embriões produzidos, (n=151), devido à não visualização dos pró-núcleos 18 a 20 horas após a inseminação.

#### 4.2.1 Parâmetros morfométricos

A medida do oócito demonstrou importância significativa quando correlacionada com a classificação do zigoto. Segundo essa classificação (QUADRO 1), aqueles mais bem classificados (classe de um a seis) corresponderam a oócitos maiores (mediana 75,6  $\mu\text{m}$ , intervalo interquartil 74,1-77,2  $\mu\text{m}$ ), comparados aos oócitos que deram origem a zigotos de classe sete a 19 (mediana 74,0  $\mu\text{m}$ , intervalo interquartil 71,5-76,2  $\mu\text{m}$ ;  $p < 0,01$  (GRÁF. 5). Houve discreta correlação negativa entre a medida do oócito e a classificação do zigoto (coeficiente de Spearman = -0,257,  $p = 0,002$  (GRÁF. 6).

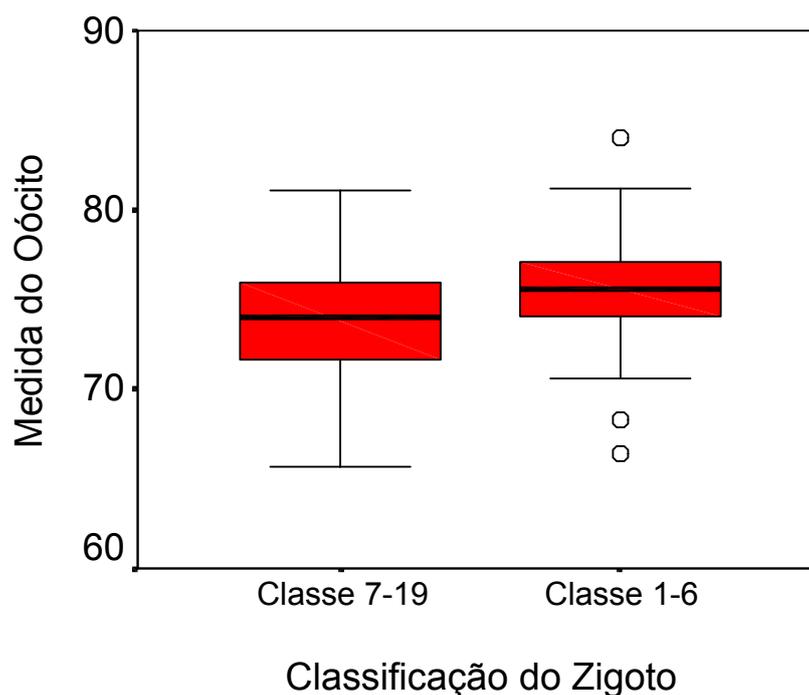


GRÁFICO 5 - Relação entre a medida do oócito e classificação do zigoto ( $p < 0,01$ , Teste de Mann Whitney).

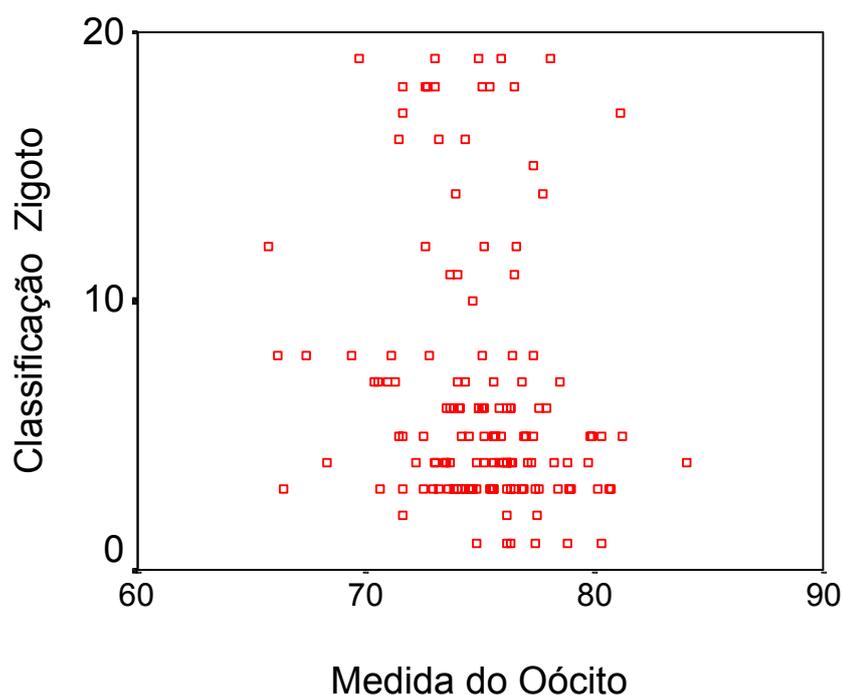


GRÁFICO 6 - Relação entre a medida do oócito e classificação do zigoto.

A medida do espaço perivitelino demonstrou importância significativa quando correlacionada com a classificação do zigoto.

Na especificação dos zigotos (QUADRO 1), aqueles mais bem classificados (classe de um a seis) corresponderam a espaços perivitelinos menores (mediana 5,3  $\mu\text{m}$ , intervalo interquartil 4,4-6,3  $\mu\text{m}$ ) comparados aos espaços perivitelinos dos oócitos que deram origem a zigotos de classe sete a 19 (mediana 7,1  $\mu\text{m}$ , intervalo interquartil 4,5-8,3  $\mu\text{m}$ ;  $p < 0,01$  (GRÁF. 7).

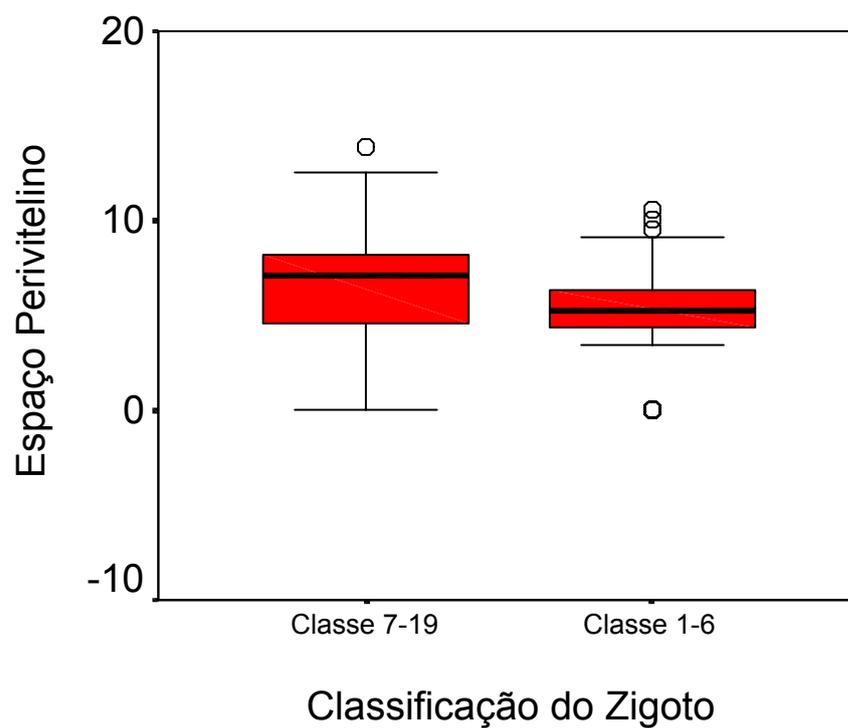


GRÁFICO 7 - Relação entre medida do espaço perivitelino e classificação do zigoto ( $p < 0,01$ , Teste Mann Whitney).

As medidas da zona pelúcida e do corpúsculo polar quando correlacionadas com a classificação do zigoto não foram significativas (GRÁF. 8 e 9). As medidas da zona pelúcida quando o zigoto obteve classe de um a seis (mediana 12,3  $\mu\text{m}$ , intervalo interquartil 11-13,4 $\mu\text{m}$ ) e quando a classe foi superior a seis (mediana 11,8  $\mu\text{m}$ , intervalo interquartil 10,6-12,9  $\mu\text{m}$ ) não foram diferentes (GRÁF. 8).

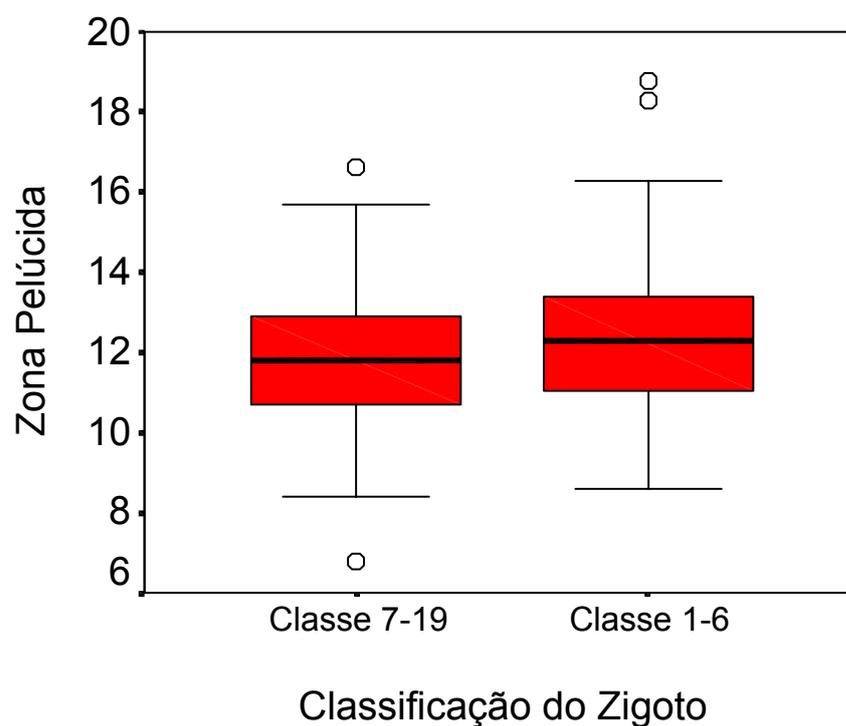


GRÁFICO 8 - Relação entre a medida da zona pelúcida e a classificação do zigoto,  $p=0,087$

As medidas do corpúsculo polar quando o zigoto obteve classe de um a seis (mediana 13,6  $\mu\text{m}$ , intervalo interquartil 12,5-14,7  $\mu\text{m}$ ) e quando obteve classe superior a seis (mediana 13,3  $\mu\text{m}$ , intervalo interquartil 11,7-14,2  $\mu\text{m}$ ) não diferiram significativamente (GRÁF. 9).

