

Manual de Procedimientos

Laboratório de

Reprodução Assistida

2006





CRÉDITOS

Este documento foi preparado por:

- Dr. Ariel Ahumada (Chile)
- Dr. Santiago Brugo Olmedo (Argentina)
- Dr. Juergen Liebermann (Alemanha)
- Dra. Ana Lúcia Mauri (Brasil)
- Dr. Randolpho Medina (Venezuela)
- Dra. Maria Natalia Posada (Colômbia)
- Dr. Luis Roblero (Chile)
- Dra. Estrella Rosemberg (Venezuela)
- Dra. M. Teresa Olivieri (Venezuela)
- Dra. M. Soledad Sepúlveda (Chile)
- Dr. Michael Tucker (USA)
- Dra. M. Teresa Urbina (Venezuela)
- Dr. Roberto Coco (Argentina)
- Dra. Catherine Staessen (Bélgica)

Traduzido para o português por:

- Sra. Marina Diaz (Brasil)

Corrigido por:

- Dra. Ana Lúcia Mauri (Brasil)
- Dra. M. Soledad Sepúlveda J. (Chile)

Abril, 2006





EDITORIAL

O Manual de Laboratório em sua nova edição procura manter as características da versão anterior, ou seja, continuar padronizando os procedimentos laboratoriais de Reprodução Assistida na América Latina, segundo a opinião dos seus embriologistas clínicos. Além disso, o Manual servirá como modelo para aqueles centros que desejarem participar da REDE e que gostariam de adaptar seu laboratório segundo as normas de acreditação de nossa instituição.

A Diretoria da REDE agradece a participação de todos os embriologistas clínicos que participaram na elaboração deste manual, especialmente à Dra. Claudia Borrero, quem iniciou este projeto.

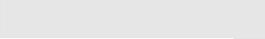
A edição em espanhol e agora também em português facilita a propagação das informações e respeita a individualidade idiomática dos diferentes países que compõem a REDE.

Finalmente, meus votos de sucesso para essa nova realização da REDE.

Prof. Dr. J.G. Franco Junior

Diretor Executivo

Red Latinoamericana de Reproducción Asistida





ÍNDICE

.....

11

INTRODUÇÃO:

1. Maturação meiótica do oócito.
2. Fecundação em mamíferos.
3. Desenvolvimento preimplantacional.

12

14

CAPÍTULO I:

PREPARAÇÃO DE UM LABORATÓRIO PARA REPRODUÇÃO ASSISTIDA

15

1. Recomendações para a construção de um Laboratório de Reprodução Assistida.

17

2. Normas de trabalho para o Laboratório de Reprodução Assistida.

18

3. Normas de higienização dos profissionais que participam do procedimento de Reprodução Assistida.

20

4. Acondicionamento físico de um Laboratório de Reprodução Assistida quando se trabalha em ciclos.

21

5. Rotinas diárias de verificação em um Laboratório de Reprodução Assistida.

21

6. Outras normas de trabalho.

23

7. Certificação de equipamentos.

27

8. Controles biológicos.

CAPÍTULO 2:

PROCEDIMENTOS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA

29

1. Tipos de procedimentos.

30

2. Meios de cultura.

36

3. Métodos de preparação e seleção de espermatozóides.

41

4. Recepção de oócitos durante a aspiração folicular.

42

5. Classificação da maturação somática do complexo cúmulo-corona-oócito.



ÍNDICE

.....

- 43** 6. Inseminação.
- 45** 7. Avaliação da fecundação.
- 46** 8. Desenvolvimento preimplantacional *in vitro*.
- 47** 9. Avaliação do desenvolvimento embrionário.
- 49** 10. Transferência de embriões.

CAPÍTULO 3:

FECUNDAÇÃO ASSISTIDA : INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZÓIDES (ICSI)

- 51** 1. Preparo dos oócitos para ICSI: tratamento com hialuronidase.
- 55** 2. Realização da técnica de ICSI.
- 57** 3. Processamento das amostras de espermatozóides segundo sua classificação.
- 60** 4. Punção de epidídimo.
- 60** 5. Biópsia testicular.
- 61** 6. Protocolos acessórios.

CAPÍTULO 4:

CRIOPRESERVAÇÃO DE GAMETAS, ZIGOTOS E EMBRIÕES.

- 66** 1. Criopreservação de espermatozóides.
- 68** 2. Criopreservação de oócitos.
- 75** 3. Criopreservação de zigotos e embriões.
- 83** 4. Tópicos para melhorar a taxa de sobrevivência dos embriões.
- 84** 5. Manutenção dos equipamentos e problemas mais frequentes.
- 88** 6. Vitrificação e descongelamento de oócitos, zigotos e embriões: uma alternativa à criopreservação convencional.



ÍNDICE

.....

CAPÍTULO 5:

CULTURA E CRIOPRESERVAÇÃO DE BLASTOCISTOS.

- 104** 1. Cultura de blastocistos em meios seqüenciais.
- 106** 2. Congelamento lento de blastocistos.
- 107** 3. Vitrificação de blastocistos com o sistema de hemi-palhetas.

CAPÍTULO 6:

DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL (PGD)

- 112** 1. Quem poderia participar de um PGD?
- 112** 2. As principais vantagens do PGD.
- 113** 3. Como é realizado o PGD?
- 114** 4. Como é realizada a biópsia?
- 115** 5. O PGD é seguro?
- 116** 6. Requisitos para a realização do PGD.
- 118** 7. Considerações especiais.
- 120** 8. Equipamentos e materiais.
- 121** 9. Realização da técnica de PGD/PGS.
- 126** 10. Procedimento para realizar FISH em duas etapas.





INTRODUÇÃO

.....

1. MATURAÇÃO MEIÓTICA DO OÓCITO HUMANO

.....

Nos mamíferos, os oócitos permanecem detidos na prófase da primeira divisão meiótica até que a fêmea experimente a maturidade sexual. Com o estímulo hormonal apropriado, o oócito adquire gradualmente a competência para entrar na etapa final da primeira divisão meiótica, à medida que aumenta de tamanho durante a maturação folicular. A estimulação pelo hormônio luteinizante (LH) ocasiona a maturação nuclear do oócito, o qual experimenta a ruptura da vesícula germinativa. Os cromossomos agrupam-se no primeiro fuso meiótico e ocorre a primeira divisão meiótica: um grupo de cromossomos homólogos envolto por uma pequena quantidade de citoplasma é extruído como primeiro corpúsculo polar. Neste estado, cada cromossomo está composto por cromátides irmãs que não se separam até a anáfase da segunda divisão meiótica (figura 1).

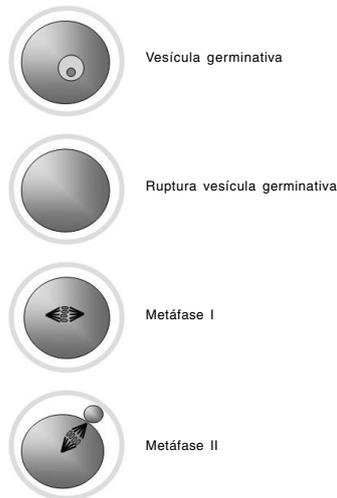


Figura 1: Meiose no Oócito

A meiose II prossegue e o oócito entra em parada de divisão, com os cromossomos alinhados na placa equatorial do segundo fuso meiótico. Neste estado, o oócito é liberado do folículo e ocorre a ovulação, em resposta ao pico de LH.

2. FECUNDAÇÃO EM MAMÍFEROS

A fecundação de um oócito compreende uma série de eventos que ocorrem em uma ordem cronológica e que levam à incorporação do material genético do espermatozóide no citoplasma do oócito, dando origem à formação de um zigoto.

Durante a trajetória pelo trato genital até as trompas de Falópio, o espermatozóide capacita-se, ou seja, ocorrem mudanças fisiológicas e estruturais que permitem a hiperativação, seguida pela reação acrossômica. A cabeça do espermatozóide hiperativado une-se à zona pelúcida do oócito (união primária), mediante a interação de resíduos carboidratos de um componente da zona pelúcida ZP3 com moléculas na superfície do espermatozóide. Esta união provoca a reação acrossômica, na qual ocorre a fusão da membrana acrossomal externa com a membrana plasmática do espermatozóide, liberando o conteúdo acrossomal, cujo componente principal é a serina protease, acrosina.

A união primária progride para união secundária que corresponde a uma interação espécie-específica entre outro componente da zona pelúcida ZP2 e acrosina. Mediante a ação proteásica da acrosina, o espermatozóide solta-se e volta a interagir com a zona pelúcida, penetrando-a depois de ciclos alternados de união e lise. O espermatozóide alcança assim o espaço perivitelínico, entra em contato com a membrana plasmática do oócito e a cauda pára de bater. A membrana plasmática pós-acrossomal une-se com a membrana plasmática do oócito, incorporando-se o espermatozóide ao citoplasma.

A fecundação induz a reação cortical no oócito, que por sua vez provoca uma reação da zona pelúcida. A reação cortical consiste na liberação do conteúdo enzimático dos grânulos corticais por fusão da membrana plasmática do oócito com a membrana dos grânulos. A difusão deste conteúdo, através da zona pelúcida, provoca alterações estruturais que impedem a união de novos espermatozóides.

A fecundação ativa o oócito que encontrava-se parado na metafase da segunda divisão meiótica (figura 2a e b).

Esta divisão se completa, eliminando-se o segundo corpúsculo polar (figura 2c). O material genético haplóide do oócito e do espermatozóide são envolvidos por membrana nuclear, constituindo os pronúcleos feminino e masculino, que migram até o centro da célula (figura 2c e d). Durante esta migração ocorre a duplicação do DNA. As membranas dos pronúcleos rompem-se (singamia) e os cromossomos se agrupam no fuso mitótico (figura 2e), para dar lugar à primeira clivagem do novo indivíduo (figura 2f).

A Fecundação

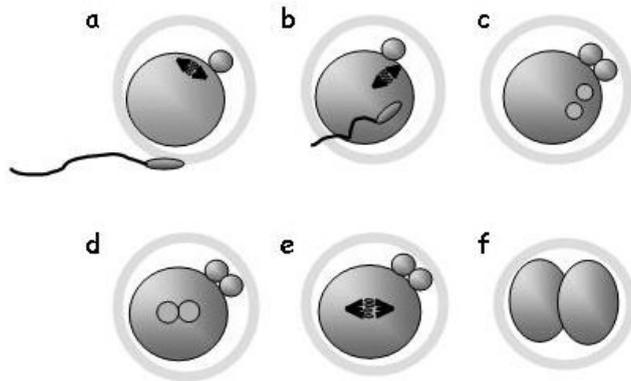


Figura 2: Fecundação em Mamíferos

3. DESENVOLVIMENTO PREIMPLANTACIONAL

Define-se como desenvolvimento preimplantacional o período compreendido entre a formação do zigoto e a implantação do blastocisto no endométrio (figura 3). No ser humano, dura entre 6 e 7 dias, durante os quais migra desde a porção ampolar da trompa até o útero. Durante este período, o *conceptus* passa por uma série de divisões celulares sem apresentar crescimento e, finalmente, forma-se o blastocisto, que contém um grupo de células que dará origem ao embrião denominado massa celular interna (mci) e o primeiro tecido diferenciado, o trofoblasto, que envolve a mci.

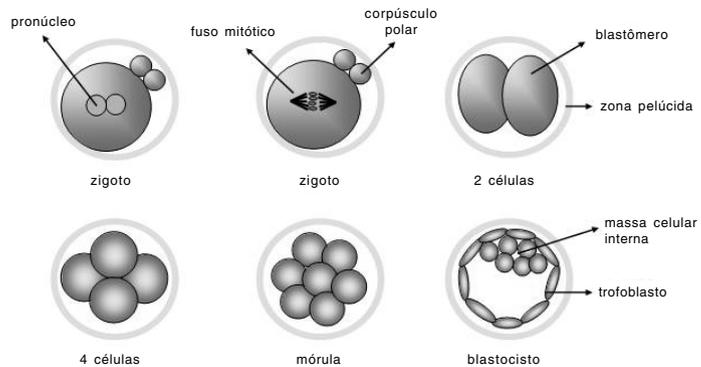


Figura 3: Desenvolvimento Preimplantacional



Capítulo 1: Preparação de um Laboratório para Reprodução Assistida

1. RECOMENDAÇÕES PARA A CONSTRUÇÃO DE UM LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA.

O laboratório de Reprodução Assistida deve estar localizado em uma área independente do espaço geral, cujo acesso deve ser restrito somente às pessoas e materiais necessários para cada procedimento. Deve ter um tamanho adequado ao número de procedimentos a serem realizados. Deve estar localizado ao lado da sala de procedimentos cirúrgicos onde se realiza a aspiração folicular, de preferência com uma janela de comunicação *pass-through*.

O laboratório deve ser construído com material resistente e de fácil limpeza. A divisão das salas pode ser de alvenaria ou laminados. O piso, revestido de vinil cirúrgico ou monolítico (poliuretano ou epóxi), com bordas arredondadas, com o objetivo de não acumular partículas e facilitar sua limpeza. Deve-se dar atenção especial à união do piso com a parede, recomendando-se a forma arredondada para evitar orifícios que possam acumular partículas.

As paredes devem ser pintadas com pintura atóxica, sem odor, não porosa e não pegajosa para não aderir sujeira; não deve exalar vapor e deve ser de fácil limpeza (por exemplo, tinta epóxi à base de água).

A iluminação deve ser feita com lâmpada incandescente amarela com ajuste de dimer, para graduar a intensidade.

As mesas de trabalho devem ser lisas e impermeáveis para diminuir o acúmulo de partículas. Recomenda-se aço inoxidável.

O laboratório deve contar com um gerador de corrente elétrica para todos seus equipamentos, em caso de corte de energia. Além disso, recomenda-se o uso de UPS para evitar a demora que às vezes ocorre no reestabelecimento da corrente, o que pode ser grave em alguns equipamentos que se desprogramam, como, por exemplo, as máquinas de congelamento.

A qualidade do ar em um laboratório é um fator importante, pois há evidências que mostram que o uso de filtros favorece o desenvolvimento embrionário. Por isso, deve existir um sistema de pressão positiva, com troca de ar pelo menos 12 vezes por hora, com filtros HEPA e de carvão ativado. O filtro HEPA é empregado para evitar a entrada de partículas e o de carvão ativado é empregado para a retenção de substâncias voláteis (VOC's), provenientes do exterior ou do interior do laboratório, incluindo chaminés, veículos, combustíveis, ceras, materiais plásticos, álcoois, materiais de limpeza, ar condicionado, etc.

ÁREAS DE TRABALHO EM UM CENTRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA:

- **Vestiário:** deve estar localizado antes da entrada do laboratório e sala de procedimentos cirúrgicos.
- **Área de escovação:** deve possuir uma torneira especial que se ativa sem a utilização das mãos. O mesmo deve ocorrer para a obtenção do líquido de limpeza.
- **Sala de procedimentos cirúrgicos:** deve estar próximo ou ao lado do Laboratório de Embriologia. Destina-se à aspiração folicular transvaginal e à transferência de embriões, realização de PESA, BITE e TESA para obtenção de espermatozoides, nos casos de azoospermia.
- **Laboratório de Embriologia:** nele encontram-se os equipamentos necessários para a realização dos procedimentos de Reprodução Assistida. Deve estar próximo ou ao lado da sala de procedimentos cirúrgicos. Deve possuir gerador de corrente elétrica para todos seus equipamentos para casos de emergência.
- **Laboratório de Andrologia:** área separada do Laboratório de Embriologia, destinada à manipulação em condições assépticas das amostras de sêmen.
- **Sala de criopreservação:** área separada do Laboratório de Embriologia, destinada à realização dos procedimentos de criopreservação e ao armazenamento de amostras biológicas em tanques de nitrogênio líquido. Esta área deve possuir boa ventilação, pois durante o processo de congelamento há liberação de nitrogênio, o qual reage com o oxigênio do meio ambiente, consumindo-o.

Deve possuir um tanque de nitrogênio líquido que não contenha amostras biológicas para utilizá-lo de reserva para o caso de uma descarga inesperada.

- **Depósito de materiais:** área reservada para o armazenamento de materiais descartáveis. Deve entrar no Laboratório de Embriologia somente o necessário para a utilização, não devendo haver armazenamentos.

2. NORMAS DE TRABALHO PARA O LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA

MANUAL DE PROCEDIMENTOS

Todos os procedimentos e normas a seguir em um Laboratório de Reprodução Assistida devem estar claramente detalhadas em um manual de procedimentos, o qual deve ser constantemente revisado e atualizado. Todas as pessoas que trabalham no lugar devem ter conhecimento do conteúdo deste manual.

Deve-se também possuir um livro de registro de Controle de Qualidade de todos os ensaios que se realizam, de acordo com as seguintes normas:

REGRAS DE CONTROLE DE QUALIDADE:

- Toda observação e controle dos sistemas de laboratório devem ser registrados em um caderno de Controle de Qualidade. Se não estiver registrado, não há como comprovar a realização.
- Qualquer dado registrado somente tem valor se forem estabelecidos os valores de tolerância.
- Os valores de tolerância têm significado somente se estão escritas as instruções de como proceder caso os limites tenham sido excedidos (“ações corretivas”).
- As ações corretivas têm significado somente se tiverem sido registradas.

3. NORMAS DE HIGIENIZAÇÃO DOS PROFISSIONAIS QUE PARTICIPAM DO PROCEDIMENTO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA

LIMPEZA CIRÚRGICA DAS MÃOS E INDUMENTÁRIA

O objetivo é limpar a pele das mãos e antebraços de microorganismos, gordura e outras matérias orgânicas, antes de iniciar algum procedimento ou manipulação. Este procedimento elimina a flora microbiana transitória e diminui a flora microbiana normal da pele. O propósito definitivo é prevenir a disseminação de microorganismos pelas mãos, evitando a contaminação microbiana durante a manipulação do material biológico. Por outro lado, o uso de luvas tem duplo sentido: proteger o operador da transmissão de patógenos contidos em líquidos orgânicos ou tecidos e reforçar a barreira de controle contra a contaminação pelas mãos. Finalmente, o uso de máscara evita a transmissão de microorganismos infecciosos que se propagam através do ar e aqueles cujas fontes de entrada ou saída podem ocorrer pelo trato respiratório.