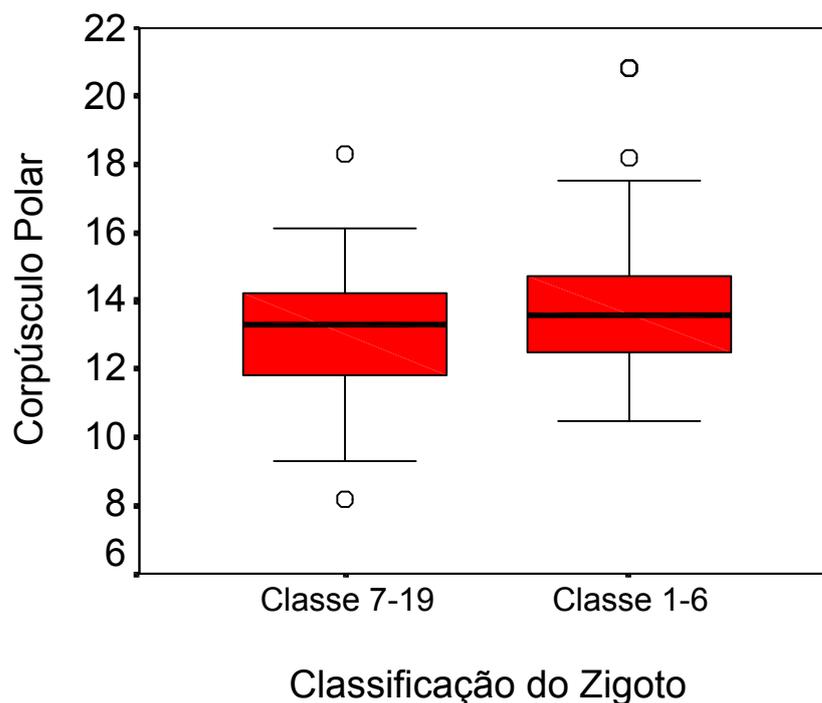


GRÁFICO 9 - Relação entre a medida do corpúsculo polar e classificação do zigoto ( $p=0,76$ ).

#### 4.2.2 Parâmetros morfológicos

Os dados morfológicos do oócito, tais como fragmentação do corpúsculo polar, granulações, inclusões citoplasmáticas e vacúolos, não se correlacionaram com a qualidade do zigoto (TAB. 6).

TABELA 6  
Parâmetros morfológicos do oócito em relação à classificação do zigoto

	<b>Zigotos classe 1 a 6 (n = 99)</b>	<b>Zigotos classe 7 a 19 (n = 45)</b>	<b>Teste Exato de Fisher - p</b>
Fragmentação do corpúsculo polar	54 (54,5%)	19 (42,2%)	0,234
Granulação	87 (87,9%)	34 (75,6%)	0,085
Inclusões citoplasmáticas	22 (22,2%)	12 (26,7)	0,672
Vacúolos	14 (14,1%)	3 (6,7%)	0,269

#### 4.3 Parâmetros morfométricos e morfológicos em relação à clivagem de embrião do segundo dia após a ICSI

Dos 220 oócitos inseminados pela técnica de ICSI, 155 fertilizaram e 151 geraram embriões.

##### 4.3.1 Parâmetros morfométricos

As medidas realizadas no oócito (medida do diâmetro, espaço perivitelino, zona pelúcida e do primeiro corpúsculo polar) foram analisadas em relação à presença de clivagem adequada (dois a quatro blastômeros) e inadequada no segundo dia após a inseminação. Não foi observada correlação

entre essas medidas e a presença de clivagem adequada e inadequada (GRAF. 10 a 13).

Não se verificou diferença significativa entre a medida do oócito quando a clivagem do embrião foi adequada (dois a quatro blastômeros) - (mediana 75,2  $\mu\text{m}$  intervalo interquartil 73,2-76,6 $\mu\text{m}$ ) e quando foi inadequada (mediana 75,9  $\mu\text{m}$  intervalo interquartil 74,1-77,8  $\mu\text{m}$ ) - (GRÁF. 10).

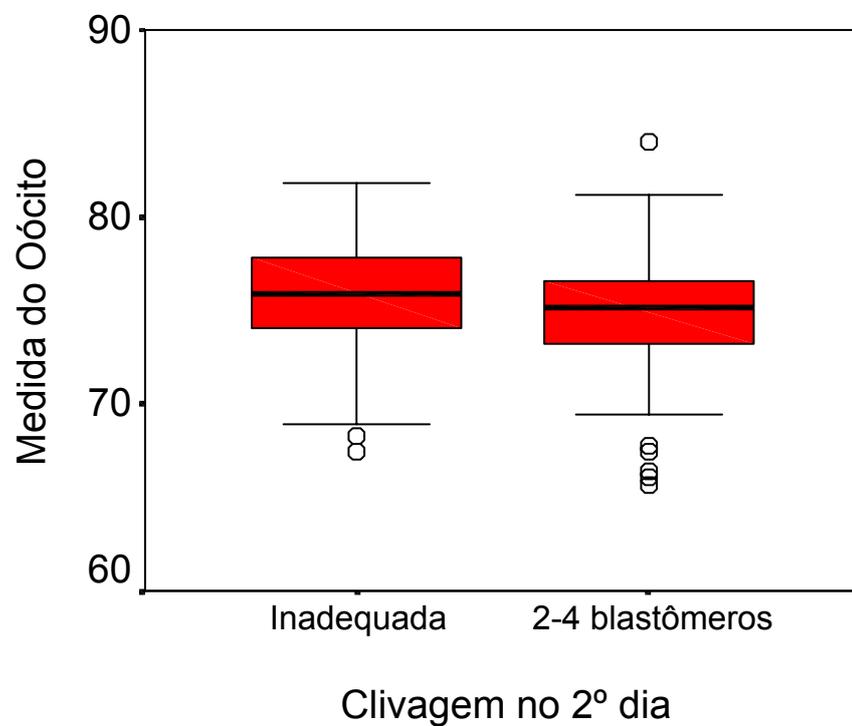


GRÁFICO 10 - Medida do oócito e clivagem no segundo dia após a inseminação ( $p=0,080$ ).

As medidas do espaço perivitelino quando a clivagem do embrião foi adequada (dois a quatro blastômeros) - (mediana 5,9  $\mu\text{m}$  intervalo interquartil 4,6-7,3  $\mu\text{m}$ ) e quando foi inadequada (mediana 5,3  $\mu\text{m}$  intervalo interquartil 4,3-6,4  $\mu\text{m}$ ) não se diferiram significativamente (GRÁF. 11).

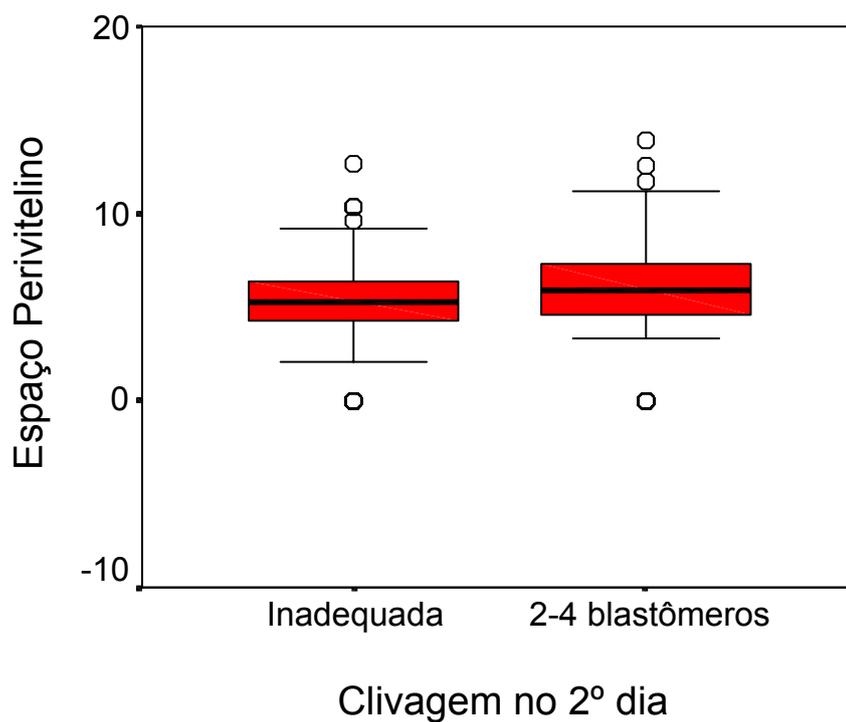


GRÁFICO 11 - Medida do espaço perivitelino e clivagem no segundo dia após a inseminação ( $p=0,108$ ).

Não houve diferença significativa entre a medida da zona pelúcida quando a clivagem do embrião foi adequada (dois a quatro blastômeros) (mediana 12,2  $\mu\text{m}$  intervalo interquartil 10,9-13,3  $\mu\text{m}$ ) e quando foi inadequada (mediana 11,8  $\mu\text{m}$  intervalo interquartil 10,9-13,0  $\mu\text{m}$ ) - (GRÁF. 12).

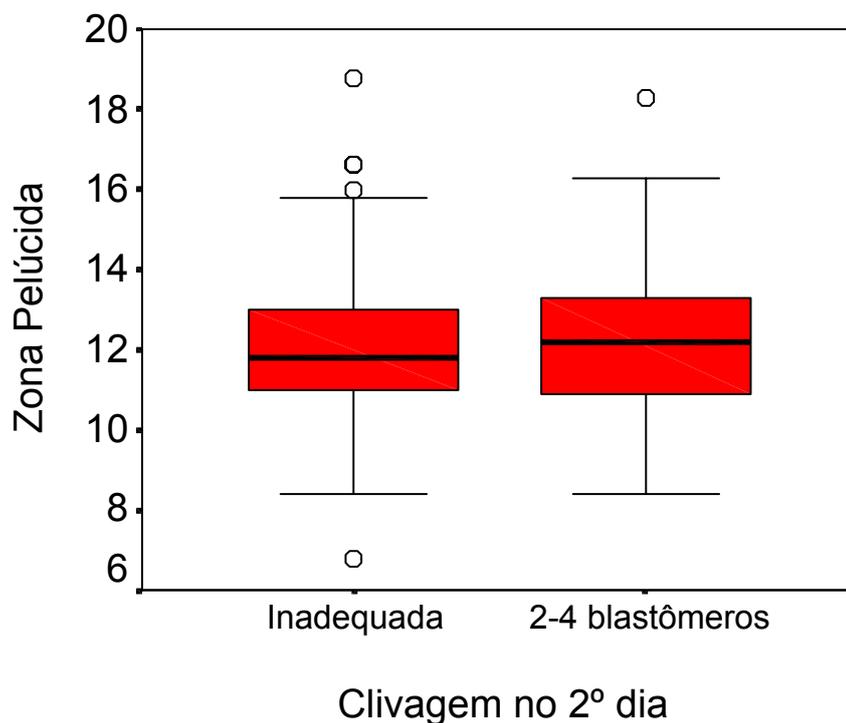


GRÁFICO 12 - Medida da zona pelúcida e clivagem no segundo dia após a inseminação ( $p=0,504$ ).

A medida do corpúsculo polar quando a clivagem do embrião foi adequada - dois a quatro blastômeros (mediana 13,4  $\mu\text{m}$  intervalo interquartil 12,3-14,2  $\mu\text{m}$ ) não diferiu significativamente de quando a clivagem foi inadequada (mediana 13,2  $\mu\text{m}$  intervalo interquartil 12,0-14,0  $\mu\text{m}$ ) - (GRÁF. 13).

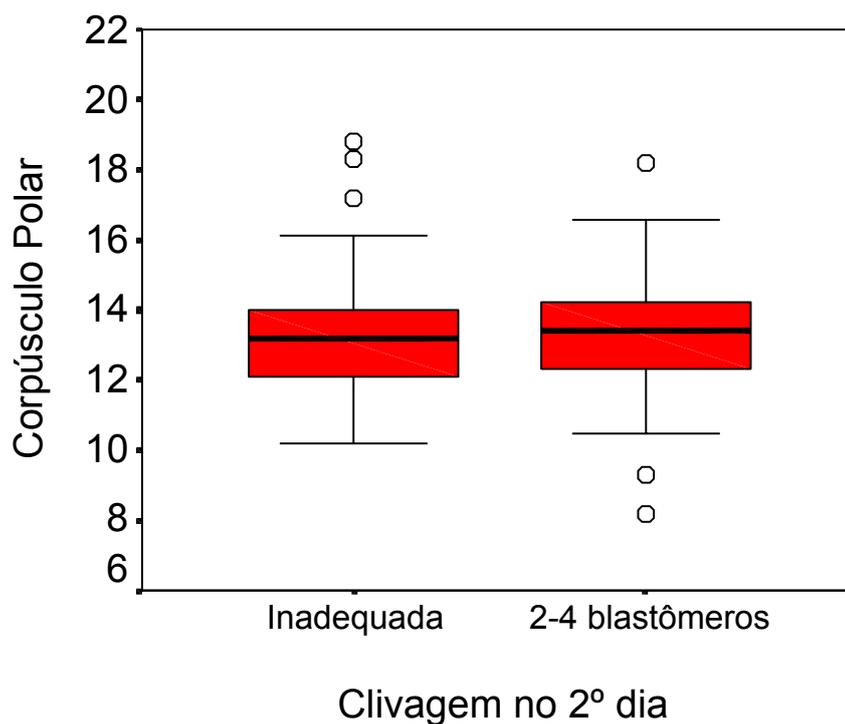


GRÁFICO 13 - Medida do corpúsculo polar e clivagem no segundo dia após a inseminação ( $p=0,559$ ).

#### 4.3.2 Parâmetros morfológicos

A presença/ausência de fragmentação do corpúsculo polar, granulações e inclusões citoplasmáticas, além de vacúolos, foi analisada em relação à ocorrência de clivagem embrionária adequada ou inadequada no segundo dia após a inseminação. Não se observou relação entre a presença ou ausência de qualquer dessas alterações e a ocorrência de clivagem (TAB. 7).

TABELA 7

Parâmetros morfológicos do oócito em relação à ocorrência de clivagem no segundo dia após a inseminação

	<b>Clivagem adequada (2 a 4 células) (n = 131)</b>	<b>Clivagem ausente ou inadequada (n = 78)</b>	<b>Teste Exato de Fisher p</b>
Fragmentação do corpúsculo polar	60 (45,8%)	31 (39,7%)	0,478
Granulação	105 (80,2%)	67 (85,9%)	0,387
Inclusões citoplasmáticas	27 (20,6%)	19 (24,4%)	0,646
Vacúolos	10 (7,6%)	13 (16,7%)	0,066

A relação entre a medida do oócito e a classificação do zigoto permaneceu estatisticamente significativa após análise multivariada, com ajuste para os demais parâmetros morfológicos e morfométricos do zigoto, além da idade da paciente e características do sêmen.

TABELA 8

Análise multivariada dos fatores potencialmente associados à presença de zigotos bem classificados (classe de 1 a 6).

<b>Variáveis</b>	<b>Razão de chances corrigida</b>	<b>IC 95%</b>	<b>p</b>
Medida do oócito	1,278	1,108-1,474	0,001
Motilidade espermática ( <i>swim-up</i> ) > 50% A e B	3,011	1,313-6,904	0,009
Medida do espaço perivitelino	-	-	0,176
Medida da zona pelúcida	-	-	0,057
Medida do corpúsculo polar	-	-	0,117
Fragmentação do corpúsculo polar	-	-	0,069
Granulosidade do oócito	-	-	0,158
Inclusões citoplasmáticas	-	-	0,392
Vacúolos	-	-	0,417
Idade da paciente	-	-	0,143

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Morfologia e morfometria de oócitos em relação à fertilização

Durante a fase folicular do ciclo menstrual natural, ocorre o desenvolvimento de um único folículo. O oócito que se desenvolve dentro desse folículo está envolto por células da granulosa, formando um conjunto denominado *complexo cumulus oophorus*. Durante a primeira fase do ciclo menstrual esse *complexo* cresce e sofre alterações, das quais se destacam a multiplicação das células da granulosa e o crescimento do citoplasma do oócito devido à multiplicação das organelas, principalmente das mitocôndrias e alterações nucleares<sup>31</sup>.

O ápice desse crescimento culmina com a maturação do CCO, destacando-se sua dispersão devido à quebra dos desmossomos, o grande crescimento do citoplasma e a maturação nuclear atingindo a metáfase II da meiose. Essas alterações são produzidas por gonadotrofinas e pela produção local de hormônios que modulam todas essas modificações<sup>32</sup>.

Em ciclos hiperestimulados de FIV, o recrutamento folicular se faz de maneira anacrônica, ou seja, folículos são recrutados com diversos tamanhos antrais e logo em fase distintas. Como consequência, têm-se os folículos atingindo a proximidade da maturidade, enquanto outros se encontram pequenos e contendo oócito imaturos.

A administração do hCG, que mimetiza o pico de LH, leva à maturação oocitária. Portanto, é esperado que, em ciclo de FIV, óvulos sejam estimulados a maturar antes de atingirem o crescimento total.

Essa condição foi vista na presente investigação, pois em 258 oócitos coletados 7,3% estavam imaturos em estágio de prófase I (vesícula germinativa) e 6,5% estavam em estágio de metáfase I, o que está de acordo com o resultado encontrado na literatura<sup>31</sup>.

Analisando os resultados das medidas dos oócitos em relação à fertilização, verificou-se que o tamanho desses oócitos não foi determinante para indicar se ocorreu ou não fertilização após ICSI.

Não foi encontrado trabalho cujo tamanho do oócito tenha sido avaliado e correlacionado com a sua capacidade de fecundar após o processo de ICSI. Este achado merece algumas considerações:

Primeiro, os oócitos, antes de serem fertilizados pelo processo de ICSI, são incubados em meios de cultivo e manipulados para retirada das células da granulosa. Esses procedimentos podem acelerar a maturação do oócito *in vitro*<sup>13</sup>. Segundo, a simples microinjeção da pipeta sem a presença de espermatozóides dispara o processo de fertilização, induzindo a partenogênese<sup>13,31</sup>. Isto posto, pode-se supor ou chamar a atenção para o fato de que o tamanho do oócito não é determinante para alcançar-se a fertilização.

Quanto às medidas realizadas na zona pelúcida, nos corpúsculos polares e nos espaços perivitelinos, elas também não determinaram a presença de fertilização. Não se teve acesso a estudo que correlacionasse essas medidas com fertilização.

Encontrou-se um trabalho no qual a variabilidade das medidas da zona pelúcida foi significativa para determinar a taxa de implantação. Essa pesquisa avaliou algumas características morfológicas em relação à fertilização<sup>17</sup>.

Como se sabe, a primeira fase da divisão da meiose inicia-se ainda no ovário e qualquer anormalidade aí produzida pode refletir-se em um oócito de má qualidade.

As principais organelas presentes no citoplasma do oócito são mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de Golgi. A maturação nuclear está associada à maturação citoplasmática e é caracterizada pelo aumento do número de organelas distribuída nesse citoplasma. Um pequeno período é necessário após a extrusão do primeiro corpúsculo polar para que o oócito consiga alcançar a maturação citoplasmática<sup>13</sup>.

Portanto, a administração do hCG pode acelerar a maturação oocitária e, conseqüentemente, causar desequilíbrio na distribuição das organelas dentro do citoplasma do oócito, acarretando aumento da granulosidade desse citoplasma<sup>31</sup>. As taxas de fertilização são similares em oócitos com citoplasma granuloso ou não; porém, o potencial de desenvolvimento embrionário é reduzido<sup>13</sup>.

O corpúsculo polar possui um núcleo com 23 cromossomos e 46 cromátides, similar ao encontrado no oócito. Um corpúsculo polar com a

morfologia alterada pode refletir-se na qualidade do oócito devido à interdependência da formação óvulo-corpúsculo polar. Então, ao avaliar-se o corpúsculo polar, está-se indiretamente avaliando a qualidade do oócito.

De acordo com a literatura, a presença de vacúolos e inclusões citoplasmáticas pode indicar prognóstico ruim para o embrião em desenvolvimento. Os vacúolos são formados pela dilatação dos elementos vesiculares do retículo endoplasmático ou da constante instabilidade do citoplasma. Geralmente, vacúolos pequenos não interferem no desenvolvimento embrionário. Outras inclusões citoplasmáticas abrangendo corpos retráteis (estruturas pequenas compostas de material lipídeo e grânulos densos), áreas de aglomerado de organelas e pequenas necroses do citoplasma são observadas no citoplasma do oócito<sup>13</sup>.