MATERIAIS

- Solução de clorexidina a 4%.
- Toalha ou compressas estéreis.
- Luvas de látex estéreis, sem talco.
- Máscara descartável.

PROCEDIMENTO

Antes de um procedimento de Reprodução Assistida, as pessoas que entrarão no laboratório devem vestir-se de acordo com as normas estabelecidas para um recinto cirúrgico. Lavar as mãos e os antebraços com água e solução de clorexidina a 4 %, esfregando-os por alguns minutos até obter bastante espuma, com ênfase nos espaços interdigitais e palmas. A lavagem deve se prolongar por no mínimo 3 minutos.

- Enxagüar com água corrente, desde as mãos até os cotovelos.
- Fechar a torneira com os cotovelos.
- Secar primeiro as mãos e depois os antebraços com toalha individual estéril.

USO DE LUVAS ESTÉREIS

- Abrir o pacote de luvas antes da lavagem das mãos (ou um auxiliar oferece as luvas). Vestir a primeira luva pela parte que estará em contato direto com sua pele. Vestir a segunda luva com a mão enluvada, pegando-a por sua face externa e introduzi-la. As luvas não devem conter talco, pois é tóxico para os gametas e embriões.

USO DE MÁSCARA

- Antes de lavar as mãos, colocar a máscara cobrindo o nariz e a boca, depois amarrá-la segurando somente as tiras.
- Ajustá-la à altura do nariz para deixá-la cômoda e segura.
- Lavar as mãos.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

- As pessoas devem manter as unhas curtas, limpas e sem esmalte.
- Não devem usar jóias.
- As mangas devem estar acima dos cotovelos.
- Com o objetivo de não contaminar as mãos, não se deve tocar a máscara, nem deixá-la cair no pescoço após tê-la colocado.
- O mal uso da máscara e o uso de máscaras inadequadas aumenta a possibilidade de transmissão de microorganismos e dá uma falsa impressão de segurança.
- O uso de luvas não substitui a lavagem das mãos.
- As luvas não devem conter talco em pó, elas devem ser enxaguadas com água estéril e secadas com compressa estéril.
- As pessoas que participam dos procedimentos não devem utilizar perfumes, laquê nem qualquer outra substância volátil.
- Recomenda-se marcar os tubos e placas com lápis diamante para evitar o álcool expelido por marcadores indelévelis.

4. ACONDICIONAMENTO FÍSICO DE UM LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA QUANDO SE TRABALHA EM CICLOS

LIMPEZA DO LABORATÓRIO

Objetivo: Diminuir ao máximo a carga contaminante (vírus, bactérias, fungos, partículas em suspensão, fontes orgânicas, etc) do ambiente do laboratório, antes, durante e depois de cada procedimento de Reprodução Assistida.

MATERIAIS

- Solução para remoção de resíduos orgânicos. Utiliza-se qualquer amina quaternária ou sabão biológico.
- Água e panos limpos.

PROCEDIMENTO

i) Antes do procedimento de FIV

No mínimo uma semana antes do início de um ciclo de fertilização *in vitro* deve-se efetuar uma limpeza terminal do laboratório de FIV, que consiste em limpar completamente pisos, paredes e teto do laboratório.

Molhar um pano limpo com solução de amina quaternária ou sabão biológico e aplicar por todas as superfícies (para remover matérias orgânicas).

ii) Durante o procedimento de FIV

Deve-se realizar uma limpeza periódica somente com água sobre os pisos. Sob nenhuma circunstância deve-se utilizar soluções de detergentes, cloro ou desinfetantes durante o procedimento de fertilização *in vitro*, pois são altamente nocivos para os gametas e embriões.

iii) Depois do procedimento de FIV

Uma vez finalizado o ciclo de FIV, repetir a limpeza terminal do laboratório.

5. ROTINAS DIÁRIAS DE VERIFICAÇÃO DE UM LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA.

- Análise da história clínica e de laboratório se houveram procedimentos prévios, dos casos que se planeja realizar, para definir a conduta a seguir.
- Registro dos lotes e data de vencimento de todos os materiais, reativos e meios de cultura empregados durante os procedimentos.
- Verificação da identidade dos pacientes antes da aspiração folicular, da coleta de sêmen, da inseminação e da transferência dos embriões. Todas estas etapas devem ser realizadas com uma testemunha, cujo nome também deverá ser registrado na ficha de procedimento.
- Identificar todos os materiais a ser utilizado em um procedimento (frasco de coleta, tubos, placas, etc.) de modo homogêneo e relacionada com a ficha clínica da paciente.
- Verificar e registrar os níveis de CO₂ e temperatura das incubadoras, externa e internamente.
- Verificar a temperatura de todas as platinas de aquecimento.
- Verificar, duas vezes por semana, os níveis de nitrogênio líquido dos tanques de armazenamento e do tanque reserva mantido para uma emergência.
- Limpeza das mesas de trabalho, câmara de fluxo laminar e equipamentos de purificação de água.
- Eliminar os materiais contaminados de acordo com as normas locais.

6. OUTRAS NORMAS DE TRABALHO

Não portar documentos ou artigos de uso pessoal (lápis, relógios, jóias, etc).

Toda alteração de material para os procedimentos de Reprodução Assistida deve ser controlada, previamente, pelo responsável do laboratório.

Proceder a limpeza cirúrgica de mãos e braços (segundo procedimentos) ao abrir o laboratório e antes de realizar qualquer operação, evitando o contato posterior com materiais ou instrumentos não esterilizados.

Ativar a câmara de fluxo laminar e ligar as platinas de aquecimento (ajustadas em 37°C). Recomenda-se não desligá-las durante todo o procedimento.

Utilizar compressas estéreis e álcool a 70% na limpeza das superfícies de trabalho e na câmara de fluxo laminar, somente se não houverem embriões nas incubadoras. Caso contrário, deve-se utilizar somente água.

Ao término do dia, pode-se utilizar álcool a 70% para limpeza sobre as áreas de trabalho e imediatamente secar a superfície comprometida com uma compressa estéril. Finalmente, deve-se colocar essa compressa fora do laboratório para evitar a entrada de álcool no ambiente das incubadoras.

A platina de aquecimento é o centro da atividade de cada operação que se realiza na câmara de fluxo laminar, por este motivo, recomenda-se depositar somente material estéril na superfície e evitar apoiar mãos ou braços sobre o lugar.

A câmara de fluxo laminar deve ser ligada pelo menos 20 minutos antes de qualquer operação ou manipulação neste ambiente e recomenda-se mantê-la ligada durante todo o procedimento.

Antes e durante a manipulação dos gametas ou embriões, tomar cuidado para não interromper o fluxo laminar. Preocupar-se, a todo momento, em não bloquear o fluxo laminar por interferência de objetos dispostos no ambiente de trabalho. Estes mesmos cuidados devem ser tomados durante a manipulação do próprio material biológico. Trabalhar o tempo todo no centro da câmara de fluxo laminar, pois nesta zona o fluxo é efetivamente horizontal e livre de partículas ambientais.

O laboratório de embriologia sempre deve dispor de compressas estéreis, água estéril, peróxido de hidrogênio e álcool a 70% para limpar superfícies onde se tenha derramado líquidos orgânicos, tais como: fluído folicular, sangue, soro, meio de cultura, etc. Nestes casos, deve-se aplicar primeiro água para remover componentes orgânicos e depois H_2O_2 na zona afetada; em seguida, limpar com compressa estéril e finalmente, com álcool e novamente com compressa estéril. Não aplicar soluções de álcool sobre componentes orgânicos antes de utilizar água, pois o álcool fixa os componentes orgânicos na superfície.

Deve-se ter cuidado durante a abertura e manipulação do material estéril; este encontra-se esterilizado por radiação e sua duração é indefinida, a menos que o envólucro plástico esteja violado ou aberto em um ambiente carente de fluxo laminar e/ou pressão positiva ou que a data de validade tenha vencido.

O instrumento ou material esterilizado por autoclave tem duração definida e sua data de vencimento deve estar convenientemente rotulada. Certificar que o material não está vencido quanto à sua condição de esterilidade antes de seu uso.

7. CERTIFICAÇÃO DE EQUIPAMENTOS

CÂMARA DE FLUXO LAMINAR

O programa de manutenção dos equipamentos de fluxo laminar inclui:

- a) **Substituição semestral de Pré-Filtros.** Com isto, evita-se a saturação dos filtros absolutos e assegura-se um correto e seguro funcionamento do sistema.
- b) **Calibração anual do fluxo laminar.** Avalia-se a qualidade do fluxo laminar e a quantidade de partículas em suspensão contidas.
- c) **Certificação anual tipo D.O.P. a filtros absolutos.** A finalidade desta prova é determinar a qualidade de ar que o sistema está proporcionando. Examina as velocidades máximas e mínimas permitidas para assegurar um adequado fluxo laminar. Permite detectar fugas e/ou deterioração no filtro absoluto. A prova tipo D.O.P. inclui a calibração do equipamento mediante a detecção de índices de penetração utilizando partículas padrões em tamanho.
- d) **Revisão anual de selos de câmaras e vedadores de goma de filtros absolutos** (com o tempo podem ceder e gerar escapes no sistema).

Considerações Gerais:

- a) Não expor o equipamento de fluxo laminar a correntes de ar.
- b) Limpeza constante do equipamento, evitando o uso de soluções de hipoclorito de sódio, detergentes e/ou álcool concentrado.

EQUIPAMENTOS ÓTICOS E ACESSÓRIOS

Lupas Estereoscópicas, Microscópios Convencionais e Invertidos. Ao considerar este tipo de equipamentos, três aspectos devem ser observados:

- a) Elementos Óticos,
- b) Elementos Mecânicos e Pinturas de Revestimento,
- c) Acessórios tais como Equipamentos de Obtenção de Imagens e Microinjeção.

i) Elementos Óticos.

Os componentes óticos de uso mais freqüente, e que os usuários manipulam diretamente, são as lentes objetivas e oculares. Para os primeiros, a manutenção dependerá do grau de uso do equipamento. Considerando-se um Laboratório de Reprodução Assistida, cujas condições são as de um pavilhão cirúrgico e onde dois ou três usuários regulares manipulam os equipamentos com uma média de 3 ou mais horas por dia, sob estas condições, deve-se realizar uma rotina de limpeza das lentes objetivas de forma semanal com papel lente. Deve-se empregar papel especial somente para limpeza dos cristais. É importante não empregar elementos corrosivos que possam danificá-las irreversivelmente.

No caso de uma maior freqüência de uso, deve-se realizar limpeza a cada três dias ou menos, mas tudo dependerá do número de amostras analisadas diariamente e da limpeza geral do laboratório. É possível operar os equipamentos sem problemas por semanas, sem requerer uma limpeza profunda.

Por último, é conveniente realizar uma manutenção preventiva geral das partes óticas com serviço técnico do representante oficial a cada 6 meses pelo menos ou no mínimo uma vez por ano, para assegurar um ótimo rendimento. Nesta manutenção, considera-se desarme parcial do equipamento, com limpeza interna de oculares, limpeza e aspiração dos tubos binoculares do revólver, adaptadores de vídeo, etc.

ii) Elementos Mecânicos e Pinturas de Revestimento.

Em geral, considera-se que para os elementos mecânicos o usuário só pode fazer serviço de limpeza externa sem interferir em dispositivos mecânicos internos, já que isto pode ocasionar alguma falha de operação. Deve-se considerar que todos os componentes mecânicos chegam com calibrações de fábrica estritas, que por motivo algum devem ser modificadas ou alteradas. Quanto à limpeza, só devem ser empregados detergentes suaves não corrosivos, aplicando-os com panos suaves e limpos. Por outro lado, as pinturas de revestimento têm por objetivo evitar a corrosão por ação de agentes químicos, razão pela qual deve-se utilizar somente detergentes suaves não corrosivos. Quando ocorrerem manchas aderidas, nunca se deve raspar, pois pode remover parte da pintura e assim favorecer o ataque ao metal interno do equipamento.

iii) Acessórios

a) Equipamentos de obtenção de imagens.

Acessórios como câmaras de vídeo, monitores, etc.: para cada marca existirão regras individuais que devem ser seguidas de forma precisa, especialmente os tópicos de ajustes de sensibilidade de câmaras e monitores. Nestes casos, é conveniente revisar detalhadamente os manuais de funcionamento e consultar o representante autorizado, antes de modificar os parâmetros de operação, especialmente os internos. Considera-se que os equipamentos devem operar sem problemas durante muito tempo, salvo se o manual indicar algum tempo definido para a substituição de algum componente, especificamente.

b) Equipamentos de microinjeção.

Os acessórios para micromanipulação geralmente incluem um conjunto básico de controladores grossos e finos, que podem ser manuais ou automáticos (a maioria com sistemas hidráulicos), injetores de 4ml e 10 ml e, em alguns casos, injetores automáticos. Todos estes componentes estão desenhados para operação em forma indefinida e só requerem manutenção no que se refere à limpeza externa das diferentes unidades. Se o usuário detecta problemas de operação, como: fugas ou vazamentos do sistema hidráulico, desajustes de operação ou outros, deverá dirigir-se à fábrica ou serviço técnico autorizado para uma adequada calibração das diferentes unidades, especialmente quando se trata de micromanipuladores grossos e finos. Em caso de problemas maiores, o equipamento deve retornar à fábrica para substituição ou calibração. Nunca se deve tentar desarmar ou modificar a calibração original.

INCUBADORAS DE CO₂

i) Controle de Temperatura e Nível de CO₂

Deve-se realizar um controle diário tanto da temperatura quanto do nível de CO₂ da incubadora. Para um controle adequado destes parâmetros, deve-se registrar diariamente a informação, não empregando como guia os parâmetros de temperatura e CO₂ proporcionados pelo equipamento, a menos que estes tenham sido previamente calibrados. Para calibrar a temperatura da incubadora, é necessário um termômetro de precisão ($\pm 0.1^{\circ}\text{C}$) certificado, que deve ser instalado no interior da câmara de incubação. Este termômetro não deve ser de mercúrio devido ao risco de que ele se quebre dentro da incubadora.

A informação observada neste termômetro deve ser empregada para calibrar o sensor de temperatura da própria incubadora. O nível de CO₂ deve ser controlado com um instrumento capaz de medir a tensão do gás dentro da câmara de incubação da incubadora. Isto permite quantificar a porcentagem de CO₂ contida na incubadora e assim calibrar o que o equipamento registra. Estes passos de controle e calibração devem ser feitos com o equipamento equilibrado e antes de ter realizado qualquer operação ou abertura do equipamento.

ii) Limpeza Interna

A higienização da incubadora deve ser realizada mensalmente. Para este procedimento, é preciso desencaixar o interior da câmara de incubação retirando as bandejas, paredes e recipiente de água. As peças devem ser lavadas com água ultra-pura e sabão neutro (Rocall, 7X, Extram MA-01), compressas estéreis. Cada um destes componentes deve ser esterilizado por autoclave a 134°C antes de sua reposição. Por outro lado, a câmara interna deve ser higienizada incubando com uma solução saturada de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) durante 20 minutos (isto gera um ambiente alcalino que permite a eliminação seletiva de bactérias e fungos), em seguida com álcool a 70% aplicado com compressas estéreis. Finalmente, procede-se a higienização da câmara de incubação e a reposição do recipiente com água destilada estéril. Todos estes passos devem ser realizados com a incubadora ligada, mantendo interrompido o fornecimento de CO₂. Uma vez que a incubadora tenha sido higienizada, recomenda-se substituir semanalmente a água e seu recipiente. Também é aconselhável substituir semanalmente as bandejas por outras estéreis.

iii) Calibração e Substituição de Componentes da Incubadora.

Deve-se substituir anualmente o kit de descontaminação, embalagem e pás do ventilador, sensor e filtro bacteriológico de CO₂. Também, anualmente, deve-se realizar uma limpeza dos circuitos eletrônicos e compartimentos acumuladores de pó e calibração dos circuitos eletrônicos (voltagem da fonte de poder, circuitos de controle, etc.). Da mesma forma, deve-se calibrar a temperatura e CO₂ da câmara interna da incubadora, como se detalhou no primeiro ponto desta seção. É importante salientar que a calibração e substituição de componentes deve ser efetuada por um técnico qualificado ou por operadores experientes.

Por outro lado, o ventilador de homogeneização do CO₂ funciona continuamente e, portanto, está exposto a desgaste, razão pela qual recomenda-se sua substituição trimestral. Além disso, se o laboratório possui 2 ou mais incubadoras, é necessário possuir um ventilador de reposição para cada modelo.

8. CONTROLES BIOLÓGICOS

A. CULTURA PARA FUNGOS

i) Controle do laboratório e equipamentos:

As incubadoras e o lugar onde se realizam os procedimentos devem ser controlados bacteriologicamente para fungos, realizando culturas em placas de Agar - Saubureaud. As placas devem ser dispostas de maneira estéril dentro das incubadoras e lugares a serem controlados, como: câmaras de fluxo laminar, mesas de trabalho, etc.

ii) Controle dos meios de cultura:

Realiza-se este controle com o meio de cultura onde foram inseminados os oócitos e deixados na incubadora por 5 ou 6 dias. A frequência vai depender da forma de trabalho, quer dizer, em série ou de forma contínua, da quantidade de pacientes e dos resultados.

B. CULTURA PARA BACTÉRIAS

i) Controle do laboratório e equipamentos:

As culturas para bactérias se realizam em placas de Agar - Sangue (Gram + e -) e Agar - McConkey. Assim são controladas as bactérias das incubadoras, a água do recipiente, com o mesmo protocolo descrito para fungos.

ii) Controle dos meios de cultura:

Se não foram comprados em empresas confiáveis, os meios de cultura devem ser preparados com água estéril isenta de pirogênios. Recomenda-se analisar a água para endotoxinas Test LAL 0.03. Depois de preparado, o meio de cultura deve ser esterilizado por filtração em membrana de poro de 0.22 μm e ser controlado bacteriologicamente.