A presença ou ausência dessas características (vacúolos, inclusões citoplasmáticas e corpúsculo polar com morfologia alterada) não foram determinantes para a ocorrência ou não da fertilização. Estes achados estão de acordo com alguns estudos<sup>8,11,12</sup>, mas existem outros que mostram que a morfologia oocitária é determinante para a ocorrência de FIV<sup>9,10</sup>.

É necessário lembrar que partenogênese pela manipulação e estresse do oócito e maturação induzida pelas condições de cultivo seguem rotinas diferentes em diferentes laboratórios e podem ser determinantes para a produção da fertilização, o que pode explicar os diferentes achados entre este trabalho e os de outros autores.

Mais uma vez a literatura é controversa e necessita de mais investigações. Já existem alguns métodos mais modernos para a avaliação do fuso por meio de microscópio polarizado. Quando o fuso é visualizado através da birrefringência, pode-se avaliar em que estado está a organização desse fuso e, portanto, pode-se avaliar a qualidade do oócito a ser usado em procedimentos de ICSI<sup>4</sup>.

A fusão dos gametas envolve uma série de eventos que ativam o oócito, completando a segunda divisão meiótica. Com o aparecimento dos pró-núcleos há reorganização e emparelhamento dos cromossomos materno e paterno, formando-se o zigoto.

## 5.2 Morfologia e morfometria do oócito em relação à classificação do zigoto

Quando o zigoto foi avaliado e comparado com o tamanho dos oócitos, pôde-se observar que os melhores zigotos, aqueles que se encontravam mais bem classificados (classe de um a seis), foram gerados a partir dos oócitos de tamanhos maiores.

Os melhores zigotos foram aqueles que possuíam localização central dos pró-núcleos, disposição organizada dos nucléolos e posição longitudinal ou perpendicular dos pró-núcleos em relação ao corpúsculo polar (*software Cronus<sup>™3</sup>*).

De acordo com publicações consultadas, o pró-núcleo masculino realiza uma rotação em direção ao pró-núcleo feminino para ser alinhado com o eixo polar e completar a divisão mitótica e, conseqüentemente, iniciar a divisão celular. Se essa rotação não é realizada de maneira adequada, pode ocorrer desenvolvimento anormal<sup>21</sup>.

Não foram encontrados dados para serem comparados com o achado da presente pesquisa. Os oócitos maiores possivelmente são frutos de crescimento e maturação mais adequados.

Segundo alguns autores, os oócitos na fase folicular inicial medem 25 µm e atingem em torno de 80-100 µm na fase tardia<sup>31</sup>. Portanto, a avaliação da medida do oócito prévia à realização da ICSI pode ser um método valioso para prever a formação de um bom zigoto.

Ao avaliar o espaço perivitelino, verificou-se que os menores foram responsáveis pela produção de zigotos mais bem classificados (classe de um a seis). Não há informações disponíveis para serem comparados com estes resultados. Espaços perivitelinos maiores possivelmente correspondem à retração da membrana citoplasmática do oócito e podem produzir alteração morfológica que compromete a qualidade do zigoto.

A zona pelúcida em procedimento de ICSI não tem relevância, uma vez que a micropipeta penetra nessa estrutura independentemente de sua espessura. Entretanto, tem grande relevância no momento da implantação, quando deverá ser fina para permitir a realização do *hatching* (rompimento da ZP e eclosão do embrião para implantação).

A ZP preserva a estrutura tridimensional e integridade do zigoto. É uma barreira física para proteger o oócito e o embrião dos antígenos durante o período da implantação<sup>31</sup>.

A avaliação nos tamanhos do corpúsculo polar (pequeno ou grande) pode ser determinada pela posição do fuso meiótico em relação à superfície do oócito. Oócitos contendo corpúsculo polar fragmentado podem estar associados à pós-maturidade ou envelhecimento *in vitro*<sup>13</sup>.

De acordo com os achados deste trabalho, não houve correlação entre a qualidade do zigoto e as medidas da ZP e do CP. Não se encontrou, também, relato que correlacionasse essas medidas.

As alterações morfológicas dos oócitos como: presença de granulações citoplasmáticas, inclusões citoplasmáticas, vacúolos e corpúsculos polares fragmentados não foram determinantes para alterar a classificação do zigoto.

Por causa dessa controvérsia, o significado dessas alterações precisa ser mais estudado para que correlações adequadas sejam avaliadas.

### 5.3 Morfologia e morfometria dos oócitos em relação a ocorrência de clivagem de embrião do segundo dia de cultivo

Os oócitos, uma vez fertilizados, produzem zigotos que, por sua vez, geram embriões com cinética e simetria de multiplicação celular baseadas em classificações embrionárias<sup>1-3,13</sup>.

Espera-se que um embrião de boa qualidade no segundo dia de cultivo tenha duas a quatro células, blastômeros simétricos e ausência de fragmentação<sup>13</sup>.

Este estudo mostrou que embriões de segundo dia de cultivo com formação adequada (duas a quatro células) foram provenientes de oócitos de diferentes tamanhos e morfologia variada.

Vale ressaltar que o embrião é formado pela união do espermatozóide com o óvulo e que os fatores determinantes para a sua formação adequada dependem da variabilidade de eventos que ocorrem nos dois gametas. Portanto, isso pode explicar parcialmente esses achados.

Algumas características esperadas são visíveis em oócitos e embriões e aparecem gradualmente. Espera-se que o processo de crescimento e desenvolvimento seja iniciado com o crescimento folicular e vascularização adequada, continuando com o oócito apresentando maturidade nuclear e citoplasmática e terminando com embrião mononucleado com divisão simétrica e blastômeros homogêneos.

A maturação do oócito, fertilização e desenvolvimento embrionário são eventos complexos e dinâmicos. Por isso é difícil definir em qual momento desse desenvolvimento pode-se identificar o embrião ideal para transferência.

## 6 CONCLUSÕES

No presente estudo, observamos que:

- As alterações morfológicas do oócito não se correlacionaram com a taxa de fecundação, classificação do zigoto e clivagem do embrião de segundo dia de cultivo.
- A presença de fertilização não se associou às diferentes medidas dos oócitos, zona pelúcida, corpúsculo polar e espaço perivitelino.
- Os zigotos mais bem classificados (classe de um a seis) foram provenientes de oócitos maiores e espaço perivitelino menores.
- As características morfológicas e morfométricas dos oócitos não se associaram à clivagem embrionária no segundo dia de cultivo.

Esses resultados indicam que a avaliação morfométrica de oócitos pode ser preditiva da qualidade de zigotos. Entretanto, a avaliação morfológica não se associa com a presença de fecundação, formação de zigoto e desenvolvimento embrionário de segundo dia de cultivo.

## REFERÊNCIAS

1. Ludwig M, Schöpper B, Al-Hasani, Dietrich K. (2000) Clinical use of pronuclear stage score following intracytoplasmic sperm injection: impact on pregnancy rates under the conditions of the German embryo protection law. *Hum Reprod*, **15**, 325-329.
2. Milki AA, Hinckley MD, Gebhardt J, Dasig D, Westphal LM, Behr B. (2002) Accuracy of day 3 criteria for selecting the best embryos. *Fertil Steril*, **77**, 1191-1195.
3. Terriou P, Sapin C, Giorgetti C, Hans E, Spach JL, Roulier R. (2001) Embryo score is a better predictor of pregnancy than the number of transferred embryos or female age. *Fertil Steril*, **75**, 525-531.
4. Scott L. (2003) The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos. *Hum Reprod Update*, **9**, 237-249.
5. Dubey AK, Wang H, Duffy P, Penzias AS. (1995) The correlation between follicular measurements, oocyte morphology, and fertilization rates in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril*, **64**, 787-790.
6. Saito H, Saito T, Kaneko T, Sasagawa I, Kuramoto T, Hiroi M. (2000) Relatively poor oocyte quality is an indication for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, **73**, 465-469.
7. Rattanachaiyanont M, Leader A, Léveillé M.C. (1999) Lack of correlation between oocyte-corona-cumulus complex morphology and nuclear maturity of oocytes collected in stimulated cycles for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, **71**, 937-940.
8. Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, Kadum IM. (1997) Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, **12**, 1267-1270.
9. Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K, Milingos S, Dendrinou S, Michalas S. (1999) Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, **72**, 240-244.
10. Wilding M, Matteo Di L, Andretti DS, Montanaro N, Capobianco C, Dale B. (2007) An oocyte score for use in assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet*, **24**, 350-358.
11. Sutter De P, Dozortsev D, Qian C, Dhont M. (1996) Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, **11**, 595-597.

12. Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. (1998) Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, **13**, 3431-3433.
13. Veeck LL. An Atlas of Human Gametes and Conceptuses: an Illustrated Reference for Assisted Reproductive Technology. Carnforth, UK: Parthenon Publishing Group, 1999.
14. Hassan-Ali H, Hisham-Saleh A, El-Gezeiry D, Baghdady I, Ismaeil I, Mandelbaum J. (1998) Perivitelline space granularity: a sign of human menopausal gonadotrophin overdose in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, **13**, 3425-3430.
15. Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Feichtinger O, Tews G. (2000) Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, **15**, 427-430.
16. Ciotti PM, Notarangelo L, Morselli-Labate AM, Felletti V, Porcu E, Venturoli S. (2004) First polar body morphology before ICSI is not related to embryo quality or pregnancy rate. *Hum Reprod*, **19**, 2334-2339.
17. Gabrielsen A, Lindenberg S, Petersen K. (2001) The impact of the zona pellucida thickness variation of human embryos on pregnancy outcome in relation to suboptimal embryo development. A prospective randomized controlled study. *Hum Reprod*, **16**, 2166-2170.
18. Scott L, Alvero R, Leondires M, Miller B. (2000) The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod*, **15**, 2394-2403.
19. Montag M, Van der Ven H. (2001) Evaluation of pronuclear morphology as the only selection criterion for further embryo culture and transfer: results of a prospective multicentre study. *Hum Reprod*, **16**, 2384-2389.
20. De Placido G, Wilding M, Strina I, Alviggi E, Alviggi C, Mollo A. *et al.* (2002) High outcome predictability after IVF using a combined score for zygote and embryo morphology and growth rate. *Hum Reprod*, **17**, 2402-2409.
21. Scott L. (2003) Pronuclear scoring as a predictor of embryo development. *Reproductive Bio Med Online*, **6**, 201-214.
22. Chen C, F.R.C.O.G., F.R.A.C.O.G., Kattera S. (2006) Comparison of pronuclear zygote morphology and early cleavage status of zygotes as additional criteria in the selection of day 3 embryos: a randomized study. *Fertil Steril*, **85**, 347-352.
23. Sjöblom P, Menezes J, Cummins L, Mathiyalagan B, Costello MF. (2006) Prediction of embryo developmental potential and pregnancy based on early stage morphological characteristics. *Fertil Steril*, **86**, 848-861.

24. Fisch JD, Sher G, Adamowicz M, Keskinetepe L. (2003) The graduated embryo score predicts the outcome of assisted reproductive technologies better than a single day 3 evaluation and achieves results associated with blastocyst transfer from day 3 embryo transfer. *Fertil Steril*, **80**, 1352-1358.
25. Kligman I, Benadiva C, Alikani M, Munné S. (1996) The presence of multinucleated blastomeres in human embryos is correlated with chromosomal abnormalities. *Hum Reprod*, **11**, 1492-1498.
26. Pelinck MJ, De Vos M, Dekens M, Van der Elst J, De Sutter P, Dhont M. (1998) Embryos cultured *in vitro* with multinucleated blastomeres have poor implantation potential in human in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, **13**, 960-963.
27. Van Royen E, Mangelschots K, Vercruyssen M, De Neubourg D, Valkenburg M, Ryckaert G. *et al.* (2003) Multinucleation in cleavage stage embryos. *Hum Reprod*, **18**, 1062-1069.
28. Roseboom TJ, Vermeiden JPW, Schoute E, Lens JW, Schats R. (1995) The probability of pregnancy after embryo transfer is affected by the age of the patient, cause of infertility, number of embryos transferred and the average morphology score, as revealed by multiple logistic regression analysis. *Hum Reprod*, **10**, 3035-3041.
29. Hsu M, Mayer J, Aronshon M, Lanzendorf S, Muasher S, Kolm P. *et al.* (1999) Embryo implantation in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: impact of cleavage status, morphology grade, and number of embryos transferred. *Fertil Steril*, **72**, 679-685.
30. Payne JF, Raburn DJ, Couchman GM, Price TM, Jamison MG, Walmer DK. (2005) Relationship between pre-embryo pronuclear morphology (zygote score) and standard day 2 or 3 embryo morphology with regard to assisted reproductive technique outcomes. *Fertil Steril*, **84**, 900-909.
31. Edwardas RG, Brody SA. Principles and practice of assisted human reproduction. Philadelphia, Pennsylvania. W.B. Saunders Company 1995.
32. Camargos AF, Melo VH, Carneiro MM, Reis FM. (2007) Ginecologia ambulatorial baseada em evidências científicas, cap. **19**, 273-281.

## **ANEXO E APÊNDICES**

### **ANEXO A – Parecer ético**

## Apêndice A - Termo de consentimento livre e esclarecido

Estamos realizando um projeto de pesquisa no Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, intitulado “Avaliação da morfologia (estudo da forma) dos espermatozoides (gameta masculino), óvulos (gameta feminino) e embriões (produto da união entre óvulo e o espermatozoide) a partir de um sistema de escore (várias características das estruturas serão examinadas) para prever a qualidade dos embriões e procedimento de ICSI (injeção do espermatozoide dentro do óvulo)”.

Vocês (homem e mulher) receberam instruções orais dos médicos sobre todas as etapas do seu tratamento e também assinaram o consentimento padrão, aplicado a todo casal que se submete à técnica de reprodução humana assistida no Hospital das Clínicas da UFMG.

Todos os riscos e benefícios da técnica de ICSI não estarão aumentados ou diminuídos com a sua participação voluntária deste projeto de pesquisa.

A nossa intenção ao fazer esta investigação é de melhorar a qualidade de serviços prestados à nossa comunidade.

Gostaríamos de levar ao conhecimento de vocês, em detalhes, sobre o que será realizado:

1) Os óvulos e espermatozoides obtidos por coleta serão submetidos aos procedimentos de rotina no laboratório;

2) Quando os óvulos e espermatozoides estiverem preparados para realizar a fertilização *in vitro*, pela técnica de ICSI, eles serão fotografados e filmados e as imagens serão armazenadas em um computador com códigos (cada casal terá um número, só conhecido pelos investigadores) que será destruído ao término da pesquisa;

3) A união do óvulo com o espermatozoide produzida em laboratório produzirá um embrião que também será fotografado e filmado e os procedimentos seguintes serão iguais aos do item 2 (óvulos e espermatozoides);

4) As imagens produzidas serão posteriormente examinadas pelos pesquisadores e os resultados publicados em teses, revistas e livros e mostrados em congressos e aulas e em nenhuma hipótese a identidade dos casais participantes será revelada;

Vale lembrar que o casal (homem ou mulher) que optar por **não** participar do estudo **não** será impedido de receber o seu tratamento e que este desejo é bem recebido pela equipe de investigadores que o entende como um direito de cidadania.

Ressalta-se também que, em qualquer momento que um dos componentes do casal decidir não participar da pesquisa, com a retirada do consentimento livre e esclarecido, a sua vontade será respeitada e nenhum dano será acarretado ao seu tratamento pela sua decisão.

**OBS:** este termo só deverá ser assinado após a assinatura do outro termo padrão (termo de consentimento assistencial) exigido de todas as pessoas que tratam por Fertilização Assistida no Hospital das Clínicas da UFMG.

Belo Horizonte,

-----	X	-----
Casal		
-----		-----
Pesquisador		Pesquisadora

Fernando Marcos Reis (pesquisador) tel:31-32489485

Maria das Graças Rocha de Santana Camargos (pesquisadora) tel 31- 32489485

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP)

Endereço: Av. Antônio Carlos 6.627 7º andar, Prédio da Reitoria,  
Pampulha.

Tel 31-34994592

**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Hospital das Clínicas**  
**Serviço de Reprodução Humana**

**CONSENTIMENTO PARA TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA**  
**(ICSI)**

Declaramos que:

Consentimos livremente em participar do Programa de Fertilização Assistida. Este programa visa à obtenção de uma gestação, como parte integrante do tratamento de esterilidade conjugal ao qual estamos nos submetendo.

Tivemos a oportunidade de esclarecer todas as nossas dúvidas relativas ao referido programa, aos tratamentos alternativos, aos possíveis desconfortos, efeitos colaterais e riscos inerentes ao programa. Estamos cientes da possibilidade de ocorrerem outras complicações além daquelas descritas neste documento. Reconhecendo que embora sejam empenhados todos os esforços a fim de evitar ou minimizar os efeitos colaterais e complicações, estes podem ser imprevisíveis tanto em natureza como em gravidade.

Estamos cientes de que não seremos penalizados se nos recusarmos a participar do referido programa e de que seremos informados em detalhe e com antecedência sobre a ovulação e mudanças referentes ao programa que venham influenciar nossa decisão de prosseguir com o programa ou não.

Estamos cientes de que o programa poderá ser suspenso, a critério médico, quando houver algum fato significativo que possa aumentar o desconforto, efeitos colaterais e/ou riscos ou ainda no caso de não haver boas chances de sucesso (gestação) com a progressão do programa.

Estamos, ainda, cientes de que qualquer informação obtida durante a realização deste programa que se refira diretamente a nós é verdadeira; e permanecerá confidencial, como previsto em lei. Concordamos que os dados obtidos durante o programa possam ser objeto de publicação em literatura médica, sob condição de que nossa identidade seja resguardada.

Para tanto, autorizamos - o casal - a realização da Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóides (ICSI), que consiste na injeção de um único espermatozóide no interior de um óvulo. Estamos cientes de que esta é melhor opção de uma gestação no nosso caso.

Tendo lido com atenção e compreendido todas as informações contidas neste documento, recebido informações adicionais e esclarecimentos completos, concordamos em participar do Programa de Fertilização Assistida. Reconhecemos termos sido informados em detalhes sobre nossos direitos e responsabilidade e, não havendo dúvidas, datamos e assinamos, como se segue:

CASAL: -----

-----

MÉDICOS: -----

-----

Belo Horizonte, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

## APÊNDICE B – Dados dos pacientes

## Dados da Paciente

**Pct-** Paciente

**Id p-** Idade paciente

**Id m-** Idade marido

## Diag- Diagnóstico

- 01- Oligoasteno
- 02- Azoospermia obstrutiva
- 03- Azoospermia secretora
- 04- Endometriose
- 05- STB
- 06- Ejaculação retrógrada
- 07- Obstrução tubária
- 08- ESCA
- 09- Distúrbios ovulatórios
- 10- Receptora

**Fol-** Nº de folículos

**D Ind-** Dias de indução

**FSH UI-** Unidades de FSH

**VLF/ml-** Volume líquido folicular

## Oócito

**Oócito-** Quantidade de oócitos coletados

## E-Estágio

- 01- Vesícula Germinativa
- 02- M I
- 03- M II
- 04- Degenerado

## Medidas

**Med.VG-** Medida da vesícula germinativa

**Med Ooct-** Medida do oócito

**EPV-** Espaço perivitelino

**ZP-** Zona pelúcida

**CP-** Corpúsculo Polar

## Frag CP- Fragmentação

### corpúsculo polar

- 01- Presente
- 02- Ausente

## G- Granulações

- 01- Presente
- 02- Ausente

## IC- Inclusões Citoplasmáticas

- 01- Presente
- 02- Ausente

## V- Vacuolos

- 01- Presente
- 02- Ausente

## **Zigoto(PN)**

**Nº PN-** Números de pronúcleos

## D Nu- Disposição nucleolos

- 01- Grandes e alinhados
- 02- Grandes e dispersos
- 03- PN alinhado e outro disperso
- 04- Pequenos e dispersos

## D Pn-Disposição pronúcleos

- 01- Centralizado
- 02- Não centralizado
- 03- Separados
- 04- Tamanhos diferentes
- 05- Fragmentado