C. CONTROLE DE QUALIDADE DOS MEIOS DE CULTURA

i) Sobrevida Espermática

Entende-se por sobrevida espermática a porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva depois de um longo período de incubação (18 - 20 hs). Para a realização da sobrevida espermática, os espermatozoides deverão ser capacitados por técnicas de separação espermática e incubados nos diferentes meios a serem provados. Um bom meio de cultura deve ser capaz de manter, pelo menos, 60% dos espermatozoides com motilidade progressiva ao final do tempo de incubação.

ii) Desenvolvimento de embrião de camundongo

Para este controle, utilizam-se embriões de camundongo de 2 células, os quais são cultivados em meio de cultura suplementados com soro e previamente estabilizado na incubadora a 37°C e 5% de CO₂.

Observa-se diariamente o desenvolvimento embrionário e às 72 horas calcula-se a porcentagem de blastulação, o qual não pode ser menor de 80%.

Este controle biológico deve ser utilizado cada vez que se prepara um novo lote de meio de cultura e quando se compram meios prontos; apesar de que estes vêm com esta prova realizada, mas é necessário assegurar-se de que não houveram problemas em seu transporte.



Capítulo 2: Procedimentos de Reprodução Assistida

1. TIPOS DE PROCEDIMENTOS

A. FERTILIZAÇÃO IN VITRO COM TRANSFERÊNCIA

EMBRIONÁRIA FIV (IVF-ET: *In Vitro Fertilization with Embryo Transfer*)

Neste procedimento, os oócitos recuperados por aspiração folicular são inseminados com espermatozóides separados do líquido seminal por técnicas de separação espermática. Deste modo, o encontro dos gametas e posterior fertilização ocorre fora do organismo materno. Os embriões originados são colocados em um catéter de transferência e depositados no fundo da cavidade uterina.

Uma variação a este procedimento é transferir, via laparoscópica, os embriões em estado de zigoto ou de 4-6 células, na cavidade da trompa de Falópio. A primeira modalidade é conhecida como Transferência de Pronúcleos à Trompa (*PROST*) e a segunda como Transferência de Embriões à Trompa (*TET*).

B. TRANSFERÊNCIA DE GAMETAS À TROMPA DE FALÓPIO

GIFT (*Gametes intra fallopian transfer*)

GIFT é um procedimento no qual a fertilização ocorre na trompa de Falópio. Para isto, por meio de uma intervenção laparoscópica, os gametas são depositados na região ampolar da trompa, com o auxílio de um catéter de transferência. Neste catéter, os oócitos estão separados dos espermatozóides por uma bolha de ar.

Desta maneira, o encontro dos gametas e a fertilização ocorre na trompa, tal como ocorre na fecundação natural. Por este motivo, o desenvolvimento embrionário progride à medida que os embriões são transportados pela trompa até o útero, ocorrendo uma perfeita sincronia entre desenvolvimento embrionário e receptividade endometrial.

C. INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZÓIDE ICSI (*Intra Cytoplasmic Sperm Injection*).

A ICSI é uma técnica de fertilização assistida que consiste na micro-injeção de um único espermatozóide no citoplasma do oócito através de um equipamento composto de microscópio invertido e micromanipuladores. Após a ICSI, os oócitos são mantidos em incubadora de CO₂, onde completa-se a fertilização e inicia-se seu desenvolvimento embrionário, até a transferência ao útero materno. Uma variação a este procedimento é denominado *SOFT* (*sperm oocyte-microinjected fallopian transfer*), no qual o oócito, após ter sido microinjetado, é imediatamente transferido à trompa via laparoscópica, de modo que a fertilização e o desenvolvimento embrionário ocorrem no trato genital materno.

2. MEIOS DE CULTURA

A. FORMULAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

Em Reprodução Assistida, a qualidade do desenvolvimento embrionário e a conseqüente possibilidade de gravidez depende em grande parte da qualidade do meio de cultura que se utiliza.

Atualmente, a maioria dos centros de Reprodução Assistida utiliza meios de cultura preparados por diferentes empresas que comercializam produtos destinados a este propósito. Porém, alguns centros preferem preparar seus próprios meios. Geralmente, estes meios de cultura possuem relativamente poucos componentes, sendo a maioria destes sais inorgânicos, mais um ou dois compostos orgânicos como fontes energéticas, de modo que podem ser facilmente preparados no laboratório.

Há pouco tempo, os meios de cultura foram suplementados com soro humano pré-ovulatório, proveniente da paciente que estava sendo preparada para uma fertilização assistida ou com soro de cordão umbilical. O uso destes soros mostrou bons resultados, mas existe um risco de estarem contaminados com agentes patógenos (vírus da hepatite, HIV, etc) ou conter anticorpos que podem interferir na fertilização e no desenvolvimento embrionário.

Qualquer que seja o soro humano utilizado, eles devem ser inativados por 30 minutos a 1 hora a 56°C. Atualmente, os meios de cultura são suplementados com albumina de soro humano (HSA) ou soro substituto sintético (SSS) preparados comercialmente por empresas especializadas.

Os meios de cultura que podem ser preparados em Laboratório são chamados meios simples. Os mais usados na atualidade são o Human Tubal Fluid (HTF) da Irvine Scientific, e o IVF Medium da Medicult.

B. PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

MATERIAIS

Os materiais necessários para preparar estes meios de cultura são os seguintes:

- Água ultra-pura com uma resistência de 15-18 Ω Ohms, esterilizada em membrana de poro de 0.22 μm e apirogênica (água com estas características pode ser obtida com os sistemas de ultra-purificação de águas como Millipore).
- Proveta ou balão volumétrico aferido a 1 l.
- Osmômetro.
- Balança analítica.
- Agitador magnético.
- Câmara de fluxo laminar.
- Sistema de esterilização por filtro com membrana de poro 0.22 μm .
- Pipetas volumétricas de 5 e 10 ml.
- pHmetro

MEIO HTF (Human Tubal Fluid)

Utiliza-se como meio de inseminação e para o desenvolvimento embrionário até o terceiro dia.

Sua fórmula é a seguinte:

COMPONENTES	mM	g/l
1. NaCl	101.60	5.900
2. KCl	4.70	0.360
3. MgSO ₄	0.20	0.024
4. KH ₂ PO ₄	0.37	0.050
5. CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.04	0.300
6. NaHCO ₃	25.00	2.100
7. Glicose	2.78	0.500
8. Piruvato de Na	0.33	0.036
9. Lactato de Na	21.40	2.400
10. Penicilina-G	100 UI/ml	0.060
11. Estreptomicina-SO ₄	50 mg/ml	0.050
12. Vermelho Fenol		0.005

OSMOLARIDADE 285 ± 5 mOsmol, pH 7,3 - 7,4 (Baixa tensão de CO₂ a 5 %)
Suplementar com 10 – 15% de soro.

MEIO HTF MODIFICADO

O HTF pode ser modificado para ser usado sem tensão de CO₂. Para isto, o NaHCO₃ deve ser diminuído a 4.0 mM , acrescentando-se Hepes 25 mM. Levar a pH 7.3-7.4 com NaOH 1 N. Este meio é utilizado para capacitar os espermatozóides e para manter gametas e embriões em ambiente sem tensão de CO₂.

MEIO DE CULTURA P1 (Preimplantation stage one)

Este meio é uma modificação do HTF. Caracteriza-se por não possuir glicose nem fosfato e estar suplementado com Taurina, Citrato de Sódio e Glutamina.

Sua fórmula é a seguinte:

COMPONENTES	mM	g/l
1. NaCl	101.60	5.933
2. KCl	4.69	0.349
3. MgSO ₄	0.20	0.024
4. CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.04	0.300
5. NaHCO ₃	25.00	2.100
6. Piruvato de Na	0.33	0.036
7. Lactato de Na2H2O	21.40	2.398
8. Taurina	0.05	0.006
9. Citrato de Na	0.51	0.150
10. Glutamina	1.00	10 mg/ml
11. Vermelho Fenol		0.005

P1 é principalmente usado como o primeiro meio de cultura em um sistema de meios sequenciais (P1-Blastocyst Medium). P1 é utilizado para o crescimento embrionário desde o dia 0 até o dia 3.

Este meio de cultura pronto para ser utilizado é comercializado por Irvine Scientific. Um meio de cultura similar ao P1 é o QB-XI-HTF da empresa GIBCO.

MEIO DE EARLE (Earle's Balanced Salts Solution).

É a base para o preparo de IVF Medium y Flushing Medium, comercializados por Medicult.

Sua fórmula é a seguinte:

COMPONENTES	mM	g/l
1. CaCl ₂ .2H ₂ O	1.80	0.265
2. MgSO ₄ (Anidro)	0.80	0.097
3. KCl	5.30	0.400
4. NaCl	116.00	6.800
5. NaH ₂ PO ₄ (Anidro)	0.90	0.122
6. Glicose	5.5	1.000
7 Vermelho Fenol		0.005

Este meio é comercializado por SIGMA (Cat. E-6132) e é apresentado em frasco de 8.7 gramas, devendo ser diluído em 1 l de água ultra-pura.

MEIOS "IVF Medium" e "Flushing Medium"

COMPONENTES	IVF MEDIUM g/l	FLUSHING MEDIUM g/l
1. EBSS	1 frasco para 1 l	1 frasco para 1 l
2. Piruvato de Na	0.088	0.088
3. Soro (*SSS)	10%	7 10%
4. Hepes (25mM)	---	6.5
5. NaHCO ₃	2.200	0.336
6. Albumina do Soro (HAS)	0.1% (1mg/ml)	1% (10 mg/ml)
7. Penicilina-G	0.060	0.060
8. Estreptomina-SO ₄	0.50	0.050

Levar a pH 7.4 com NaOH 1 N.

IVF Medium é utilizado como meio de cultura para inseminação e desenvolvimento embrionário até o terceiro dia.

Flushing Medium é utilizado como meio para espermatozoides e embriões em ambientes sem tensão de CO₂.

FÓRMULA PARA AJUSTAR A OSMOLARIDADE:

$$\frac{\text{Osmolaridade Observada} - \text{Osmolaridade Desejada}}{\text{Osmolaridade Observada}} \times \text{Volume de meio preparado}$$

Medir a osmolaridade do meio recém preparado (Osmolaridade Observada), diminuir a Osmolaridade Desejada (por exemplo: 280), dividir o resultado pela Osmolaridade Observada e multiplicar pelo Volume, em ml, do meio preparado (por exemplo: 1000 ml). O resultado obtido é a quantidade de meio que deve ser retirado do meio preparado, substituí-lo por igual quantidade de água ultra-pura. Voltar a medir a osmolaridade para comprovar a osmolaridade alcançada. Finalmente, o meio deve ser suplementado com soro a uma concentração de acordo com o procedimento no qual será usado, em seguida, esterilizar por filtragem em membrana de 0.22 µm.

Os meios compostos também podem ser utilizados sem tensão de CO_2 a 5%. Para isto, deve-se usar Hepes e NaHCO_3 nas mesmas concentrações indicadas na preparação dos meios simples.

C. PREPARAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PARA AS DIFERENTES ETAPAS DE UM PROCEDIMENTO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA

1. MEIO PARA CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA
Meio de Cultura (tamponado com Hepes) suplementado com soro sintético substituto (SSS).
2. MEIO DE ASPIRAÇÃO FOLICULAR
Buffer Dulbecco suplementado com antibióticos (Penicilina-G, 60 mg/ml, - S, 50 mg/ml) e Heparina 30 UI/ml. Este meio deve estar com pH 7.4 e com uma osmolaridade igual a $280 + 5m$ Osmol. Não é necessário suplementar com SSS. Atualmente, recomenda-se utilizar meio HTF modificado para as lavagens durante a aspiração folicular.
3. MEIO DE INSEMINAÇÃO
Meio de cultura suplementado com 10% de SSS.
4. MEIO DE CRESCIMENTO
Meio de cultura suplementado com 10 ou 15% de SSS.
5. MEIO DE TRANSFERÊNCIA
Meio de cultura suplementado com 30 ou 50% de SSS.

D. MEIOS DE CULTURA COMERCIALIZADOS

Atualmente, no mercado Norte-americano e Europeu, existem diferentes meios de cultura já preparados, alguns incompletos nos quais é necessário acrescentar soro, e outros completos, prontos para serem usados. Existem meios para todas as etapas dos procedimentos de fertilização assistida: para a aspiração folicular, separação espermática, inseminação, cultura de oócitos, primeiros estágios do desenvolvimento embrionário, e para desenvolvimento até blastocisto.

Estes Meios de Cultura são oferecidos por:

IRVINE SCIENTIFIC

HTF Medium, requer suplementação com soro.

Modified HTF Medium- Hepes, requer suplementação com soro.

P1, requer suplementação com soro.

Estes três meios também podem ser adquiridos em pó para serem reconstituídos no laboratório. Requerem a adição de lactato de sódio e bicarbonato de sódio. Possuem validade de até 3 anos.

Blastocyst medium, requer suplementação com soro. Utiliza-se geralmente em conjunto com P1 como meio seqüencial para a obtenção de blastocistos.

Além disso, estes mesmos meios podem ser adquiridos prontos para uso, não necessitando a adição de nenhum suplemento.

MEDICULT

IVF Medium, para a cultura de oócitos e embriões (contém EBSS, piruvato, SSS, NaHCO₃, HSA, Insulina e antibióticos)

M3 Medium, para a cultura de embriões de 3 a 5 dias de desenvolvimento. (Contém MCDB, que é uma modificação dos Meios Ham F-10 e F-12, SSS, HSA e antibióticos).

Flushing Medium, para a aspiração folicular, preparo de espermatozoides e manutenção de gametas em ambiente sem CO₂ (contém EBSS, piruvato, SSS, Hepes, HSA e antibióticos).

COOK CULTURE MEDIA

Sydney IVF Follicle Flushing Buffer, solução tamponada com Hepes, contendo aminoácidos não essenciais. Este buffer é utilizado para aspiração folicular.

Sydney IVF Oocyte Wash Buffer, solução tamponada com Hepes, contém aminoácidos não essenciais e é utilizada para lavar o complexo cúmulo-oócitos.

Sydney IVF Fertilization Medium, meio formulado para otimizar as taxas de fertilização. Contém glicose, anti-oxidantes e aminoácidos não essenciais.

Sydney IVF Cleavage Medium, este meio pode ou não conter glicose, possui baixa concentração de fosfato para adaptar-se às necessidades metabólicas do desenvolvimento embrionário desde 2 PN a 8 células.

Sydney IVF Blastocyst Medium, este é um meio complexo, contém glicose, aminoácidos essenciais e não essenciais para promover o desenvolvimento ao estágio de blastocisto.

VITROLIFE CULTURE MEDIA

G-MOPS, solução tamponada com Hapes, contendo aminoácidos não essenciais. Este buffer é usado para aspiração folicular.

G-1, meio para o desenvolvimento embrionário desde 2 PN a 8 células.

G-2, para cultura de embriões de 8 células a estágio de blastocisto.

3. MÉTODOS DE PREPARAÇÃO E SELEÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES

Uma vez obtida a amostra de sêmen, seja por masturbação ou outro procedimento, deve-se esperar sua liquefação, pelo menos por 20 minutos a 37°C ou por 1 hora a temperatura ambiente. Se durante este período não ocorrer a liquefação do sêmen, pode-se induzi-la passando-o por uma seringa com agulha Nº 21, por uma ou mais vezes. Uma vez obtida a liquefação, deve-se avaliar os diferentes parâmetros espermáticos segundo critério OMS (*). A seguir, procede-se a separação dos espermatozóides do líquido seminal, mediante gradientes de densidade.

Nos casos em que o paciente apresente antecedentes de dificuldade na obtenção de sêmen, recomenda-se ter uma amostra criopreservada com antecedência ao procedimento de Reprodução Assistida.

(*) Normalidade dos parâmetros espermáticos (OMS, 1999):

Concentração : 20 milhões ou mais por ml.

Motilidade: 50% ou mais com motilidade A+ B.

Morfologia(**): 14% ou mais com morfologia normal

(**) Não existe uma definição do valor de referência para a morfologia segundo a OMS 1999. Os autores optaram pela utilização do Critério Estrito de Krüger (Krüger et al. *Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization*. Fert. Steril. 46: 1118, 1986).

A. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E MOTILIDADE

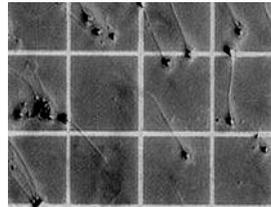
Colocam-se 5 μl de sêmen com micropipeta automática na Câmara de Makler. A amostra é avaliada com um microscópio invertido (40X) e procede-se a determinação da concentração de espermatozóides, expressa em milhões por mililitro ($N \times 10^6/\text{mL}$). Determina-se a motilidade como a porcentagem de espermatozóides móveis contados na câmara em função do total de espermatozóides presentes. Além de determinar a motilidade total, avalia-se a porcentagem de espermatozóides com progressão rápida (III); lentos (II) e móveis sem progressão (I).

Concentração: $N \times 10^6$ espermatozóides /mL

Motilidade: % total (% III; % II; % I)

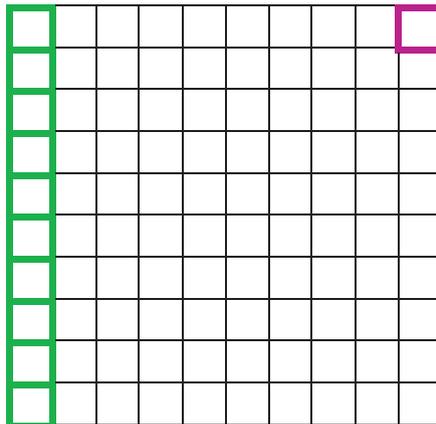


Câmara de Makler



Quadrícula da câmara

Quadrícula da Câmara de Makler





Quando a amostra de espermatozóides apresenta uma distribuição uniforme nas quadrículas e possui pelo menos 1 espermatozóide por quadrado, retira-se uma média de espermatozóides por quadrado usando pelo menos 10 quadrados. Este valor multiplicado por 10 indicará a concentração de espermatozóides em 10^6 /mL (exemplo: as amostras consideradas normais; média de espermatozóides por quadrado: 6, 60×10^6 /mL).