## PN CP-Disposição

### Pronúcleos em relação ao CP

- 01- Alinhamento longitudinal
- 02- Alinhamento perpendicular

## **Tamanho**

**P1-**Pró-núcleo 1

**P2-**Pró-núcleo 2

**P3-**Pró-núcleo 3

## **Classif- Classificação**

## **Embrião 2º dia**

## Nº BL- Nº de Blastômeros

- 01- 2 + blastômeros
- 02- 4 + blastômeros
- 03- 8 + blastômeros
- 04- 16 + blastômeros

**Med BL-** Medida Blastômero

## N -Núcleo do blastômero

- 01- Presente
- 02- Ausente

## Frag 2- Fragmentação do blastômero

- 01- Sem fragmento
- 02- Poucos fragmentos
- 03- Blastômeros desiguais
- 04- Fragmentação excessiva

## Classif- Classificação

## **Embrião 3º dia**

## Nº BL- Nº de Blastômeros

- 01- 2 + blastômeros
- 02- 4 + blastômeros
- 03- 8 + blastômeros
- 04- 16 + blastômeros

**Med BI-** Medida Blastômero

## N- Núcleo do blastômero

- 01- Presente
- 02- Ausente

### Frag 3- Fragmentação

- 01- Sem fragmento
- 02- Poucos fragmentos
- 03- Blastômeros desiguais
- 04- Fragmentação excessiva

### Classif-Classificação

**Embrião** **5º dia**  
**BLASTOCISTO**

### Eb 5º dia-Embrião do 5º dia

1. Mórula
2. Blastocisto
3. Degenerado

### Dias Blast-Dias de cultivo de blastocisto

1. 5 dias de cultivo
2. 6 dias de cultivo
3. 7 dias de cultivo

### Med Blst- Medida blastocisto

### MCI- Massa Celular Interna

- 01- Compacta , muitas células
- 02- Menos compacta, muitas células
- 03- Poucas células

### TROF- Trofoectoderma

- 01- Muitas células,epitêlio coeso
- 02- Poucas células,epitêlio frouxo
- 03- Poucas células

### BLCT- Blastocisto Classificação

- 01- Blastocisto inicial < 50 %
- 02- Blastocisto > 50 %
- 03- 100% expansão
- 04- Expandido com **ZP** fina
- 05- Blastocisto em eclusão
- 06- Blastocisto eclodido

### D-Destino

- 01- Útero
- 02- Congelado
- 03- Desprezado

### G-Gravidez

- 01- 1Saco gestacional
- 02- 2 Sacos gestacionais
- 03- 3 Sacos gestacionais
- 04- 4 Sacos gestacionais
- 05- Não

N.óvulo	Dados da paciente									Óvulo							Zigoto(PN)							Embrião 2º DIA				Embrião 3º DIA				Embrião 5º DIA (Bla)																		
	Pcte	Id P	Id M	Diag	Fol	D.lind	FSH UI	VLFI/ml	Oócito	E	Med.VG	Med.O	EPV	ZP	CP	Frag.CP	G	IC	V	NPr	D Nu	Dpn	Pr.CP	P1	P2	P3	Classif	NBL	Med.BI	Nucleo	Frag 2	Classif	NBL	Med.BI	Nucleo	Frag 3	Classif	Eb 5 dias	blas	blas	Med.Bls	MCI	TROF	Classif.	D					
1	1	32	40	10				1	3		74,1	5,2	12,4	13,5	1	1	2	2	2	3	1	2	15,5	16,1		6	2	37,9	1	2	7															1				
2	1							2	3		74,8	8,3	10,6	13,6	1	1	2	2	2	2	1	1	16,9	17,5		3	2	37	1	2	8																	3		
3	1							3	3		75,7	7,3	11,3	12,5	1	1	2	2	0									1	56,8	2	4	5																1		
4	1							4	3		73,8	4,8	10,6	12	2	1	2	2	2	2	2	1	1	14,1	16,4		3	0	0																				3	
5	1							5	3		72,9	7,4	9,8	12,9	1	1	2	2	2	2	1	1	15,7	16,1		3	2	46,6	1	1	6																	1		
6	1							6	3		73,9	4,4	13,4	10,9	2	1	2	1	2	3	2	2	16,7	17,2		14	3	33,8	1	4	13																	3		
7	2	35	42	5	10	14	1650	25	1	3	78,5	2,8	14,4	13,5	2	1	2	2	2	4	1	1	18,5	19,6		7	0	0																					3	
8	2							2	3		78	6,6	15,2	13,7	2	2	2	2	2	0			0	0				1	55,6	1	1	2																1		
9	2							3	3		77,3	4,3	12,9	13,4	2	2	2	2	0				0	0				0	0																				3	
10	2							4	1	20,2	73,7						1	2	2																													3		
11	3	29	26	5	28	10	1650	100	1	3	77,7	4,4	10,8	13,8	1	2	2	2	2	3	2	2	15,1	16,5		14	1	55,7	1	2	3	2	44,9	1	2	7	1	1									1			
12	3							2	3		76,5	6,3	11,8	13,6	2	2	2	2	0									0	0																				3	
13	3							3	3		74,6	3,8	10,6	14,1	2	2	2	2	0									0	0																				3	
14	3							4	1	20,8	69,5	7	11,9				1	2	2																														3	
15	3							5	3		76,5	3,7	10,6	13,1	1	1	1	2	2	2	2	1	16,7	16,9		11	1	59,8	2	2	3	3	34	1	2	11	2	1		84,4					1	1		3		
16	3							6	3		74,1	6,7	11,1	13,3	2	2	2	2	0									0	0																				3	
17	3							7	3		77,1	4,5	13,3	11,9	2	1	1	1	2	2	1	2	16	16,4		4	2	46	1	1	6	3	36,5	1	3	12	2	1		96,5								1		
18	3							8	3		73,8	9,6	11,7	13,5	2	1	1	1	0				0	0				0	0																				3	
19	3							9	1	17,7	74,2	3,8	10,1				1	2	2																														3	
20	3							10	1	17,9	73,6	4,8	11,6				1	2	2																														3	
21	3							11	2		77,5	5,1	11,3				1	2	2																														3	
22	3							12	3		77,3	3	11,9	11,8	2	1	2	1	2	4	2	1	15,2	15,5		15	2	44,2	1	3	8	3	31,7	1	3	12	1	1										3		
23	3							13	2		79,4		13,5				1	1	2																														3	
24	3							14	3		75,4	5,5	11,1	12,2	2	1	1	1	0				0	0				0	0																				3	
25	3							15	3		77	6,2	10,9	13,2	2	1	1	2	0				0	0				0	0																				3	
26	3							16	1	17,8	72,1		12,1				1	2	2																															3
27	3							17	3		75,9	6,2	11,2	11,5	2	1	2	2	1				16,1	0				0	0																				3	
28	3							18	3		74,9	0	11,9	18,2	1	1	1	1	2	3	1	2	17,2	17,4		6	1	44,4	2	4	5	1	48,2	1	4	5	3	1										3		
29	3							19	3		76,3	5,5	11,6	12,5	2	1	1	1	2	3	1	2	15,6	15,8		6	1	52,7	2	1	2	2	36,3	1	3	4	1	3										2	2	
30	3							20	3		70,5	5,9	10,5	11,4	2	2	2	2	2	4	1	1	17,4	19,3		7	2	41,2	1	3	8	2	33,4	1	3	8	3												3	
31	4	33	37	1	11	9	1800	59	1	3	76,3	4,3	11,7	13,1	2	1	2	2	0				0	0																									3	
32	4							2	3		75,4	5,2	13	13,3	2	1	1	2	2	2	1	1	16,5	17,8		3	2	44,1	1	2	7																		1	
33	4							3	2		73	5,2	13,9				1	1	1																														3	
34	4							4	3		71,6	5,1	13,2	13,4	2	1	1	2	2	2	1	1	16,2	16,9		3	1	53,7	1	1	2																		1	
35	4							5	3		75,1	3,6	13,1	11,9	2	1	2	2	2				13,9	18,2		18	1	54,6	1	2	3																	1		
36	4							6	1	20,7	74,4		14,1				1	2	2																														3	
37	4							7	1	20,8	78,9																																						3	
38	4							8	3		75,6	0	12,7	12,4	2	1	2	2	2	3	1	1	17	17,2		5	1	44,6	1	2	3																		1	
39	5	24	31	1	20	9	1800	170	1	3	74,3	6,1	9,2	12,1	2	1	2	2	0				0	0			1	50,8	1	3	4																		3	
40	5							2	3		71,6	4,9	9,6	11,5	2	2	2	2	2				15,6	17,6		17	2	34,6	2	4	9																	1		
41	5							3	3		76,9	4,1	12,2	11,3	2	1	2	2	2	3	1	1	15,4	16,5		5	1	47,1	1	4	5																		1	
42	5							4	3		73,9	5,6	11,9	12,6	2	2	2	2	0				0	0				2	36,5	1	3	8																	3	
43	5							5	3		77,5	8,3	11,1	13	2	1	2	1	2	1	1	2	16,3	16,9		2	2	42	2	3	8																		1	
44	5							6	3		73,5	6,3	9,8	12,2	2	2	2	2	2	2	1	2	14,9	15,3		4	1	52,7	2	3	4																	1		
45	5							7	3		75,1	5,3	10,3	12,3	1	1	2	1	2	3	1	2	16,3	17,6		6	1	52,6	1	1	2																		3	
46	6	37																																																