Quando a quantidade de espermatozóides apresenta uma distribuição não uniforme, mas entre filas (ou colunas) da quadrícula, deve-se retirar uma média de espermatozóides de 10 filas ou colunas e esse valor indicará a concentração de espermatozóides em 10^6 /mL (exemplo: pacientes com amostras subnormais; média de espermatozóides por fila ou coluna: 4, 4×10^6 /mL).

Em pacientes oligozoospermicos severos, a concentração de espermatozóides é avaliada contando todos os espermatozóides presentes nas quadrículas. Realizar este procedimento pelo menos 3 vezes e retirar uma média. Desta forma, obtém-se a concentração de espermatozóides em 10^5 /mL (exemplo: média de espermatozóides por quadrícula: 2.5, 250.000/mL)

Naqueles pacientes com espermatozóides escassos presentes na câmara, realiza-se a contagem em campos diferentes. Indica-se o resultado como N espermatozóides a cada P campos contados.

- Deve-se homogeneizar a suspensão de espermatozóides antes de tomar a alíquota de $5 \mu\text{l}$ e proceder a sua avaliação.
- Em todos os casos a suspensão de espermatozóides deve ser contada sobre a Câmara de Makler previamente aquecida sobre platina de aquecimento a 37°C , de outra maneira a motilidade seria afetada.
- Critério de inclusão para a contagem com a Câmara de Makler: considera-se dentro do quadrado (ou a quadrícula) aqueles espermatozóides que toquem as bordas superiores e direitas (ou inferiores e esquerdas). Assim, evita-se contar os espermatozóides duas vezes.

B. SEPARAÇÃO POR GRADIENTES DE DENSIDADE

Para o preparo dos gradientes, utilizam-se soluções de alta densidade, tais como: Isolate (Irvine Scientific), Pure -Sperm (Nidacon), Sydney IVF sperm gradient (Cook). Desde Janeiro de 1997, os laboratórios Pharmacia desaconselham o uso de Percoll para a separação de células humanas por possuir efeito tóxico.

Cada uma destas soluções são utilizados, geralmente, em gradientes de 40% e 80% ou em gradientes de 45% e 90%.

MATERIAIS:

- Tubos cônicos de 15 ml de poliestireno.
- Gradiente de densidade (Isolate, Pure-Sperm, etc.).
- Pipetas Pasteur estéreis.
- Pipetas graduadas de 1 ml.
- Meios de cultura para lavar (por exemplo: HTF modificado suplementado com 10% de soro sintético substituto (SSS- Irvine Scientific).

PROCEDIMENTO:

O volume utilizado de cada gradiente depende da concentração espermática da amostra. Amostra espermática com:

- Mais de 6×10^6 /ml, coloca-se 1.0 ml de cada gradiente.
- 0.5 a 6×10^6 /ml, 0.5 ml de cada gradiente.

Se a amostra seminal contém uma concentração espermática inferior a 0.5×10^6 /ml, sugere-se empregar outra técnica de separação de espermatozoides, como o *Swim-out*.

PREPARO DA COLUNA COM GRADIENTES

1. Depositar em um tubo de centrífuga 1 ml de gradiente de maior densidade (80% ou 90%) e sobre este, colocar cuidadosamente 1 ml do gradiente de menor densidade (40% ou 45%), de modo que os diferentes gradientes fiquem separados por um menisco de interfase.
2. Depositar suavemente sobre o gradiente de menor densidade 1 ml da amostra de sêmen.
3. Centrifugar a 300g por 15 a 20 minutos.
4. Retirar o sêmen e gradiente de menor densidade, com pipeta Pasteur e descartá-los.
5. Aspirar o sedimento formado com uma nova pipeta Pasteur e resuspendê-lo em um tubo com 5 ml de meio de cultura.

6. Centrifugar a 300g por 5-7 minutos. Pode-se lavar novamente o sedimento formado em 5 ml de meio de cultura.
7. Desprezar o sobrenadante e resuspende o sedimento com o meio de cultura que será utilizado na inseminação.
8. Avaliar os parâmetros espermáticos.
9. Ajustar a concentração de espermatozoides de acordo com o volume a ser inseminado.

C. SWIM-OUT

Esta técnica é utilizada principalmente para ICSI, quando o volume da amostra seminal é muito pequena e/ou a concentração espermática é menor que 0.5×10^6 /mL. Diluir a amostra seminal 1:1 com meio de cultura e centrifugar por 10 minutos a 300g. Resuspende o sedimento formado em 0.5 ml de meio. Prepara-se uma placa de Petri com gotas de $50 \mu\text{l}$ de meio de cultura cobertas com óleo mineral. Coloca-se $10 \mu\text{l}$ da suspensão de espermatozoides em cada uma dessas gotas. Incuba-se por 15 minutos ou mais (dependendo da concentração e motilidade espermática). Durante este período, os espermatozoides móveis migram à interfase óleo mineral-meio de cultura, podendo assim ser selecionados com micropipetas adaptadas a um micromanipulador.

D. CENTRIFUGAÇÃO A ALTA VELOCIDADE

Preparar alíquotas da amostra em tubos Eppendorf de 1.5 c.c. (não mais de 0.5 mL de sêmen por tubo), completa-se com meio de cultura (Hepes-HTF suplementado com 15% de SSS). Passar os tubos por vortex, centrifugar durante 5 minutos a 4800 r.p.m. Os sobrenadantes são descartados com pipeta Pasteur estéril. Os sedimentos são recuperados em um único tubo Eppendorf resuspendendo em um pequeno volume de meio de cultura (50 - $100 \mu\text{l}$ de acordo com o sedimento obtido). Em seguida, avalia-se a concentração e motilidade dos espermatozoides recuperados colocando $5 \mu\text{l}$ desta suspensão na Câmara de Makler ou diretamente colocando uma pequena gota da suspensão na tampa da placa de Petri.

4. RECEPÇÃO DE OÓCITOS DURANTE A ASPIRAÇÃO FOLICULAR.

Neste procedimento, pode-se utilizar como meio de aspiração buffer Dulbecco (Sigma) suplementado com antibióticos, pH 7.4 e com uma osmolaridade de 280 ± 5 mOsmol. Não é necessária a adição de soro. A adição de Heparina é opcional. Este meio pode ser facilmente preparado no Laboratório ou adquirido em Sigma cat. D-5773.

Também pode-se utilizar meio HTF modificado sem a necessidade de suplementação com SSS.

Fórmula do buffer Dulbecco:

COMPONENTES	g/l
Cloreto de Magnésio. 6H ₂ O	0.100
Cloreto de Potássio	0.200
Fosfato de Potássio (Monobásico)	0.200
Cloreto de Sódio	8.000
Fosfato de Sódio (Dibásico)	1.150P
Penicilina G	0.060
Streptomícina-SO ₄	0.050
Vermelho Fenol	0.005

Acertar o pH para 7,4 com NaOH 1 N ou HCl 1 N e ajustar a osmolaridade a 280 ± 5 mOsm.

MATERIAIS NECESSÁRIOS PARA A COLETA DE OÓCITOS:

- Tubos estéreis de 17 x 100 mm (Falcon 2001)
- Placas de poço duplo (Falcon 3037)
- Placas de 60 x 15 mm (Falcon 3002)
- Pipetas volumétricas de 5 ou 10 ml.
- Pipetas Pasteur estéreis
- Platina de aquecimento a 37°C.
- Meio de cultura tamponado com Hepes e suplementado com 7% ou 10% de SSS.
- Buffer Dulbecco suplementado com antibióticos.

PROCEDIMENTO DE COLETA DOS OÓCITOS ASPIRADOS

Dia anterior à aspiração folicular

No dia anterior à aspiração folicular, recomenda-se deixar preparadas as placas (Falcon 3037) para a coleta dos oócitos.

Para isto, depositar uma gota de 120 μ l de meio de cultura tamponado com Hepes (ex. HTF Modificado) no poço central de cada placa, cobrindo-a com 1 ml de óleo mineral. Mantê-las na incubadora a 37°C. Não deve-se utilizar incubadora com tensão de CO₂, pois ela acidifica o meio com Hepes. Também deve-se deixar o buffer Dulbecco a 37°C.

Dia da aspiração folicular

1. Depois de receber o tubo (Falcon 2001) contendo o líquido folicular aspirado no centro cirúrgico, depositar o conteúdo do tubo em uma ou duas placas de 60 x 15 mm.
2. Com uma lupa, analisar o líquido folicular quanto à presença de complexos cúmulo-oócitos (CCO).
3. Identificado um CCO, transferi-lo com a ajuda de uma pipeta Pasteur a uma placa de poço duplo. Lavá-lo 2 ou 3 vezes no compartimento marginal e transferir o CCO ao compartimento central da placa. Em cada uma destas placas, é possível armazenar até 5 CCO. Manter as placas a 37°C.
4. Antes da inseminação, avaliar a maturação dos CCO com a objetiva 20x do microscópio invertido e classificá-los de acordo com o aspecto morfológico do cúmulo e corona.

5. CLASSIFICAÇÃO DA MATURAÇÃO SOMÁTICA DO COMPLEXO CÚMULO-CORONA-OÓCITO.

A classificação do CCO é realizada observando-se:

- a) Tamanho e filância do cúmulo.
- b) Grau de dispersão das células do cúmulo e da corona.

Sobre a base destes critérios, pode-se avaliar a maturação dos CCO e assim selecionar aqueles com melhores probabilidades de fertilização e desenvolvimento.

Maturação 1 ou Imaturo (M1): Cúmulo pequeno ou grande, com pouca filância. Corona compacta formando uma capa densa (escura) ao redor do oócito.

Maturação 2 ou Intermediário (M2): Cúmulo grande, disperso e filante. Corona ainda escura e compacta ao redor do oócito, mas com início de dispersão (pequenos espaços entre suas células).

Maturação 3 ou Maduro (M3): Cúmulo grande, disperso e filante. Corona radiada característica, com espaços entre as células em forma de raios, podendo observar-se os limites do oócito. Este CCO é o que possui melhores probabilidades de fertilização e desenvolvimento.

Maturação 4 ou Pós-maduro (M4): Cúmulo muito disperso, grande ou pequeno por fragmentação do mesmo. Muito filante e corona inexistente. Pode-se observar o oócito com nitidez e identificar o primeiro corpúsculo polar.

CLASSIFICAÇÃO DE OÓCITOS

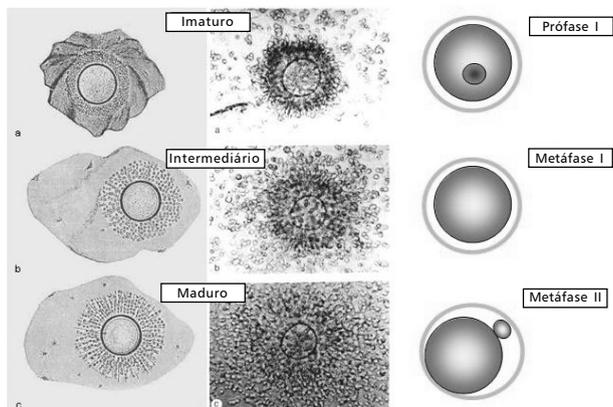


Figura 4: Classificação da maturação do complexo cúmulo-corona-oócito.

6. INSEMINAÇÃO

O número de espermatozoides que geralmente é utilizado para a fertilização *in vitro* varia entre 50.000 e 100.000/ml. Porém, concentrações de 25.000 a 1.000.000/ml também são utilizadas sem grandes diferenças nas taxas de fertilização, apesar de que concentrações mais altas aumentam o risco de poliespermia.

a) INSEMINAÇÃO EM PLACA ABERTA

MATERIAIS:

- Meio de cultura de inseminação mantido desde o dia anterior a 37°C sob tensão de CO₂ a 5%.
- Placa de poço duplo (Falcon 3037)
- Pipeta automática para pontas de 5 a 40 µl.
- Ponteiras estéreis de 200 µl.
- Pipetas volumétricas de 1 e 5 ml.
- Pipetas Pasteur estéreis.

PROCEDIMENTO

- Preparar placas de poço duplo, depositando 2 ml de meio de cultura no compartimento marginal e 1 ml no compartimento central. Preparar estas placas pelo menos 3 horas antes da inseminação ou deixá-las preparadas no dia anterior, com a finalidade de permitir que o meio de cultura se equilibre à temperatura e tensão de CO₂ da incubadora.
- Colocar 1 ou 2 oócitos por placa para serem inseminados.
- Com a ajuda de uma pipeta automática, inseminar com 50.000 ou 100.000 espermatozóides por mL de meio de cultura. É conveniente que o volume do meio contendo os espermatozóides não seja superior a 10 μ l
- Três a 4 horas após a inseminação, recomenda-se transferir os oócitos a uma placa com meio de cultura limpo para evitar a ação de espécies reativas do oxigênio que liberam-se espontaneamente dos espermatozóides, especialmente dos que vão morrendo. O mesmo ocorre com as células do cúmulo oóforo. Outra alternativa, que é a tradicional, é deixar os oócitos junto aos espermatozóides por 15 a 18 horas.
- Colocar as placas de inseminação por 15 a 18 horas em incubadora a 37°C e CO₂ a 5%. Após este período, observar a presença de 2 pronúcleos (PN) e 2 corpúsculos polares, para verificar a fertilização.

a) INSEMINAÇÃO COM ÓLEO MINERAL

MATERIAIS:

- Placas estéreis de 35 x 10 ou 60 x 15 mm.
- Meio de cultura para inseminação.
- Óleo mineral de baixa densidade (0.8 g/ml), qualidade *embryo tested*.
- Pipeta automática para pontas de 5 a 40 μ l.
- Ponteiras estéreis.
- Pipetas Pasteur estéreis
- Pipetas volumétricas estéreis de 5 ml.

PROCEDIMENTO

1. Sob câmara de fluxo laminar, preparar as placas de inseminação com 4 gotas de lavado de 30-40 μ l de meio de cultura e 4 a 6 gotas de inseminação de 20 – 30 μ l.
2. Cobrir as gotas com óleo mineral.
3. Deixar as placas de inseminação estabilizando na incubadora a 37°C e CO₂ a 5%, por pelo menos 3 horas antes da inseminação ou deixá-las preparadas no dia anterior.

4. Com a ajuda de uma pipeta Pasteur, lavar os CCO nas gotas de lavagem e colocar 1 a 2 CCO por gota de inseminação.
5. Estabilizar em incubadora por 15 minutos.
6. Inseminar com 20.000 espermatozoides nas gotas de 20 μ l, ou com 30.000 nas gotas de 30 μ l, em um volume não superior a 5 μ l.
7. Deixar as placas de inseminação na incubadora por 3 a 4 horas e transferi-las a uma nova placa de inseminação ou deixá-las por 15 a 18 após a fertilização; em seguida, verificar a fertilização.

7. AVALIAÇÃO DA FERTILIZAÇÃO

MATERIAIS

- Lamparina
- Pipetas Pasteur estéreis
- Placas de Petri de 35x10 ou de 60x15 mm
- Meio de cultura de crescimento

PROCEDIMENTO

1. Observar os oócitos 15 a 18 horas após a inseminação.
2. Comprovar a total dispersão das células do cúmulo. Caso persista o cúmulo agrupado ao redor do oócito, pode-se liberar com a ajuda de 2 agulhas de tuberculina à maneira de microbisturi.
3. Com o auxílio de uma lupa, dispersar as células da corona que permanecem persistentes, junto ao oócito, com a ajuda de uma pipeta Pasteur estirada sobre a chama da lamparina, até um diâmetro um pouco maior que o dos oócitos ($140 + 5 \mu$ m).
4. Com a pipeta Pasteur estirada, aspirar e soltar repetidamente o oócito até que as células da corona se desprendam.
5. Verificar a fertilização identificando a presença de 2 PN, no citoplasma do oócito e de 2 corpúsculos polares no espaço perivitelínico (usar aumento 20x do microscópio invertido).
6. Lavar os oócitos fecundados por 3 vezes e transferi-los a uma placa com novo meio de cultura de crescimento e transferi-la a uma incubadora para seu posterior desenvolvimento.

ANORMALIDADES DA FERTILIZAÇÃO

Como resultado da fertilização *in vitro*, é possível encontrar zigotos com um número anormal de PN:

1. **PRONÚCLEO ÚNICO.** Esta anormalidade pode ser devido a:
 - a) Não desenvolvimento do PN paterno ou materno.
 - b) Ativação do oócito devido a uma breve exposição a temperaturas superiores a 37°C, ou a uma alteração osmótica, antes de ser inseminado. Ambos problemas podem induzir a uma ruptura precoce dos grânulos corticais, provocando a reação da zona pelúcida e por conseguinte, a impossibilidade de penetração espermática. Os zigotos com um só PN podem clivar dando origem a embriões morfologicamente normais, mas inviáveis.
2. **POLIPLOIDIA.** Formação de 3 ou mais PN, devido a:
 - a) Falha no bloqueio da poliespermia (que é freqüente nos oócitos pós-maduros).
 - b) Internalização no citoplasma do 2º corpúsculo polar.
 - c) Fertilização por um espermatozóide binucleado ou pela fertilização de um oócito binucleado.

Estes zigotos podem dar origem a embriões morfologicamente normais, mas não viáveis.



a) Oócito fecundado com 2 PN b) Oócito fecundado com 3 PN. c) Oócito com 1 PN

8. DESENVOLVIMENTO PREIMPLANTACIONAL IN VITRO

O desenvolvimento embrionário deve ser realizado sob óleo mineral.

MATERIAIS

- Placas de 35x10 mm ou de 60x 15 mm.
- Óleo mineral de baixa densidade, *embryo tested*.
- Pipetas Pasteur estéreis, estiradas sob chama a um diâmetro de $\pm 200 \mu\text{m}$.
- Meio de cultura de crescimento
- Pipetas volumétricas estéreis de 5 ml.
- Pipetas automáticas para pontas de 1 a 10 μl e de 5 a 40 μl .
- Ponteiras estéreis.

PROCEDIMENTO

1. Preparar, com pelo menos 3 horas de antecedência, uma placa de 35x10mm, com 4 a 8 gotas de meio de cultura de crescimento e cobertas com óleo mineral.
2. Transferir 1 zigoto a cada uma das gotas de meio de cultura, se desejar realizar um acompanhamento do desenvolvimento, ou todos os zigotos a uma só gota.
3. Deixar na incubadora a 37°C e CO₂ a 5% até o dia da transferência dos embriões.

9. AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Atualmente, existem dois critérios que são os mais usados para avaliar a qualidade do desenvolvimento embrionário:

- a) A qualidade embrionária pode ser prognosticada, indiretamente, pela avaliação morfológica do zigoto em estágio de dois PN. Esta classificação está baseada na localização e número dos corpos precursores de nucléolos (CPN) nos compartimentos pronucleares, masculino e feminino. Assim como, também, a formação de um halo no córtex do oócito, produto da contração das organelas citoplasmáticas ao redor dos PN, que seriam preditivos da qualidade embrionária. Durante o desenvolvimento dos PN, os CPN são móveis e sua distribuição pode sofrer alteração de maneira imprevista até alinhar-se na região de contato de ambos PN. O padrão de polarização dos CPN é considerado um bom sinal para o subsequente desenvolvimento embrionário. Portanto, a presença conjunta do halo com a localização dos CPN, mostrou ser um eficiente marcador positivo de embriões de boa qualidade.

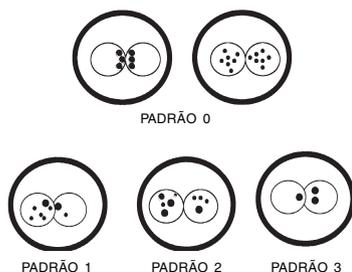


Figura 6 a:
Classificação dos oócitos em estágio de PN.



Figura 6 b:
Oócito com a presença do halo.

Padrão 0: Com altas probabilidades de desenvolvimento e gravidez
Padrão 1 a 3: Com poucas probabilidades de desenvolvimento e gravidez

b) O critério mais usado para avaliar a qualidade embrionária é descrito por L. Veeck. Este sistema leva em conta a presença de fragmentos citoplasmáticos anucleados e o tamanho relativo dos blastômeros. Para este sistema, o melhor embrião é aquele qualificado grau I, apesar de haver centros que designam o melhor embrião como grau IV.

Grau I: Embrião com blastômeros de igual tamanho; sem fragmentos citoplasmáticos e com citoplasma claro e homogêneo.

Grau II: Embrião com blastômeros de igual tamanho e menos de 30% de fragmentos citoplasmáticos.

Grau III: Embrião com blastômeros de tamanhos diferentes; zero % de fragmentos citoplasmáticos.

Grau IV: Embrião com blastômeros de tamanho igual ou desigual; com 30% a 50% de fragmentos citoplasmáticos.

Grau V: Embrião com mais de 50% de fragmentos citoplasmáticos.

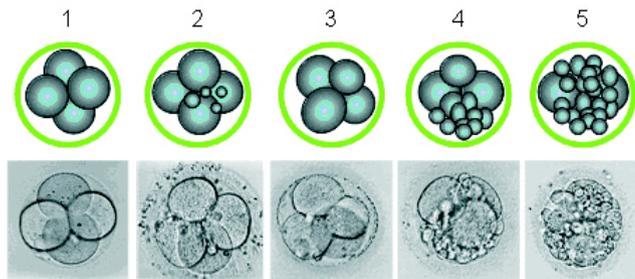


Figura 7: Avaliação da qualidade embrionária:

1) Grau I; 2) Grau II; 3) Grau III; 4) Grau IV; 5) Grau V

10. TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

A transferência dos embriões pode ser realizada ao útero ou às trompas.

MATERIAIS

- Placas de poço duplo
- Meio de cultura de transferência
- Pipetas volumétricas estéreis de 5 ml.
- Lamparina
- Pipetas Pasteur estéreis, estiradas sobre a chama de uma lamparina até um diâmetro de $\pm 200 \mu\text{m}$.
- Seringas de 1 ml
- Catéter de transferência (para transferir às trompas (TET): catéter de transferência laparoscópica.)

PROCEDIMENTO

1. Preparar no dia anterior ou pelo menos com 3 horas de antecedência uma placa de poço duplo com meio de cultura de transferência.
2. Transferir os embriões da placa de crescimento à placa de transferência, lavando-os no compartimento marginal; em seguida, transferi-los ao compartimento central da placa.
3. Manter a placa de transferência na incubadora até o momento da transferência ao útero ou às trompas.

Para a transferência:

- a) Acoplar a seringa de 1 ml ao catéter de transferência.
- b) Transferir os embriões da placa de crescimento à placa de transferência.
- c) Posicionar a ponta do catéter no compartimento central da placa e aspirar $\pm 10 \mu\text{l}$ de meio de cultura.
- d) Levantar a ponta do catéter e aspirar ar para formar uma pequena bolha.
- e) Voltar a mergulhar a ponta do catéter no meio e aspirar um pouco de meio junto com os embriões (não mais de $5 \mu\text{l}$).
- f) Levantar a ponta do catéter e aspirar $\pm 10 \mu\text{l}$ de meio de cultura. Desta maneira, os embriões ficarão em "sanduíche" de meio de cultura, que os protegerá e assegurará sua transferência ao útero ou às trompas.

Devido ao fato da transferência de embriões ao útero ser um procedimento cego e com grande transcendência para o sucesso da Reprodução Assistida, é muito importante registrar se a transferência de embriões foi:

1. **Fácil:** Sem dificuldade na introdução do catéter de transferência pelo colo uterino, independente do tipo de catéter utilizado. Ao extrair o catéter do colo, não deve estar contaminado com sangue.
2. **Difícil:** Dificuldade para introduzir o catéter, como por exemplo: se foi necessário substituí-lo, ou a presença de sangue no condutor ou no guia, como na ponta do catéter. Se todos ou algum embrião ficou retido no catéter e houve a necessidade de uma segunda ou mais tentativas de transferência.

Atualmente, com a existência de catéteres com ponta eco-refringente, a transferência embrionária pode ser realizada com mais precisão sob visão ecográfica, o que assegura a ótima localização dos embriões na cavidade uterina.



Capítulo 3: Fecundação Assistida

.....

INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZÓIDES (ICSI)

A Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóides (ICSI) é uma técnica de fertilização *in vitro* introduzida por G. Palermo y col. em 1992. A ICSI é indicada para casais inférteis por fator masculino severo, azoospermias e aplicável também a casais inférteis com falhas sucessivas de fertilização *in vitro*. Como indica o nome, a ICSI consiste na introdução mecânica, com a ajuda de um sistema de micromanipulação, de um só espermatozóide no citoplasma de um oócito.

1. PREPARO DOS OÓCITOS PARA ICSI: TRATAMENTO COM HIALURONIDASE.

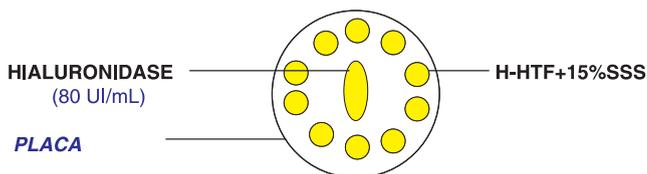
.....

MATERIAIS

- Hialuronidase SIGMA tipo VII.
- Meio de cultura HTF-Hepes suplementado com 15 % SSS (H-HTF + 15%SSS).
- Placas de Petri.
- Pipetas Pasteur estéreis ou Stripper com ponta de 1 mm, 300 μm , 150 μm e 135 μm .
- Óleo mineral equilibrado e *embryo tested*.

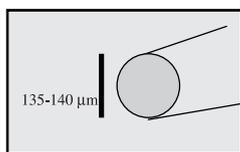
PROCEDIMENTO

Manter os oócitos na incubadora para estabilização e maturação por aproximadamente 2-3 horas. Em seguida, para proceder a retirada da corona radiata e do cúmulo oóforo, prepara-se uma placa com uma gota central de 80 UI de hialuronidase com várias gotas periféricas de H-HTF+ 15%SSS para realizar as lavagens. Esse procedimento é realizado na câmara de fluxo laminar sobre a platina de aquecimento. Cobrir com óleo pré-equilibrado.

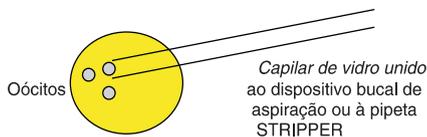


Utiliza-se microscópio estereoscópico com uma platina de aquecimento para o mesmo. Os oócitos são transferidos, com pipeta Pasteur estéril, desde a gota de meio de cultura até a hialuronidase, transferindo a menor quantidade possível de meio de cultura para não diluir a enzima. Com a mesma pipeta Pasteur, aspirar e soltar os oócitos energeticamente (com certa pressão) para favorecer a liberação das células do cúmulo e da granulosa. Evitar a formação de bolhas. Logo após 10 segundos aproximadamente, retiram-se os oócitos transferindo-os para uma gota de H-HTF+ 15%SSS. Os capilares, devem ser selecionados antes de começar a desnudação dos oócitos, deverão ir desde um diâmetro maior que o oócito (por exemplo 200 μm) e afinando-se até chegar finalmente a um diâmetro de 135-140 μm , já que de outra maneira ocorreria a ruptura do oócito. Com o capilar mais grosso, transfere-se os oócitos a gotas de meio fresco (pelo menos fazê-los passar por quatro gotas) para eliminar os restos de hialuronidase. Em seguida, com capilares de diâmetro menor, "limpá-los" fazendo-os rodar com certa pressão contra a borda da gota. É importante que o oócito não se deforme ao passar pelo capilar, pois é possível que este se degenerere posteriormente.

Todos estes passos se realizam com um dispositivo de aspiração bucal e capilares de vidro. Também pode-se utilizar a pipeta STRIPPER e os capilares correspondentes.



Capilar ampliado



Gota magnificada onde se limpam os oócitos

Uma vez que os oócitos foram desnudados corretamente, guardá-los na incubadora por uns minutos para sua recuperação antes de injetá-los.

Rotula-se a placa prestando especial atenção. Avalia-se a maturação dos oócitos no microscópio invertido caso não tenha sido possível sua classificação na lupa. Anota-se na ficha correspondente à paciente. Coloca-se a placa na incubadora ($5 \pm 0.5\% \text{ CO}_2$; $37 \pm 0.5\text{ }^\circ\text{C}$; câmara 100% umidade) até o momento da injeção. No mínimo devem passar aproximadamente 1.5-2 horas antes se sua injeção. Quando se tratar de um caso onde a maioria dos oócitos encontrarem-se em estado de Metáfase I, deve-se esperar o tempo necessário para que estes atinjam a maturação, sendo no máximo 10-12 horas.

CLASSIFICAÇÃO OOCITÁRIA

A. SEGUNDO SUA MATURAÇÃO

A classificação dos oócitos se realiza com maior precisão utilizando o microscópio invertido (40x), pois permite avaliar possíveis defeitos citoplasmáticos (grânulos, vacúolos, etc.), além de determinar o estágio de maturação que eles se encontram.



METÁFASE II
(presença do 1º
corpúsculo polar)



METÁFASE I
(ausência do 1º
corpúsculo polar)



PRÓFASE I
(presença de
vesícula germinal)

Figura 8

B. SEGUNDO SUA MORFOLOGIA

Nos últimos anos, foram publicados vários trabalhos que correlacionam positivamente a morfologia do oócito com o desenvolvimento embrionário e as taxas de gravidez. Assim como o dimorfismo do oócito também tem sido correlacionado com baixas taxas de implantação, apesar do desenvolvimento embrionário ser similar aos oócitos com morfologia normal. Neste contexto, a citomorfologia oocitária é um fator importante, especialmente para o sucesso da injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI).

As principais anormalidades do oócito estão demonstradas nas Figuras 9 e 10. A origem destas alterações é multifatorial e não são bem conhecidas, entre as quais podemos mencionar a hiperestimulação ovariana com gonadotrofinas exógenas, a assincronia na maturação nuclear e citoplasmática e a idade da mulher. Porém, é mais freqüente observar-se alterações como granulação e inclusões citoplasmáticas em oócitos com citoplasma imaturo; observa-se fragmentação do corpúsculo polar e espaço perivitelínico aumentado em oócitos com envelhecimento intrafolicular, e alterações da zona pelúcida são freqüentes em mulheres com mais de 40 anos. Além disso, observa-se uma importante incidência de anormalidades cromossômicas relacionadas com a morfologia oocitária.

ANORMALIDADES DA MORFOLOGIA OÓCITARIA

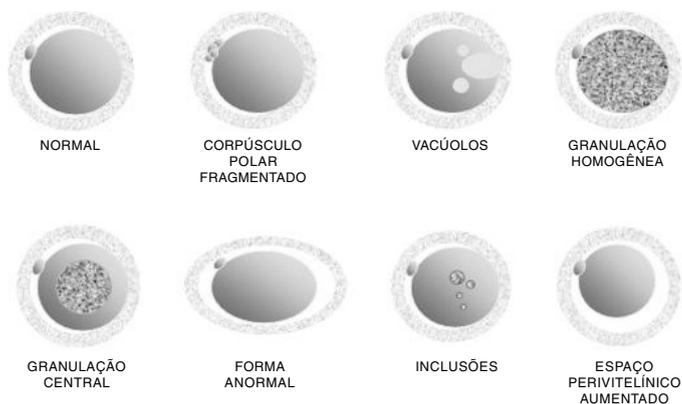
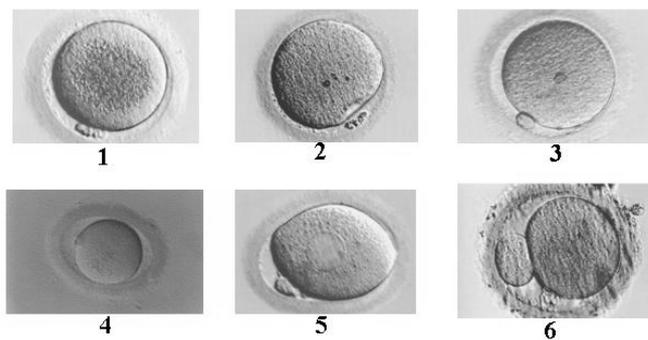


Figura 9

ANORMALIDADES DO OÓCITO



1. Granulação Central, Corpúsculo Polar Fragmentado
2. Inclusões, Corpúsculo Polar Fragmentado
3. Corpo Refringente
4. Forma Anormal, Espaço Perivitelínico Aumentado
5. Vacúolo, Forma Anormal
6. Corpúsculo Polar Gigante

Figura 10

2. REALIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ICSI

MATERIAIS

- Pipeta de microinjeção
- Pipeta de sustentação (*holding*)
- Solução de PVP (polivinilpirrolidina)
- Placa Falcon 1006
- Micropipetas automáticas de 1 a 10 μ l
- Ponteiras estéreis
- Óleo mineral equilibrado e *embryo tested*.

Antes de realizar a ICSI, deve-se checar o bom funcionamento do micromanipulador (ausência de bolhas, correto nível de óleo, etc.), colocam-se as pipetas de injeção e sustentação.

A placa (Falcon 1006) na qual se realizará a injeção dos oócitos é preparada com gotas de 5 μ L de H-HTF-15 % SSS e coberta com 5 ml de óleo pré-equilibrado.

Substituir algumas das gotas de meio de cultura por Polivinilpirrolidina (PVP). Duas ou três gotas de PVP devem ser suficientes nos casos onde encontram-se facilmente espermatozóides. Adicionar aproximadamente 1-2 μ l da suspensão dos espermatozóides já processados a uma das gotas de PVP.

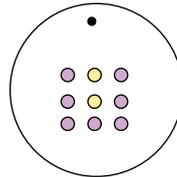
Com a micropipeta automática, substituir as microgotas de H-HTF pelo PVP, PVP + espermatozóides já processados e espermatozóides processados sozinhos.

Nos casos em que a amostra de espermatozóides apresentar motilidade = 5% ou motilidade razoável > 5%, mas com motilidade Grau I, após capacitação, realizar-se-á também uma microgota que contenha somente meio de cultura contendo espermatozóides já processados.

Adicionar aproximadamente 3 μ l da suspensão espermática se a concentração final for de 1×10^5 – 1×10^6 . Se a concentração for maior, sugere-se diluir a amostra ou colocar um volume menor a uma das gotas que contém o PVP e à outra que só contém meio de cultura (manter uma seqüência para substituir as gotas e rotular corretamente).

Resumindo, faz-se as microgotas com H-HTF+ 15%SSS, cobre-se com óleo, esvaziam-se algumas e substituem-se pelo PVP e se adicionam os espermatozóides já processados segundo convenha. Finalmente, colocam-se os oócitos. Nos casos onde demora-se muito a encontrar espermatozóides móveis, procurar primeiro todos os espermatozóides necessários e logo após encontrá-los, colocam-se os oócitos na placa para sua injeção.

As microgotas podem ser preparadas conforme mostra a figura 11.

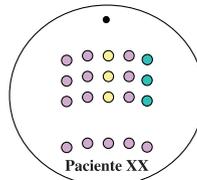


Paciente XX

- = microgota de 5 μ L que contém PVP e PVP com os espermatozóides já processados
- = microgota de 5 μ L de H-HTF-15 % SSS que contém oócitos MII
- = marca que indica posição superior da placa

No caso de tratar-se de espermatozóides provenientes de Biópsia Testicular ou Punção de Epidídimo, a placa deverá ser preparada de modo um pouco diferente. Utilizar três gotas com PVP e preparam-se várias gotas de meio de cultura (por exemplo, 14-16 gotas) para agregar a elas aproximadamente 3 μ l da suspensão dos espermatozóides provenientes da biópsia testicular ou punção epididimária, reservando-se um número de gotas apropriado para que assim que forem encontrados os espermatozóides necessários, os oócitos sejam colocados nela.

As microgotas podem ser distribuídas conforme mostra a figura 12.



Paciente XX

- = microgota de 5 μ L que contém PVP
- = microgota de 5 μ L de H-HTF-15 % SSS e espermatozóides da biópsia ou punção
- = microgota de 5 μ L de H-HTF-15 % SSS que contém oócitos MII
- = marca que indica posição superior da placa

Os oócitos são colocados nas microgotas da placa de injeção (sempre controlar duas vezes o nome da paciente, lendo-o em voz alta).

Após realização da ICSI, os oócitos são lavados na parte central da placa, isto é feito porque estamos trocando de meio de cultura (de H-HTF-SSS a HTF-SSS), deixando-os nos poços livres. A proporção é de 5 oócitos cada 200 μl , como o volume de meio de cultura em cada poço é de 400 μl , podem-se colocar até 10 oócitos juntos.