N.ºOócito	Dados da paciente										Ócito							Zigoto(PN)							Embrião 2º DIA				Embrião 3º DIA				Embrião 5º DIA (Bia)																		
	Pcte	Id P	Id M	Diag	Fol	D.lind	FSH UI	VLF/ml	Oócito	E	Med.VG	Med. O	EPV	ZP	CP	Frag.CP	G	IC	V	NPr	D Nu	Dpn	Pr.CP	P1	P2	P3	Classif	NBL	Embrião 2º DIA			Embrião 3º DIA			Embrião 5º DIA (Bia)																
																													Med.Bi	Nucleo	Frag 2	NBL	Med.Bi	Nucleo	Frag 3	Classif	Eb 5 dias	Clas bias	Med.Bis	MCI	TROF	Classif.	D								
65	9							6	3		73,2	3,3	9,9	12,5	2	1	1	2	2	2	4	2	2	17,6	18,7		16	2	48,7	1	2	7	2	41,8	1	3	8	2	1	80				1	2						
66	9							7	3		72,5	5,2	11,6	13,1	2	1	2	2	2	2	3	1	1	18	20		5	1	59	1	2	3	2	41,8	1	3	8	3	1						3						
67	10	33	37	1	26	8	1800	60	1	3	76,7	6,1	13,7	12,8	2	2	2	2	0				0	0					0	0															3						
68	10							2	3		74,3	6,8	12,2	14,6	2	2	1	2	0				0	0					0	0																3					
69	10							3	3		75,5	8	12,7	13,2	2	2	2	2	0				0	0					0	0																3					
70	10							4	3		80,2	7,5	11,3	13,4	2	2	1	2	0				0	0					2	50,1		1	6	3	36,4	1	3	12									1				
71	10							5	3		74,7	8,5	13	14,2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	14,1	16,5		10	2	46	1	2	7	3	36	1	2	11									1					
72	11	48		10				1	3		65,7	11,2	15,7	14,4	1	1	2	2	2	2	2	2	2	17,9	19,3		12	2	54,1	1	1	2														1					
73	11							2	3		71,6	6,3	10,7	15,2	1	1	2	2	2	2	3	1	1	16,1	18,2		5	1	47,7	1	3	4														1					
74	12	32	31	1	18	9	1800	150	1	3	76,2	4,1	9,8	14,7	2	1	2	2	2	2	1	1	15,5	16,4		1	2	42,8	1	2	3	3	32,8	1	2	11	2	1	89,5						2	2					
75	12							2	3		74,5	5,4	10,6	11,7	1	1	2	2	0				0	0					0	0																	3				
76	12							3	3		76,2	5,6	10,9	12,5	1	1	2	2	2	2	2	1	2	15,2	16,4		4	4	43,8	1	2	7	3	37,2	1	2	11	1	1	71,4				14	2						
77	12							4	3		77,4	5,3	11,4	15,7	2	1	2	2	2	2	1	1	1	14,7	16,9		1	2	43,5	1	3	8	3	33,7	1	2	11	2	2	116,7	1	2					7	2			
78	12							5	3		75,2	4,3	11,9	15,6	1	1	2	2	2	2	3	1	2	16,7	17,3		6	2	44,4	1	2	7	3	35,5	1	2	11	2	1	87,2								2	2		
79	12							6	1	19,1	74,8	8,7	12,3																																		3				
80	12							7	3		74,1	6,8	13,5	14,7	1	1	2	2	2	2	3	1	2	16,4	18		6	1	61,4	2	2	3	2	44,4	1	2	7	3	1									3			
81	12							8	3		75,1	5,7	16	15,4	2	1	2	2	2	2	3	1	2	17,2	17,7		6	2	42,7	1	2	7	3	38,6	1	2	11	1	1	79,6								3			
82	12							9	3		75,5	4,9	10,4	13,7	1	1	2	2	2	2	2	1	1	17,7	18,7		3	2	42	1	1	6	2	38,7	1	3	4	3	1									3			
83	12							10	3		73,2	6	12,9	13,4	1	1	2	2	2	2	2	1	1	17,4	18		3	2	42,5	1	2	7	3	33,6	2	2	11	1	2	120,8	3	3		11	2						
84	12							11	3		77,3	5,4	12,8	13,3	1	1	2	2	2	2	3	1	1	16,2	16,5		5	1	53,6	1	2	3	2	44,5	1	2	7	3	2									3			
85	12							12	3		74,1	6,1	10,5	10,5	2	1	2	2	2	2	3	1	2	14,5	15,9		6	2	41,4	1	3	8	2	36,2	1	3	4	3	2									3			
86	12							13	3		76,8	4,7	13	13,3	2	1	2	2	2	2	2	1	1	16,8	19,1		3	2	45	1	3	4	2	38,7	1	2	7	3	1									3			
87	12							14	3		77,1	6,3	12,7	12	2	1	2	2	0					0	0					0	0																	3			
88	12							15	3		74,6	6,2	13,6	13,2	1	1	2	2	2	2	2	1	1	15,4	16		3	2	46,1	1	2	7	3	35,1	1	1	10	1	1	72,3							16	2			
89	13	33	37	1	18	10	1950	75	1	3	78,5	4	16,6	14,5	1	1	2	2	0				0	0					0	0																		3			
90	13							2	3		73,5	4,1	14,9	14	1	1	2	2	2	2	3	1	2	14,8	15,6		6	2	46,4	1	1	6																	1		
91	13							3	3		81,8	6,2	13,6	14	2	1	2	2	0				0	0					0	0																			3		
92	13							4	3		84	17,6	12,8	12,6	2	1	2	2	2	2	2	1	2	14,7	15,9		4	1	56,4	1	1	2	2	43,1	1	3	4	3	2										3		
93	13							5	3		80,1	4,6	14,8	12,5	2	1	2	2	2	2	2	1	1	14,9	15		3	2	57,4	2	1	2	2	46,8	1	3	8	3	2										3		
94	13							6	3		79,9	4,9	13,3	16,1	1	1	2	2	2	2	3	1	1	16,9	17,6		5	2	48,7	1	3	8	2	42,4	1	3	8	3	2										3		
95	13							7	3		79,8	5,2	12,6	17,2	1	1	2	2	2	2	3	1	1	14,1	15,5		5	2	40,4	1	2	7																	1		
96	13							8	3		74	6,5	10,7	12,3	2	2	2	2	2	2	2	1	1	13,8	14,9		3	2	52,2	1	3	8																	1		
97	13							9	3		74,9	4,4	15	12,4	1	1	2	2	0					0	0					0	0																		3		
98	13							10	3		79	4,6	15,5	13,8	2	1	2	2	2	2	2	1	1	18,5	19,6		3	2	44,7	1	2	7	3	39,4	1	3	12	3	2										3		
99	13							11	3		77,6	3,4	13,4	13,4	1	1	2	2	2	2	2	1	1	15,8	16,2		3	2	55	1	3	8																		3	
100	14	33	37	1	12	16	1650	50	1	3	72,5	4,7	10,3	12,9	2	1	2	2	2	2	2	1	1	16,1	16,9		3	1	53,4	1	3	4	3	31,4	1	3	12	3	1										1		
101	14							2	3		73,7	4,3	11	13,7	2	2	2	2	2	2	2	1	2	14,7	14,8		4	2	45	1	3	8	3	33,2	1	2	11													1	
102	14							3	1	21,8	72,6		10,7																																						3
103	14							4	3		74,4	4,1	11	13,3	2	1	2	2	0				0	0					0	0																					3
104	14							5	3		74,2	4,7	11,8	11,5	2	2	2	2	2	2	3	1	1	16	17,8		5	2	46	1	3	8	3	32,8	1	3	12													1	
105	14							6	1	22,4	72,2		9,7																																						3
106	14							7	3		70,6	10,3	9,5	20,1	1	2	2	2	0				0	0					0	0																					3
107	14							8	3		74	6,5	12,3	10,7																																					

N.óóçito	Dados da paciente									Óóçito								Zigoto(PN)								Embrião 2º DIA					Embrião 3º DIA					Embrião 5º DIA (Bla)																		
	Pcte	Id P	Id M	Diag	Fol	D.Ind	FSH UI	VLf/m	Oóçito	E	Med.VG	Med. O	EPV	ZP	CP	Frag.CP	G	IC	V	NPr	D Nu	Dpn	Pr.CP	P1	P2	P3	Classif.	NBL	Med.BI	Nucleo	Frag 2	Classif.	NBL	Med.BI	Nucleo	Frag 3	Classif.	Eb 5 dias	Ías blas	Med.BIs	MCI	TROF	Classif.	D										
129	18	31	45	7	22	10	1950	125	1	3	74,8	3,6	11,4	14,7	2	1	1	2	2	2	1	1	1	16,5	16,9		1						3	31,4	1	3	12	2	1							1	2							
130	18								2	3	75,2	9,1	14,4	16	1	1	2	2	2	2	2	1	2	16,5	17,2		4						3	40,1	1	3	12									1	1							
131	18								3	3	73,8	6,2	11,4	14,7	2	2	1	2	2	2	1	1	2	14,8	15,8		6						3	35,9	1	3	12										1	1						
132	18								4	3	74,5	4,7	14,1	13,8	1	1	2	1	2	3	1	2	1	16,8	17,4		5						3	33,8	1	3	12										1	1						
133	18								5	3	76	4,1	10,8	15,9	2	1	1	2	3	2	1	2	2	12,2	13,9	9,1	4																					3	3					
134	18								6	3	76,1	3,6	11,1	12,2	1	1	2	2	2	0				0	0																								3	3				
135	18								7	3	75,8	3,7	9,9	17,5	1	1	1	2	2	3	1	2	2	16,9	18,8		6						2	40,7	1	3	8	3	1										3	3				
136	18								8	2	73,1		11,9																																				3	3				
137	18								9	3	74,9	5,3	14,4	13,2	1	2	1	2	2	3	1	2	1	17	18,3		6						3	41,5	1	3	12												1	1				
138	18								10	3	77,2	4,4	11,2	20,8	1	1	1	2	2	2	2	1	2	17	17,9		4						3	35,5	1	3	12	2	1	126,8	2	2	7	2					2	2				
139	19	38	37	1	11	8	1650	55	1	3	74,7	7,3	12,2	12,9	1	1	2	1																																3	3			
140	19								2	3	76,5	6,2	10,2	9,3	2	1	2	2	2	2			14,8	21,6		18	2	39,8	2	3	8	2	37,3	2	3	8													1	1				
141	19								3	3	76,4	8,8	10,2	12,6	2	1	2	2	2	0			0	0																											3	3		
142	19								4	3	73,7	7,6	9,2	13,9	1	1	2	2	2	3	1	2	14,7	16,3		6	1	52,1	2	2	3	2	44,8	2	2	7													1	1				
143	19								5	3	76,3	5,5	8,6	15,4	1	1	2	2	2	3	1	2	17,4	20,6		6																									3	3		
144	19								6	2	74,1	11	12,1																																					3	3			
145	19								7	3	77,5	6,2	11,6	10,3	2	2	1	2	2	0				0	0																										3	3		
146	19								8	3	73	8,5	11,8	18,3	1	1	2	2	3				11,1	12	17,7	19																									3	3		
147	20	38	42	1	11	14	1950	58	1	3	75,2	7,7	12,5	14,7	2	1	2	2	2	2	2	11,5	18,2		12	1	45,7	2	3	4																					1	1		
148	20								2	3	76,2	6,4	15,3	15,3	1	1	2	2	2	2	1	1	2	16,6	18,7		2	1	53,2	1	2	3																				1	1	
149	20								3	3	74,2	7,9	10,9	14,8	2	1	2	2	2	2	2	1	1	16,1	17,9		3	1	61,7	2	3	4																				1	1	
150	20								4	3	74,3	7,1	12,6	14,7	2	1	2	2	2	2	4	2	2	14,2	14,5		16	1	60,2	1	1	2																				1	1	
151	21	37	52	2	17	9	1800	50	1	3	75,9	8,2	8,4	11,6	2	2	2	2	3				8,8	11,8	18,3	19	1	47,6	1	3	4																			3	3			
152	21								2	3	75	5,7	9,5	11,8	1	1	2	2	2	0				0	0																											3	3	
153	21								3	3	74,2	5,3	8,4	12,8	2	1	2	2	2	0				0	0																											3	3	
154	21								4	3	75,7	4,9	8,4	10,6	1	1	2	2	2	0				0	0																											3	3	
155	22	36	39	8	12	12	1950	100	1	1	24,1	7,7	12,8																																						3	3		
156	22								2	3	76,6	4,6	9,7	14	2	2	2	2	2	2	2	2	14,8	17,6		12	2	47,7	1	3	8																						1	1
157	22								3	3	80,7	6,8	12,2	12,2	1	1	2	2	2	2	2	1	1	17,2	17,3		3	1	60,6	2	2	3	2	47,7	1	3	8	3														3	3	
158	22								4	3	75,6	7	13	13,9	2	1	2	2	2	2	2	1	2	17,7	18,6		4	2	44,6	1	3	8																					1	1
159	22								5	3	74,6	7,5	11,8	13,7	2	1	2	2	2	2	2	1	1	17,3	18,1		3	2	50,5	2	2	7	2	40,8	1	3	8	2	1	84,3										1	2			
160	22								6	3	79,7	4,5	12,3	11,9	2	1	2	1	2	2	2	1	2	16,7	17,9		4	2	52	1	3	8																					1	1
161	22								7	3	76,2	4	12	14,9	2	1	2	1	2	2	2	1	2	17,8	19,1		4	1	48,1	1	3	4																					1	1
162	22								8	1	22,8	7,6	4	10,8																																							3	3
163	22								9	1	20	7,5	3,7	11,4																																							3	3
164	22								10	3	80,6	5,5	14,1	12,5	2	2	2	2	2	2	2	1	1	18,7	18,8		3	2	51,6	2	3	8	3	40	1	2	11	2	1	111,9											2	2		
165	23	35	37	1 e 9	18	12	1800	83	1	3	73,6	6,3	11,4	15,7	1	1	2	2	2	2	2	1	1	18,5	18,6		3	1	48,9	1	3	4	2	44,3	1	2	7	3	1												3	3		
166	23								2	3	69,7	6,2	13,2	12,9	1	2	2	2	3				7,7	9,7	17,6	19	1	37,4	1	4	5	1	40	1	4	5	3	1													3	3		
167	23								3	3	67,4	8,8	12,9	13,3	2	1	1	2	2	4	1	2	17,8	19,1		8	1	53,7	1	2	3	2	40,4	1	3	8	3	1														3	3	
168	23								4	3	66,1	12,6	10,8	13,4	2	1	1	2	2	4	1	2	18,7	19,2		8	1	61,8	2	2	3	2	35,3	1	3	8	1	1													16	1		
169	23								5	3	71,3	11,7	14,6	10,8	1	1	2	2	2	2	4	1	1	18,7	19,3		7	2	41,2	1	3	8	2	44	1	3	8	3	1													3	3	
170	23								6	3	72,6	9,3	11,8	13,																																								