Guardar a(s) placa(s) corretamente rotulada(s) na incubadora destinada.

Após aproximadamente 15-18 horas da ICSI, verifica-se a fertilização utilizando o microscópio invertido (40x). Transferir os zigotos para uma placa pré-estabilizada, com novo meio de cultura, estas são mantidas na incubadora de CO_2 . Caso queira avaliar o desenvolvimento individual de cada zigoto, pode-se realizar a cultura em microgotas de 20 μl sob óleo.

Registra-se a informação correspondente a cada paciente em sua respectiva ficha anotando data, hora, profissional que realizou a observação e os comentários que forem necessários (oócito vacuolado, granuloso, corpúsculo polar fragmentado, etc.).

No caso de fertilizações anormais (3 pronúcleos, 1 pronúcleo, etc.) e oócitos degenerados, descartam-se de imediato.

Aproximadamente às 48 ou 72 horas da injeção, avalia-se a qualidade embrionária.

3. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE ESPERMATOZÓIDES SEGUNDO SUA CLASSIFICAÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS 1999), uma amostra de sêmen normal apresenta os seguintes parâmetros: volume: 2-6 mL, concentração $\geq 20 \times 10^6$ espermatozóides/mL, motilidade $\geq 50\%$ e morfologia segundo Krüger $\geq 14\%$ de formas normais.

Quando trabalhamos com amostras normais, utilizamos a técnica de gradiente descontínuo como método de separação.

- Nasquelas amostras de sêmen consideradas pela O.M.S. como subnormais, a técnica de separação que utilizamos será gradiente descontínuo se houver boa motilidade ou *swim out*, como foi descrito no capítulo 2.
- Nos casos de pacientes que apresentem Criptozoospermia, processamos a amostra de sêmen por centrifugação a alta velocidade. Este mesmo procedimento é aplicado nos casos de Oligozoospermia severa nos quais não se recuperam espermatozóides após gradiente.
- Quando se trabalha com amostras de espermatozóides do ejaculado criopreservadas, deixa-se descongelar à temperatura ambiente e lentamente, acrescenta-se o meio de cultura em uma proporção 2:1 à suspensão de espermatozóides. Coloca-se em um tubo de centrífuga de 15 mL e centrifuga-se a 1600 r.p.m. durante 5 minutos. O sedimento obtido é ressuspense em 1 mL de meio de cultura H-HTF+ 15%SSS, e avalia-se a concentração e motilidade em Câmara de Makler. Normalmente, as amostras criopreservadas apresentam baixa motilidade inicial. A suspensão obtida é colocada sobre um gradiente de densidade de 2 (95% e 45 %) ou 3 (95 %, 70 % e 45 %) camadas, segundo as características da amostra, e procede-se como se explicou nesse ponto.
- Quando tratar-se de espermatozóides criopreservados provenientes de punções (epidídimo, testículo) ou de biópsias testiculares, logo após a centrifugação de 5 minutos, ressuspender o sedimento obtido em um volume pequeno (100-500 μ l) de H-HTF+ 15%SSS; observa-se uma pequena gota da suspensão no microscópio invertido e incuba-se na incubadora de CO₂ até sua utilização.
- Se as amostras de sêmen são extremamente viscosas, passá-las através de uma seringa de 1 ou 10 c.c. com agulha de 21G para romper a massa viscosa e em seguida avalia-se a concentração e motilidade. Quando realizar este procedimento, normalmente a motilidade espermática é afetada transitoriamente. Processá-la de acordo com os parâmetros seminais apresentados.
- Nos casos em que o paciente apresenta ejaculação retrógrada, indica-se ingerir uma dieta escassa em líquidos e tomar 2 colheres de sopa de Bicarbonato de Sódio dissolvidas em um copo de água, cada 8 horas, no dia anterior ao procedimento.

Não deve-se ingerir líquido na noite anterior. Na manhã seguinte, deve-se urinar e em seguida manter relação sexual ou masturbar-se. Em seguida, deverá urinar novamente e coletar essa urina em um recipiente estéril que contém 10 mL de Buffer Fosfato Salino de Dulbecco. Entregá-lo o mais rápido possível ao laboratório onde será dividido em alíquotas em tubos de centrifuga de 15 mL, centrifuga-se por 5 minutos a 1700 r.p.m. Descarta-se o sobrenadante e os sedimentos obtidos são suspensos novamente colocando-os em um único tubo com meio de cultura H-HTF+ 15% SSS e avalia-se a concentração e a motilidade final na Câmara de Makler. Sempre que possível, aplicar o gradiente como método de separação de acordo com as características de concentração e motilidade, utiliza-se um gradiente de uma só camada (90%) ou de duas (90% e 45%).

- Em pacientes descapacitados medulares ou com anejaculação, a amostra de sêmen é obtida por eletroestimulação. Para isto, utiliza-se um eletroestimulador com transdutores transretais; a amostra de sêmen é coletada em um frasco estéril que contém 5 mL de Buffer Fosfato Salino de Dulbecco; uma alíquota de 5 μ L é avaliada na câmara de Makler e a amostra é logo processada por gradientes de densidade por centrifugação a alta velocidade segundo suas características de concentração e motilidade iniciais. O sedimento final é suspenso novamente em meio de cultura H-HTF+ 15%SSS e avalia-se a concentração e motilidade final na Câmara de Makler. Sempre que possível, aplicar o gradiente como método de separação de acordo com as características de concentração e motilidade, utiliza-se um gradiente de uma só camada (90%) ou de duas (90% e 45%).
- Quando o paciente apresenta Azoospermia obstrutiva ou não obstrutiva (Secretora), a técnica de recuperação de espermatozoides aplicada varia. Nos casos de A. Obstrutiva, utiliza-se Punção de Epidídimo, já que é um bom método pelo qual se recupera grande quantidade de espermatozoides e na maioria dos casos, uma grande porcentagem dos mesmos é móvel. Quando se trata de A. Secretoras, realizam-se biópsias testiculares múltiplas.

4. PUNÇÃO DE EPIDÍDIMO

Realiza-se a Punção de Epidídimo com anestésico na pele e túnica vaginal a nível da cabeça do epidídimo. Em seguida, procede-se a punção da estrutura com seringa de 1 c.c. e agulha calibre 30 (30 G) (a seringa contém 0.1 mL de H-HTF+ 15%SSS). As seringas são enviadas imediatamente ao laboratório onde se esvazia o conteúdo das mesmas em uma placa de 60x15 mm. Verifica-se pelo microscópio invertido a presença de espermatozóides e a motilidade. Anota-se de qual epidídimo foi puncionado e as características dos espermatozóides presentes. Coloca-se esta suspensão de espermatozóides com pipeta Pasteur de vidro estéril em um tubo de centrifuga de 15 mL; acrescenta-se aproximadamente 1 mL de H-HTF+ 15%SSS centrifuga-se durante 5 minutos a 1700 r.p.m. e o sedimento obtido é ressuspenso em 50-200 μ L de H-HTF+ 15%SSS (dependendo do sedimento).

Sempre que possível, aplicar o gradiente como método de separação de acordo com as características de concentração e motilidade, utiliza-se um gradiente de uma só camada (90%) ou de duas (90% e 45%).

No caso de não encontrar ou considerar insuficiente a quantidade de espermatozóides móveis, realizam-se outras punções epididimárias.

5. BIÓPSIA TESTICULAR

A anestesia requerida para esta intervenção pode ser geral, peridural ou local. Uma vez exteriorizados os testículos, realizam-se pequenas biópsias (6 ou 7 / testículo) com o objetivo de cobrir a maior parte da superfície da glândula. Lavam-se as amostras em solução fisiológica (NaCl a 0.9 % estéril) e imediatamente são colocados em um tubo de 15 mL que contém 2 mL de H-HTF+15%SSS. Envia-se ao laboratório onde, com a ajuda de uma placa de 60x15 mm e duas pinças estéreis (agulha ou bisturi), massera-se o tecido minuciosamente.

Determina-se a presença de espermatozóides e sua motilidade no microscópio invertido. Anota-se o lado biopsiado e as características dos espermatozóides presentes. Transferir esta suspensão com uma pipeta Pasteur estéril para um tubo de centrifuga de 15 mL; acrescenta-se aproximadamente 1 mL de H-HTF+ 15%SSS; centrifuga-se durante 5 minutos a 1700 r.p.m. e o sedimento obtido

é suspenso novamente em 50-200 μ L de H-HTF+ 15%SSS (dependendo do sedimento obtido). No caso de não encontrar ou considerar insuficiente a quantidade de espermatozóides móveis, realizam-se novas biópsias e procede-se do mesmo modo.

No caso de trabalhar com espermatozóides imóveis; seja provenientes de punção de epidídimo ou de biópsia testicular, amostras descongeladas ou espermatozóides provenientes de amostras de sêmen fresco imóveis ou que apresentam motilidade inicial muito baixa e no momento de utilizá-las logo após umas horas de processadas perderam a motilidade, emprega-se uma metilxantina, como a Pentoxifilina, a 0.5 % em Buffer Fosfato Salino (3.5 mM).

Acrescenta-se em tubo de 15 mL à amostra com a suspensão de espermatozóides imóveis, em uma relação 1:1, a solução de Pentoxifilina preparada no momento. Incuba-se durante 20 minutos em incubadora de CO₂. Após finalizada a incubação, acrescenta-se aproximadamente 1 ml de H-HTF+ 15%SSS e centrifuga-se durante 5 minutos a 1600 r.p.m., o sedimento obtido é suspenso novamente em 50-200 μ l de H-HTF+ 15%SSS.

Pentoxifilina a 0.5 % (3.5 mM).

Prepara-se no momento de ser utilizada. Pesar 0.01 g de Pentoxifilina e acrescentar 2 ml de Buffer Fosfato previamente descongelado. Deixar dissolver e filtrar em membrana de 0.22 μ m.

Buffer Fosfato Salino.

Prepara-se com 100 ml de água bidestilada autoclavada. Acrescenta-se 0.718 g de Cloreto de Sódio, 0.037g de Cloreto de Potásio, 0.025g de Sulfato de Magnésio e 0.448g de TRIS. Deixar dissolver bem e filtrar em membrana de 0.22 μ m. Fazer alíquotas de 2.5 ml em tubos de 6 ml e conservar a - 20°C (freezer).

6. PROTOCOLOS ACESSÓRIOS

A seguir, detalharemos Protocolos de Lises de Eritrócitos e Digestão Enzimática do Tecido Testicular. Estes protocolos podem ser utilizados para facilitar a busca dos espermatozóides nos casos de biópsia testicular.

A. Protocolo de Lises de Eritrócitos do Tecido Testicular.

Buffer de lises de eritrócitos (BLE):

Dissolver, na ordem indicada, um a um cada componente em água bidestilada estéril.

8.29 g/litro de NH_4Cl

1.00 g/litro de KHCO_3

0.83 g/litro de EDTA

Ajustar o pH a 7.2 utilizando 1 N de HCl (filtrado). Filtrar em membrana de $0.22 \mu\text{m}$ e fazer alíquotas de 3 ml. Rotular corretamente e aguardar a 4°C durante 1 mês.

Colocar em uma placa de 4 poços, 1 ml do Buffer de Lises de Eritrócitos (BLE) no poço nº 1 e 1 ml de meio de cultura (H-HTF+15%SSS) no poço nº 2. Acrescentar o tecido previamente masserado com duas pinças estéreis (agulha ou bisturi), no poço nº 1. Misturar o tecido com 2 agulhas de 25G unidas a seringas de tuberculina (1cc). Após 5 minutos, transferir os pedaços de tecido ao poço nº 2. Colocar o BLE do poço nº 1 em um tubo cônico de 15 ml e centrifugar durante 5 minutos a 1800 r.p.m.. Resuspender o sedimento em H-HTF+15%SSS, em um volume de acordo com o sedimento visualizado e avaliar a presença de espermatozóides. Caso não se encontre espermatozóides, proceder com o tratamento de DNase/Colagenase (ver a seguir).

Todo o tecido remanescente deve permanecer a 37°C . Este tecido pode ser utilizado posteriormente para procurar espermatozóides ou para ser criopreservado no caso de que o número de espermatozóides seja adequado.

B. Tratamento de digestão enzimática do tecido testicular com DNase/Colagenase.

Descongelar em um banho de água a 30° durante 5 minutos uma das alíquotas de 1 ml da solução de DNase/Colagenase já preparada.

Descartar todo o líquido possível do tecido testicular, determinar aproximadamente o volume testicular em ml. Deve-se processar o tecido em tubos Eppendorf ou tubos de centrífuga de 15 ml, segundo o volume do processado.

- Acrescentar um volume igual de BLE (pré-aquecido a 37°C) para que ocorra a lise dos eritrócitos.
- Incubar os tubos com as tampas semi-abertas na incubadora a 37°C durante 5 minutos.
- Transferir o líquido a um novo tubo, acrescentar 4 ml de H-HTF+ 15%SSS. Centrifugar 5 minutos a 1800 r.p.m.
- Ressuspender o sedimento em volume igual (ex.: 100 μ l de tecido, acrescentar 100 μ l de meio).
- Acrescentar um volume igual da Solução DNase/Colagenase (ex.: 200 μ l da suspensão, acrescentar 200 μ l da solução DNase/Colagenase).
- Incubar esta suspensão com tampa semi-aberta na incubadora durante 1 hora, agitando a cada 10-15 minutos para facilitar a digestão enzimática.
- Logo após a incubação, centrifugar 5 minutos a 500 r.p.m. para eliminar os resíduos não digeridos. Transferir todo o sobrenadante a um novo tubo.
- Remover a enzima do sobrenadante acrescentando H-HTF+ 15%SSS (dobro do volume).
- Centrifugar 5 minutos a 1600 r.p.m. Ressuspender o sedimento em um volume pequeno de H-HTF+ 15%SSS, dependendo do sedimento obtido.
- Homogeneizar e avaliar a presença de espermatozóides.

Solução DNase/Colagenase

Adicionar 0.0015 g DNase a 30 mL de H-HTF suplementado a 1% de BSA. Homogeneizar bem.

Retirar 10 ml desta solução com uma seringa de 10 c.c. e acrescentá-los em um frasco de 50 mg de Colagenase Tipo IV. Dissolver bem. Filtrar em membrana de 0.22 μ m e fazer alíquotas de 1 ml cada uma. Rotular corretamente os tubos levando-os imediatamente ao freezer. Mantê-los no congelador até sua utilização.

Quando se acrescenta a um volume de tecido testicular igual, a concentração final de DNase é de aproximadamente 25 μ g/ml e a concentração final da Colagenase é de aproximadamente 2.6 mg/ml.

C. Preparo para Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóides (ICSI).

Se a amostra foi processada por gradiente de densidade, o sedimento obtido pós-separação é colocado em um tubo Eppendorf, acrescentando-se H-HTF+ 15%SSS até nivelar o tubo Eppendorf, centrifugando-o durante 5 minutos a 4800 r.p.m.. Descarta-se o sobrenadante e, o sedimento obtido é ressuspensão em 20-200 μ L de H-HTF+ 15%SSS.

O critério para decidir a quantidade final de meio de cultura é parecida mas inverso ao utilizado para um FIV. Nesta técnica, é necessário ter os espermatozóides móveis (seja qual for o Grau de motilidade) suficientemente diluídos (aproximadamente 1×10^5 - 1×10^6 espermatozóides móveis/mL) de maneira tal que se possa trabalhar de forma cômoda no momento de realizar a "captura" dos espermatozóides móveis nas microgotas de 5 μ L de H-HTF+ 15%SSS.

Se a amostra foi processada por centrifugação a alta velocidade, descartam-se os sobrenadantes e ressuspende-se os sedimentos, em um único tubo Eppendorf, em aproximadamente 20-200 μ L de H-HTF+ 15%SSS, utilizando o critério explicado acima.

Às vezes ocorre de realizar-se um ICSI devido a falhas da fertilização em tentativas prévias de FIV, seja falha de fertilização normal ou falha total de fertilização. Assim, este sêmen apresenta características normais de concentração e motilidade. Nestes casos, não é necessário processar todo o volume seminal, basta uma pequena alíquota.

Após o processamento da amostra por gradiente deste tipo de sêmen, usualmente recupera-se um bom sedimento, de maneira que possa ser lavado em um tubo de centrífuga de 15 mL com 1 mL de H-HTF+ 15%SSS e em seguida ressuspender o sedimento obtido com o critério já explicado. Neste caso, pode ser necessário ressuspender o sedimento final em até 2 mL de H-HTF+ 15%SSS para não superar 1×10^6 espermatozóides móveis/mL.

REACTIVOS:

- Albumina Sérica Bovina, **BSA** (SIGMA A-4503)
- Bicarbonato de Sódio (SIGMA S-5761)
- Buffer Fosfato Salino (ver no Preparo de meios de cultura)
- Carbonato de Potássio (KHCO₃, SIGMA P-9144)
- Cloreto de Amônio (NH₄Cl, SIGMA AO-171)
- Cloreto de Potássio (MERCK, pró-análise)
- Cloreto de Sódio (SIGMA S-5886)
- Colagenase Tipo IV (SIGMA C-1889)
- DNase (SIGMA DN-25)
- Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (GIBCO, Catálogo 14040-117)
- EDTA (GIBCO 11267-010)
- Estreptomicina (SIGMA S-6501)
- Freezing Medium Test Yolk Buffer (Irvine Scientific, Catálogo 9971)
- Gamete Preparation Medium, **GPM**, (Serono)
- HAM F-10 10X (GIBCO, Catálogo 11955-036)
- Hepar-Human Tubal Fluid, **H-HTF** (Irvine Scientific, Catálogo 9963)
- Human Tubal Fluid, **HTF** (Irvine Scientific, Catálogo 9962)
- L (+) Acido Láctico (SIGMA L-2000)
- Penicilina-G (SIGMA PEN-NA, sodium salt, 25.000.000 unidades)
- Pentoxifilina (SIGMA, P-1784)
- Soro Sintético Substituto, **SSS** (Irvine Scientific, Catálogo 99193)
- Sulfato de Magnésio (SIGMA M-2643)
- TRIS (MERCK, pro-análise)



Capítulo 4: Criopreservação de Gametas, Zígotos e Embriões

1. CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES

Os processos vitais requerem alterações bioquímicas que se realizam através do movimento de moléculas em um meio aquoso. Se a água dentro e fora do citoplasma de uma célula viva é transformada em gelo a temperaturas suficientemente baixas para deter o movimento molecular, e se o sistema biológico pode ser reaquecido sem que ocorram danos, então a vida da célula detida neste estado de animação suspensa poderá ser preservada.