## Idade Paciente

### Infertilidade:

1. Primária
2. Secundária
3. Desconhecido

### Espermograma anterior, tendência.

#### 1. Normal

- Concentração:  $\geq 20 \times 10^6$  /ml,
- Motilidade:  $\geq 50\%$  A e B ou  $\geq 25\%$  A

#### 2. Oligozoospermia

- Concentração:  $< 20 \times 10^6$  /ml,

#### 3. Astenozoospermia

- Motilidade:  $< 50\%$  A e B ou  $< 25\%$  A

#### 4. Oligoastenozoospermia leve

- Conc. **10 até  $< 20 \times 10^6$  / ml**
- Motilidade:  $< 50\%$  A e B ou  $< 25\%$  A

#### 5. Oligoastenozoospermia moderada

- Conc. **5 até  $< 10 \times 10^6$  /ml**
- Motilidade:  $< 50\%$  A e B ou  $< 25\%$  A

#### 6. Oligoastenozoospermia severa

- Conc.  $< 5 \times 10^6$  /ml
- Motilidade:  $< 50\%$  A e B ou  $< 25\%$  A

#### 7. Azoospermia: Ausência de espermatozoides no ejaculado.

### Recuperação:

1. Swim-up / vt
2. Lavado /ml

### Recuperação Concentração Swim-up

1.  $> 8 \times 10^6$  /ml
2.  $4-8 \times 10^6$  /ml
3.  $< 4 \times 10^6$  /ml
4. Sem recuperação

### Recuperação Motilidade Swim-up

1. A e B  $\geq 50\%$
2. A e B  $\geq 50\%$  Predomina B,
3. Predomina C e D,
4. Raros A e B,
5. Raros C e D,
6. Sem recuperação

### Indicação ICSI:

1. Oligozoospermia
2. Astenozoospermia
3. Oligoastenozoospermia
4. Azoospermia obstrutiva
5. Azoospermia secretora
6. Ejaculação retrógrada
7. ESCA
8. Fator feminino isolado
9. Fator feminino + oligozoospermia
10. Fator feminino + astenozoospermia
11. Fator feminino + oligoastenozoosp
12. Fator feminino + azoospermia obstrutiva

13. Fator feminino + azoospermia secretora

14. Fator feminino + ejaculação retrógrada

### Origem do Sêmen

1. Ejaculado
2. Punção epidídimo-vasectomia-
3. Punção epidídimo-ausência deferente
4. Punção epidídimo por outras obstruções de vias
5. Biópsia testicular

Classificação do sêmen no dia do procedimento ICSI.

1. Normal

- Concentração:  $\geq 20 \times 10^6$  /ml,
- Motilidade  $\geq 50\%$  A e B ou  $\geq 25\%$  A

2. Oligozoospermia

- Concentração:  $< 20 \times 10^6$  /ml,

3. Astenozoospermia

- Motilidade:  $< 50\%$  A e B ou  $< 25\%$  A

4. Oligoastenozoospermia leve

- Conc. **10 até  $< 20 \times 10^6$  / ml**
- Motilidade:  $< 50\%$  A e B ou  $< 25\%$  A

5. Oligoastenozoospermia moderada

- Conc. **5 até  $< 10 \times 10^6$  /ml**
- Motilidade:  $< 50\%$  A e B ou  $< 25\%$  A

6. Oligoastenozoospermia severa

- Conc.  **$< 5 \times 10^6$  /ml**
- Motilidade:  $< 50\%$  A e B ou  $< 25\%$  A

7. Azoospermia: Ausência de espermatozoides no ejaculado.

Recuperação:

3. Swim-up / vt
4. Lavado /ml

Recuperação Concentração:

1.  $> 8 \times 10^6$  /ml
2.  $4-8 \times 10^6$  /ml
3.  $< 4 \times 10^6$  /ml
4. Sem recuperação

Recuperação Motilidade:

1. A e B  $\geq 50\%$
2. A e B  $\geq 50\%$  Predomina B,
3. Predomina C e D,
4. Raros A e B,
5. Raros C e D,
6. Sem recuperação

Pct	Idade	Infertilidade	Espgr anterior	Recuperação	Rec.Concentr.	Rec.Motilidade	Indicação ICSI	Origem	Espgr dia ICSI	Recuperação	Rec.Concentr.	Rec.Motilidade
1	40	1	1	1	1	1	8	1	1	1	2	1
2	42	2	1	1	2	2	11	1	6	2	4	5
3	26	1	3	1	1	2	10	1	1	1	1	2
4	37	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1
5	31	1	6	2	4	5	3	1	6	2	4	4
6	32	1	3	1	3	2	3	1	3	1	3	1
7	33	1	6	1	4	5	3	1	6	2	4	4
8	31	3	6	2	4	4	3	1	6	2	4	4
9	38	1	4	1	3	2	9	1	6	1	3	1
10	37	2	1	1	2	2	7	1	1	1	2	1
11	30	1	1	1	1	1	8	1	1	1	1	1
12	31	1	5	1	3	1	3	1	5	1	2	1
13	37	1	4	1	4	6	3	1	4	1	3	2
14	37	1	3	1	2	1	2	1	3	1	2	1
15	41	1	6	1	4	4	3	1	6	2	4	2
16	45	3	5	1	3	2	11	1	5	1	3	2

Pct	Idade	Infertilidade	Espgr anterior	Recuperação	Rec. Concent	Rec.Motilidade	Indicação	Origem	Espgr dia ICSI	Recuperação	Rec.Concentraçã	Rec.Motilidade
17	35	1	6	1	4	4	3	1	5	1	3	2
18	56	2	1	1	1	1	8	1	1	1	1	1
19	37	3	6	2	4	3	3	1	6	2	4	4
20	42	1	4	1	3	1	3	1	2	1	1	1
21	52	2	7	0	0	0	4	2	7	0	0	5
22	39	1	1	1	2	1	7	1	1	1	1	2
23	37	1	6	2	4	5	11	1	6	2	4	5
24	35	1	6	2	4	6	3	1	6	2	4	4
25	40	1	1	1	3	1	2	1	1	1	3	1
26	38	3	3	1	3	4	10	1	3	1	3	4
27	46	3	1	1	1	1	8	1	1	1	1	1
28	53	1	6	1	4	4	11	1	6	1	3	2
29	43	3	3	1	3	2	10	1	3	1	2	2
30	33	1	6	1	4	5	3	1	6	2	4	4
31	41	3	6	2	4	2	3	1	5	1	3	1
32	33	1	7	0	0	0	4	4	7	0	0	3

## Lista das pacientes que engravidaram

Nº.da paciente	$\beta$ hCG/ + ou -
01	+
02	+
03	-
04	-
05	-
06	-
07	-
08	-
09	+
10	-
11	-
12	-
13	-
14	+
15	+
16	+
17	+
18	+
19	-
20	+
21	-
22	-
23	-
24	-
25	-
26	+
27	-
28	-
29	+
30	+
31	-
32	+