Spallanzani, em 1776, foi o primeiro a observar o efeito da temperatura de congelamento no sêmen humano, e Montegazza, em 1886, o primeiro a sugerir a idéia de bancos para congelamento de espermatozoides humanos. Entretanto, somente mais tarde publicou-se o sucesso do congelamento de sêmen humano com gelo seco, demonstrando-se que os espermatozoides assim congelados, e posteriormente descongelados, foram capazes de fecundar e originar um desenvolvimento embrionário normal.

A. APLICAÇÕES DO CONGELAMENTO DE SÊMEN

1. Banco de sêmen (HIV, Hepatite e Sífilis).
2. Pacientes que serão submetidos a tratamentos cirúrgicos ou de quimioterapia.
3. Sêmen de cônjuge ausente.

Diluentes empregados

Um aspecto de grande importância é o diluente ou compostos químicos que formam o diluente base. Geralmente, um diluente é formado por uma fração ácida, outra básica e um composto que forneça energia à célula espermática até o momento de ser congelada. Todas estas soluções devem estar a uma pressão isosmótica com o plasma seminal, e a combinação delas deve ser mantida em um pH neutro.

Os diluentes devem cumprir alguns requisitos de pH, capacidade tampão, osmolaridade e força iônica. Devem proporcionar proteção à célula espermática quanto aos efeitos da temperatura, refrigeração, congelamento e descongelamento.

B. CRIOPROTETORES

As lesões atribuídas à criopreservação sobre as estruturas celulares podem atenuar-se mediante a inclusão de agentes crioprotetores na elaboração dos diluentes, que as protegem durante os processos de congelamento e descongelamento. Numerosas substâncias têm sido identificadas por sua ação crioprotetora. Os crioprotetores podem ser classificados em permeáveis (metanol, glicerol, dimetilsulfóxido, etileno glicol, 1-2 propanediol, acetamida) e não permeáveis (açúcares, lipoproteínas da gema do ovo e proteínas de alto peso molecular), em função de sua permeabilidade para as membranas plasmáticas.

O mecanismo de ação destes compostos não é totalmente conhecido. Sabe-se que os permeáveis penetram na célula de forma uniforme, provocando a desidratação celular por substituição da água intracelular, evitando-se assim o aumento da concentração de solutos e a formação de cristais de gelo, sendo mais efetivos quando as velocidades de congelamento são baixas. Os não permeáveis situam-se recobrando a membrana plasmática e induzem a formação de cristais de gelo ao redor da mesma, sendo mais efetivos em congelamentos rápidos.

Os crioprotetores mais empregados são o glicerol e a gema de ovo, a qual deve seu efeito protetor às lipoproteínas de baixa densidade. O glicerol, apesar de ser mais amplamente empregado, apresenta certos graus de toxicidade para a célula espermática, sendo que a concentração de glicerol não deve ultrapassar 4% - 8%.

C. EXAMES DE CONTROLE REALIZADOS AO PACIENTE:

Antes de congelar as amostras de sêmen de um paciente ou doador, este deve ser submetido aos seguintes controles de enfermidades transmissíveis: Sífilis, HIV-1, HIV-2, Hepatite B, Hepatite C, HTLV I e II.

D. TÉCNICA

1. Congelamento rápido: Uma vez obtida a amostra em um recipiente estéril, espera-se meia hora para sua liquefação completa e realiza-se um espermiograma de controle. Acrescenta-se a solução crioprotetora (TEST Yolk Buffer-Irvine Scientific) na proporção 1:1 com relação ao sêmen e coloca-se durante 30 minutos a uma temperatura de 2-8 °C em um recipiente com água. Após este tempo, preenche-se as palhetas (0.5 ml) ou criotubos (1.0 ml) e coloca-se em vapores de nitrogênio líquido (10 cm acima) durante pelo menos 10 minutos ou toda a noite.

Posteriormente, realiza-se a imersão no nitrogênio líquido e organizam-se dentro do banco de sêmen. Os criotubos ou palhetas devem ser rotulados com marcador permanente resistente ao frio.

2. Congelamento programado: O processo inicial é igual ao anterior. Uma vez feita a solução, as palhetas são colocadas na máquina de criopreservação (Planner), a qual reduz a temperatura a velocidades de refrigeração moderadas e homogêneas ($-0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$), que diminuem a temperatura do sêmen de 30°C a 5°C em períodos de tempo de uma hora. Retiram-se as palhetas e as armazenam nos tanques de nitrogênio líquido. É um método muito caro e só se justifica congelar um número elevado de palhetas.

Realiza-se o descongelamento de sêmen à temperatura ambiente. Após, realiza-se um controle em todas as amostras criopreservadas para saber o número de espermatozoides móveis posterior ao congelamento.

2. CRIOPRESERVAÇÃO DE OÓCITOS

Obtém-se o congelamento, armazenagem e descongelamento de oócitos em um estado que permita a fecundação subsequente e desenvolvimento final com uma taxa de sucesso muito limitada e variável. Apesar de alguns investigadores terem relatado gestações a termo com nascidos-vivos a partir da fecundação *in vitro* de oócitos humanos descongelados, estes resultados não têm sido reprodutíveis.

MATERIAIS, EQUIPAMENTOS E REATIVOS

Equipamentos:

- Incubadora de CO_2
- Microscópio estereoscópico
- Câmara de fluxo laminar
- Máquina de criopreservação (Planner ou Cryobath)
- Tanques para nitrogênio líquido
- Selador de palhetas
- Balança analítica.

Materiais:

- Placas NUNC de 4 poços
- Placas Petri (35 x 10 mm)
- Pipetas Pasteur
- Pipetas de 1, 5, 10 ml
- Frasco de 50 ml
- Filtro de 0.22 μ m
- Seringas de 10 ml
- Etiqueta para marcar
- Pinças
- Raqui
- Criotubos
- Palhetas de 0,25 ml
- Cronômetro
- Lenços descartáveis

Reativos:

- PBS estéril (Irvine Scientific)
- Soro Sintético Substituto (SSS) (Irvine Scientific)
- 1,2 propanediol (PROH) (Sigma)
- Sacarose cultura celular (Sigma).
- Nitrogênio líquido

B. PREPARAÇÃO DE MEIOS PARA CRIOPRESERVAÇÃO:

Solução n° 1 (solução mãe): Preparar 25 ml de PBS suplementado com 30% de SSS, tomando 17.5 ml de PBS e 7.5 ml de SSS. Homogeneizar a mistura.

Solução n° 2 (PROH 1.5 M): Colocar 8.9 ml da solução n° 1 em um tubo cônico de 15 ml e acrescentar 1.1 ml de PROH. Misturar bem.

Solução n° 3 (PROH 1.5 M + sacarose 0.2 M): Colocar 8.9 ml da solução n° 1 em um tubo cônico de 15 ml e acrescentar 1.1 ml de PROH. Pesar 0.684 g de sacarose, acrescentar e misturar bem até que a sacarose se dissolva completamente.

Filtrar as soluções com membrana de 0.22 μ m antes de usar. As soluções têm uma duração de 48 horas guardadas a 4°C.

PROCEDIMENTO

- Preparo da placa de Nunc. Pode-se usar 1 placa para até 6 oócitos que serão criopreservados. Identificá-la da seguinte maneira:
 - Nome da paciente na parte superior.
 - Poço N° 1 marcar com PBS (Solução N°1)
 - Poço N° 2, 3 e 4 marcar com o número correspondente ao oócito e à solução N° 2.
- Acrescentar 0.8 ml de PBS ao poço N° 1 e 0.8 ml da solução N° 2 aos poços N° 2, 3 e 4. Todas as soluções devem ser usadas a temperatura ambiente.
- Marcar 1 palheta para cada 5 oócitos e limpá-la com a solução N° 3.
- Preparar uma etiqueta para cada palheta com o nome da paciente, data, número de oócitos congelados e número da palheta correspondente.
- Preparar a máquina de congelamento. Ligar a máquina e o botão da plataforma para que a pressão comece a subir. Uma vez alcançada a pressão adequada (5.0 lbs), entrar no programa e esperar que alcance a temperatura inicial (16°C).

C. PROTOCOLO DE CONGELAMENTO E ARMAZENAMENTO:

1. Colocar os oócitos que se classificaram para ser congelados no poço que contém Solução N°1 (PBS + 30% SSS) à temperatura ambiente para lavar rapidamente.
2. Transferir os oócitos à Solução N°2 (1.5M PROH em PBS+30% SSS) por 10 minutos. Começar a cronometrar o tempo com o primeiro par de oócitos.
3. Transferir os oócitos à placa de Petri de 35mm com a Solução N°3 (1.5M PROH + 0.2M Sacarose em PBS+ 30 % SSS). Todos os oócitos devem depositar-se até o fundo da placa (aproximadamente 2 minutos).
4. Conectar a palheta com a seringa de 1.0 ml e limpar com a Solução N°3. Introduzir a palheta novamente nesta solução e aspirar entre 1.0 a 1.5 cm, fazer uma bolha de ar de mais ou menos 0.3 cm, aspirar novamente a solução e pegar os oócitos (3.0 cm), fazer bolhas de ar de 0.3 cm e novamente solução (1.0 cm).

Levar a coluna de fluido até o extremo com PVA e selar a palheta com calor. Marcar cada palheta com sua etiqueta correspondente e colocá-las em posição vertical dentro da câmara de congelamento.

5. Quando todos os oócitos estiverem colocados na câmara, iniciar o programa pressionando o botão "RUN" no painel do computador.
6. O programa de congelamento requer fazer o *seeding* (cristalização) manual a -8.0°C . Pegar uma pinça metálica esfriada em nitrogênio líquido, elevar a palheta pela etiqueta (sem retirá-la totalmente da câmara) e com a pinça fazer contato direto sobre a borda da primeira bolha de ar até que se veja a solução cristalizada, imediatamente colocá-la de novo na câmara. Repetir este procedimento em todas as palhetas e ao finalizar, pressionar "RUN" para que o programa continue.
7. Enquanto o programa está funcionando, completar toda a informação nos registros e marcar os criotubos e raquis com nome da paciente, data e número de oócitos congelados.
8. Ao finalizar o congelamento, esfriar os criotubos fixados nas raquis dentro de um recipiente com nitrogênio líquido. Remover rapidamente as palhetas da câmara e guardá-las dentro nos criotubos e transferir ao tanque de armazenamento, anotar o local de armazenamento no registro da paciente.
9. Pressionar "RUN" para que a máquina volte a sua temperatura inicial e retirar a pressão de Nitrogênio líquido da câmara. Quando este tiver chegado a 0.0 lbs, retirar a bomba e tampar o tanque.

D. PROGRAMA PARA A MÁQUINA DE CONGELAMENTO:

- Temperatura inicial: 16.0°C .
- Rampa 1: -2.0°C por minuto até -8.0°C .
- Rampa 2: -8.0°C por 5 minutos para equilibrar. Fazer o *seeding* manual em seguida sustentar a temperatura por mais 5 minutos.
- Rampa 3: -0.3°C por minuto até -30.0°C .
- Rampa 4: -50.0°C por minuto até -150.0°C .
- Duração do programa: aproximadamente de 2 horas.

E. DESCONGELAMENTO DE OÓCITOS

As condições de descongelamento são fundamentais para a sobrevivência dos oócitos criopreservados. As palhetas retiradas do tanque de Nitrogênio líquido devem ser mantidas à temperatura ambiente durante 40 segundos antes de serem colocadas em banho de água (30°C) por 30 segundos. O primeiro passo (manter as palhetas à temperatura ambiente) reduz a possibilidade de dano da palheta e o segundo minimiza o tempo no qual os cristais de gelo podem crescer, lesionando as células.

O processo de descongelamento e retirada do crioprotetor são obtidos baixando as diluições de PROH gradualmente na presença de sacarose. A sacarose mantém o gradiente osmótico extracelular que previne a entrada de água excessiva durante a retirada do crioprotetor. Quando o crioprotetor tiver saído completamente, o oócito deve ser colocado no meio de cultura e a água retorna dentro da célula.

A. EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E REATIVOS:

Equipamentos: Incubadora de CO₂.
Microscópio-estereoscópico.
Câmara de fluxo laminar.
Balança analítica.

Materiais: Placas de Petri de 35x10 mm.
Pipetas Pasteur.
Pipetas de 10ml, 5.0ml e 1.0ml
Frasco de 50ml.
Filtro de 0.22 μ m.
Seringas de 10ml.
Tubos Cônicos graduados
Seringa de 1.0ml.
Pinças.
Cronômetro.
Placas multipoços.
Lenços descartáveis.
Tesoura.
Termômetro.
Recipiente de vidro

Reativos: PBS Dulbecco's estéril (Irvine Scientific)
Soro Sintético Substituto (Irvine Scientific).
1-2 Propanediol - PROH (Sigma).
Sacarose - cultura celular (Sigma).
Nitrogênio líquido

B. PREPARO DOS MEIOS DE DESCONGELAMENTO

Solução N°1: Preparar solução mãe a 30% de Soro Sintético Substituto (SSS). 17.5 ml de PBS mais 7.5 ml de SSS. Homogenizar a solução.

Solução N°2: Acrescentar 9.25 ml da Solução N°1 dentro de um tubo cônico e adicionar 0.75 ml de PROH, misturar muito bem. Esta solução é 1.0 M PROH.

Solução N°3: Pesar 0.513 g de sacarose em um tubo cônico e acrescentar 5.0 ml da Solução N°2. Misturar muito bem até que a Sacarose se dissolva completamente. Esta solução é 1.0 M PROH + 0.3 M Sacarose.

Solução N°4: Diluir a Solução N°2 acrescentando 5.0 ml da Solução N°1. Esta solução é 0.5 M PROH.

Solução N°5: Pesar 0.513 g de Sacarose em um tubo cônico e acrescentar 5.0ml da Solução N°4. Misturar muito bem até que a Sacarose se dissolva completamente. Esta solução é 0.5M PROH + 0.3 M Sacarose.

Solução N°6: Pesar 0.513 g de Sacarose em um tubo cônico e acrescentar 5.0 ml da Solução N°1. Esta solução é 0.3 M Sacarose.

Filtrar as soluções antes de usar em tubos cônicos novos.

As soluções podem ser usadas até 48 horas depois de preparadas se armazenadas a 4°C.

PROCEDIMENTO:

- Preparar os multipoços - 1 placa por cada palheta que será descongelada. Identifique-a da seguinte maneira:
- Nome da paciente na parte superior.
- Poço N°1 marcar com 1.0M PROH + 0.3 M Sacarose (Sol. N° 3)
- Poço N°2 marcar com 0.5M PROH + 0.3 M Sacarose (Sol. N° 5)
- Poço N°3 marcar com 0.3 M Sacarose (Sol. N° 6)
- Poço N°4 marcar com PBS com 20% SSS (Sol. n° 1)

- Acrescentar 0.8ml de cada solução em seu poço correspondente. Todas as soluções devem ser usadas à temperatura ambiente.
- Preparar um tubo Falcon de 6.0 ml por cada palheta que será descongelada. Marcar com o nome da paciente e número da palheta. Acrescentar 1.0 ml de Solução N°1.

C. PROTOCOLO DE DESCONGELAMENTO

1. Preparar a água a 30°C no recipiente de vidro.
2. Remover a palheta do Nitrogênio Líquido e começar a medir o tempo (sustentar a palheta com uma pinça metálica para evitar a transferência de calor). Descongelar a palheta à temperatura ambiente por 30 segundos. Limpá-la com um lenço descartável e confirmar a integridade da palheta.
3. Submergir a palheta na água a 30°C por 40 a 50 segundos, sem agitar.
4. Remover e secar suavemente o excesso de água com um lenço descartável. Com a tesoura, cortar o extremo que foi selado com calor, acoplar uma seringa de 1.0 ml e cortar o extremo que vem selado de fábrica. Suavemente, expulsar os embriões no poço N°1 (1.0 M PROH + 0.3 M Sacarose) e deixá-los por 5 minutos.
5. Transferir os oócitos ao poço N°2 (0.5 M PROH + 0.3 M Sacarose) por 5 minutos.
6. Transferir os oócitos ao poço N°3 (0.3 M Sacarose) por 10 minutos.
7. Transferir os oócitos ao poço N°4 (PBS + 20% SSS) por 10 minutos.
8. Transferir os embriões à incubadora a 37°C pelo menos uma hora antes de serem injetados para ICSI.

3. CRIOPRESERVAÇÃO DE ZIGOTOS E EMBRIÕES

A criopreservação de embriões tornou-se uma tecnologia modelo em reprodução humana, pois oferece uma alternativa adicional para a obtenção da gestação, já que os embriões restantes, que não foram transferidos, são armazenados e transferidos em um ciclo posterior. Falta esclarecer qual é a melhor etapa para a criopreservação do embrião. Em uma época, pensou-se que congelar embriões em uma etapa precoce era a melhor estratégia para evitar a cultura prolongada em condições sub-ótimas. Por este motivo, no início, muitos embriões foram congelados desta maneira.

Vantagens e desvantagens de congelar em cada etapa

> Zigotos

- Maximiza-se o número de zigotos congelados, pois não se realiza seleção embrionária ao congelar.
- Não permite a seleção baseada na morfologia de um embrião clivado; além disso, não é possível saber se os zigotos deixados para cultura serão os embriões de melhor qualidade.
- Diminui o trabalho de cultura de embriões até etapas posteriores.
- A taxa de sobrevivência é comparável à de embriões clivados.
- É possível congelar zigotos naquelas pacientes que apresentam síndrome de hiperestimulação ovariana.
- Caso não ocorra a singamia, existe menos questionamento quanto ao congelamento do ponto de vista ético.

> Embriões

- Permite a seleção embrionária com base no seu desenvolvimento e características morfológicas.
- Os embriões clivados têm uma alta taxa de sobrevivência.
- A vantagem de congelar no dia 3 (D3) em relação ao dia 2 (D2) é evitar congelar os embriões detidos na etapa de 4 células.

A. PROTOCOLO DE CONGELAMENTO

O protocolo de congelamento lento utilizando propanodiol (PROH 1.5 M), Sacarose (0.1 M) tem mostrado bons resultados quando os embriões são congelados lentamente, podendo-se esperar uma taxa de sobrevida de 78% de embriões clivados descongelados. Existem kits comerciais com estas concentrações que permitem padronizar a técnica, já que às vezes é difícil manter a consistência na qualidade da água e dos solutos das soluções preparadas no laboratório.

O momento de transferir os embriões descongelados dependerá de seu estado de congelamento e a determinação da ovulação pelo pico de LH em um ciclo natural ou pela substituição com esteróides em um ciclo artificial. Uma vez determinada a ovulação, decide-se o dia da transferência, com base no ultra-som do endométrio. Realiza-se o descongelamento um dia antes da transferência, o que indica que o laboratório deve ser preparado dois dias antes. Se o congelamento ocorreu em estado de pronúcleo, descongela-se um ou dois dias antes, deixa-se crescer 24 h, realizando-se a transferência em estágio de 4 células, como se fosse uma transferência em dia 2 ou 48 h em estágio de 8 células. Se o congelamento ocorreu no terceiro dia, estágios de 4, 6, 8 células, descongela-se no dia anterior à transferência, cultiva-se um dia e transfere-se como se fosse dia 4. O descongelamento com um dia de cultura e crescimento dos embriões permitirá ter um critério duplo de sobrevida. A sobrevida no momento do descongelamento permitirá conhecer a integridade morfológica do embrião ao obter-se a porcentagem de células que sobreviveram ao descongelamento. O crescimento ao dia seguinte permitirá observar se as células continuam sua divisão e o embrião altera sua aparência. Desta maneira, só se transferem embriões que tenham continuado sua divisão. Caso no dia da transferência os embriões descongelados no dia anterior não tenham clivado ou haja somente um embrião para transferir e existam mais embriões congelados, descongela-se pela manhã outros embriões e efetua-se a transferência sem observar o crescimento. Outro critério é cultivar os embriões até o estágio de blastocisto. Aqueles que chegarem a esta etapa possuem uma maior taxa de implantação.

B. TÉCNICA

Antes do congelamento, realiza-se uma classificação dos zigotos e embriões.

MATERIAIS

- Placa Nunc de 4 poços.
- Placa de Petri de 35x 10 mm.
- Pipetas Pasteur.
- Pipetas de 10 ml, 5 ml e 1 ml.
- Frasco de 50 ml.
- Filtro de 0,22 μm .
- Seringas de 10 ml.
- Tubos cônicos graduados.
- Seringa de 1 ml.
- Pinças.
- Cronômetro.
- Etiqueta para marcar
- Marcadores indeléveis
- Palhetas
- Raquis

Reativos no caso do preparo dos meios de congelamento:

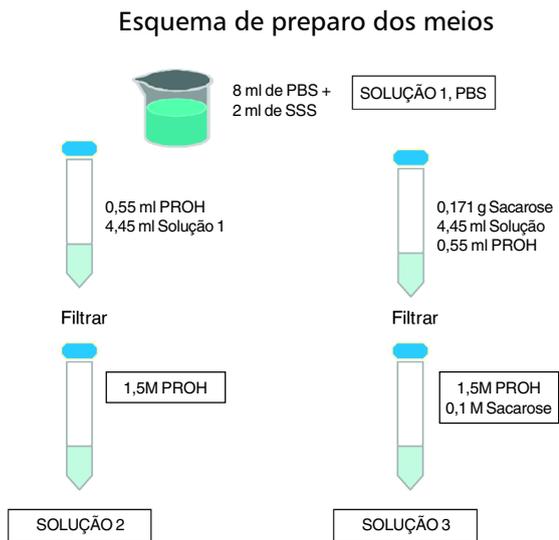
- PBS Dulbecco's estéril (Irvine Scientific).
- Soro sintético substituto (SSS) (Irvine Scientific).
- 1-2 Propanodiol - (PROH) (Sigma, P 1009, p6209).
- Sacarose - cultura celular (Sigma, S 1888).
- Nitrogênio líquido

Meios de congelamento

- **Solução Nº 1:** (Solução Mãe): Preparar 10 ml de PBS suplementado com 20% de SSS, tomando 8 ml de PBS e 2 ml de SSS. Homogeneizar a mistura.
- **Solução Nº 2:** (PROH 1,5 M): Colocar 4,45 ml da solução Nº 1 em um tubo cônico de 15 ml e acrescentar 0,55 ml de PROH. Homogeneizar a mistura.
- **Solução Nº 3:** (PROH 1,5 M + sacarose 0,1 M). Pesar em um tubo cônico de 15 ml, 0.171 g de sacarose. Colocar 4,45 ml da solução Nº 1 e acrescentar 0,55 ml de PROH. Homogeneizar até que a sacarose se dissolva totalmente.

Filtrar as soluções com filtro de 0,22 μm antes de usar. As soluções têm uma duração de 48 h mantidas a 4° C.

No esquema, apresenta-se um resumo do procedimento de preparo das soluções:



PREPARO DA PLACA DE CONGELAMENTO

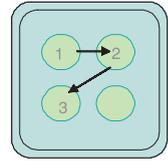
- Retirar as soluções de congelamento da geladeira para que se equilibre à temperatura ambiente.
- Distribuí-las em placa Nunc de 4 poços. Depositar o PBS + 20% HSA - poço nº 1, 1.5M PROH - poço nº 2, 1.5M PROH + 0.1M Sacarose poço nº 3 e no centro da placa.

PROCEDIMENTO DE CONGELAMENTO

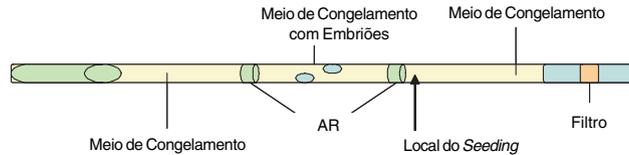
1. Classificar os embriões a serem congelados e colocá-los juntos em uma gota de cultura na incubadora.
2. Preparar todos os materiais necessários com antecedência: meios de congelamento à temperatura ambiente, palhetas, etiquetas, raqui, pinça, tesoura.
3. Etiquetar as palhetas.
4. Lavar as palhetas, com a solução nº 3, **1.5M PROH + 0.1M Sacarose**.
5. Preencher o tanque de Nitrogênio do Planner e conectá-lo. Esperar que a pressão chegue a 5 lb.

6. Colocar os embriões no poço nº 1 **PBS + HSA** para equilibrá-los ao lavar.

7. Transferir os embriões ao poço nº 2, **1.5M PROH**, deixando-os por 5 min. Neste momento, ligar o Planner para que chegue à temperatura inicial (22°C).



8. Passar os embriões em dupla à solução nº 3, **1.5M PROH + 0.1M Sacarose**, deixar que submerjam. Conectar a palheta à injetadora e aspirar 3 cm de meio; fazer bolha de ar de 0.2 cm; aspirar 2 cm. de solução com os embriões; 0.2 cm de ar, e 2 cm de solução até chegar ao algodão. Deixar ar ao final para poder selar. Não preencher toda a palheta de solução, pois poderia estourar ao ser congelada.



9. Colocar as palhetas, na máquina e começar o congelamento.

10. A formação de cristais se realiza a -7.5°C . Pegue uma pinça metálica, resfrie em recipiente contendo Nitrogênio líquido. Levante a palheta pela etiqueta e pressione a borda inferior da gota superior. Observa-se uma nuvem branca de gelo; arraste a pinça até a bolha de ar aproximando-se à borda superior da gota do meio sem tocá-la. Proceda do mesmo modo em cada palheta, de maneira rápida para não afetar a temperatura.

11. Continuar o congelamento e ao finalizar, transfira as palhetas, a uma raqui identificada e resfriada em um recipiente com Nitrogênio líquido.

12. Transferir as raquis ao tanque. Se sobrar espaço entre as palhetas e raquis, preencher com papel para que elas não flutuem.

Programa de criopreservação de embriões e zigotos

Temperatura ambiente (22 °C) até -7.5°C a $-2^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$

Hold de 10 minutos

Realizar o *seeding* e sustentar a temperatura por 5 minutos mais

-7.5°C a -30°C a $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$

-30°C Submergir em Nitrogênio líquido para armazenamento.

DESCONGELAMENTO DE EMBRIÕES

O descongelamento de embriões pode ser realizado no dia anterior ou no mesmo dia da transferência e considera-se que o embrião sobrevive se pelo menos 50% dos blastômeros que se congelaram originalmente permanecerem intactos. Se o descongelamento ocorrer no dia anterior à transferência, transferem-se somente os embriões que clivaram.

MATERIAIS

- Placa de Petri de 35x 10 mm.
- Pipetas Pasteur.
- Pipetas de 10 ml, 5 ml e 1,0 ml.
- Frasco de 50 ml.
- Filtro de 0,22 μm .
- Seringas de 10 ml.
- Tubos cônicos graduados.
- Seringa de 1 ml.
- Pinças.
- Cronômetro.
- Placa Nunc de 4 poços
- Lenços descartáveis.
- Tesouras.
- Termômetro.

REATIVOS:

- PBS Dulbecco's estéril (Irvine Scientific).
- Soro sintético substituto (SSS) (Irvine Scientific).
- 1-2 Propanodiol- (PROH) (Sigma, P 1009, P6209)
- Sacarose - cultura celular (Sigma, S 1888).
- Nitrogênio líquido

PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE DESCONGELAMENTO

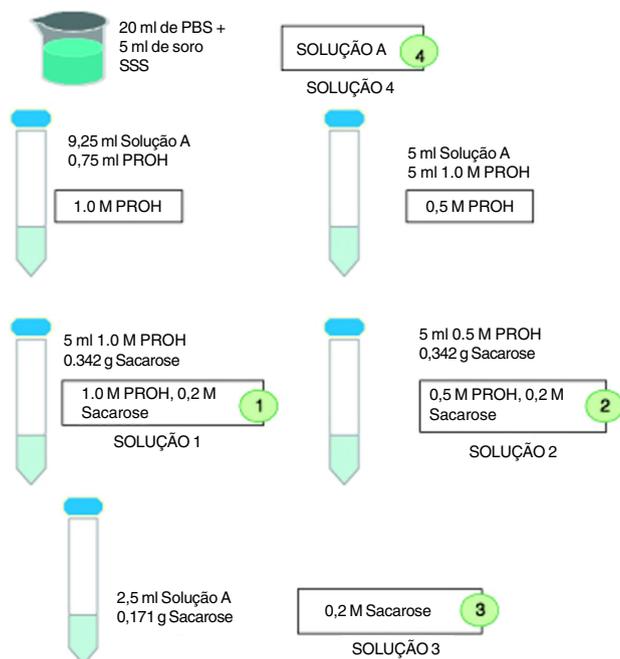
- **Solução A ou Solução Nº 4:** Preparar a solução mãe a 20% de soro sintético substituto (SSS), 20 ml de PBS mais 5,0 ml de SSS. Homogeneizar a solução.
- **Solução B:** Acrescentar 9,25 ml da solução A dentro de um tubo cônico e adicionar 0,75 ml de PROH, misturar muito bem. Esta solução é 1,0 M PROH.
- **Solução Nº 1:** Pesar 0,342 g de sacarose em um tubo cônico e acrescentar 5,0 ml da solução B. Misturar muito bem até que a sacarose se dissolva completamente. Esta solução é 1,0M PROH + 0.2 M sacarose.
- **Solução C:** Acrescentar aos 5 ml de solução B que sobrar no tubo + 5,0 ml de solução A. Esta solução é 0,5 M PROH.

- **Solução Nº 2:** Pesar 0,342 g de sacarose em um tubo cônico e acrescentar 5,0 ml da solução C. Misturar muito bem até que a sacarose se dissolva completamente. Esta solução é 0,5 M PROH + 0,2 M. Sacarose.
- **Solução Nº 3:** Pesar 0,342 g de sacarose em um tubo cônico e acrescentar 5,0 ml da solução A. Também pode-se pesar 0,171 g de sacarose e acrescentar 2,5 ml de solução A. Esta solução é 0,2 M. sacarose

Filtrar as soluções antes de usá-las em tubos novos. As soluções são armazenadas a 4° C, podem ser usadas até 48 horas pós preparo.

No esquema a seguir, apresenta-se um resumo do procedimento de preparo de meios de descongelamento:

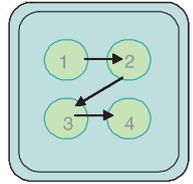
Esquema de preparo de meios de descongelamento



PREPARO DA PLACA DE DESCONGELAMENTO

- Retirar da geladeira a solução de descongelamento e o óleo da incubadora para que se equilibre à temperatura ambiente.

- Colocar em uma placa Nunc de 4 poços de maneira inversa (começando pelo poço nº 4); cada solução em seu poço. Colocar o PBS no poço nº 4, 0.2 M Sacarose no poço nº 3, 0.5M PROH + 0.2 M. Sacarose no poço nº 2 e 1.0 M PROH + 0.2 M. Sacarose no poço nº 1 e no centro da placa.
- Cobrir cada poço com o óleo.



A. Descongelamento de embriões

1. Preparar todos os materiais necessários com antecedência.
2. No dia anterior, deixar equilibrar uma placa de cultura com microgotas de 20 μ l, coberta com óleo.
3. Banho a 30° C, meio de descongelamento e óleo a temperatura ambiente, porta palheta, pinça, tesoura.
4. Selecionar a palheta a ser descongelada e expô-la ao ar por 40 segundos, sustentá-la com uma pinça pela borda da etiqueta.
5. Limpar a palheta com um lenço descartável e submergir no banho a 30° C por 30 segundos.
6. Enxugar a palheta com um lenço descartável. Realizar o descongelamento dentro do fluxo laminar à temperatura ambiente. Com uma tesoura, cortar a ponta selada com calor. Colocar a ponta da palheta dentro do centro da placa e olhando no estereoscópio, cortar a ponta de cima levemente, observando como saem o líquido e os embriões. Transferir os embriões ao poço nº 1: 1.0 M PROH + 0.2M Sacarose e deixá-los por 5 minutos.
7. Transferir os embriões ao poço nº 2: 0.5 M PROH + 0.2M Sacarose por 5 min.
8. Transferir os embriões ao poço nº 3: 0.2 M Sacarose por 10 min.
9. Transferir os embriões ao poço nº 4: PBS+20% HSA por 10 min.
10. Colocar filme de PVC ao redor da placa e colocá-la a 37°C, por 10 minutos.
11. Transferir os embriões a uma placa de cultura de 35 mm com microgotas de 20 μ l de meio de cultura, coberta de óleo preparada no dia anterior.

12. Classificar os embriões individualmente e deixá-los por 24 horas em cultura para avaliar sua divisão celular.
13. Classificar os embriões; somente aqueles que sofreram divisão celular serão transferidos.

4. TÓPICOS PARA MELHORAR A TAXA DE SOBREVIVÊNCIA DOS EMBRIÕES.

.....

A. Congelamento

- O meio de congelamento deve estar à temperatura ambiente aproximadamente meia hora fora da geladeira.
- Realizar o congelamento à temperatura ambiente, fora de platina de aquecimento ou fluxo laminar de superfície a 37°C.
- Ao agregar o crioprotetor, o embrião perde água intracelular e se encolhe, em seguida entra o crioprotetor e retoma seu tamanho. Este passo pode ser observado com uma lupa para confirmar o processo.
- A placa de congelamento com os embriões não deve ser deixada na lupa, pois a luz aquece o meio.
- Ao transferir os embriões de um meio ao outro, deve-se ter cuidado de transferir a menor quantidade do meio anterior e enxaguar o embrião no novo meio 3 vezes com cuidado.
- O instrumento para passar os embriões pode ser pipetas Pasteur estiradas ou "stripper".
- Realizar o *seeding* manual no protocolo de congelamento lento.
- Deve-se colocar no programa de congelamento uma parada a -7.5 ou -8.0° C para realizar o *seeding*. Este é realizado tendo próximo um recipiente com nitrogênio líquido e duas pinças de metal. Introduce-se a pinça no nitrogênio, retira-se a parte superior da palheta e coloca-se a pinça apertando levemente o menisco inferior da parte superior da palheta, arrastando-a até a parte de ar que o separa da gota seguinte onde estão os embriões. Observa-se a formação de uma nuvem branca de gelo. Continua-se da mesma maneira para todas as palhetas. Continuar com o programa de congelamento. É importante manter na temperatura de *seeding* 5 minutos para que ocorra o equilíbrio antes de realizar o *seeding*.

- Manuseio rápido das amostras congeladas. Ao terminar o programa de congelamento e chegar à temperatura desejada, passar as palhetas a um recipiente com nitrogênio líquido, cobrindo-as totalmente. Transferir para a raqui e para o tanque de armazenamento, rapidamente, pois menos de 40 segundos de exposição à temperatura ambiente pode ocasionar alterações que afetam a sobrevivência dos embriões.
- Evitar colocar os dedos sobre as palhetas, pois transmite calor e descongelam-se.

B. Descongelamento

- Ao identificar a amostra para ser descongelada, manter a raqui submersa em nitrogênio líquido, retirar as palhetas a serem descongeladas.
- Manter sempre um recipiente com nitrogênio líquido para retirar as palhetas da raqui e confirmar os dados da paciente antes de descongelá-la.
- Ao introduzir a palheta no banho de água (30°C), não deixar que esta submerja, para que não ocorra a entrada de água, caso esta não esteja bem selada.
- No processo de descongelamento, a taxa de entrada de água ao embrião pode exceder a taxa de saída do crioprotetor, por isso os embriões não sobrevivem. Uma forma de evitar isso é diluir o crioprotetor lentamente em vários passos. Deve-se revisar as soluções usadas, o tempo entre cada passo, a temperatura de descongelamento. Deve-se dar às células tempo suficiente de equilíbrio em cada passo.
- Os embriões são frágeis devido ao choque osmótico a que são expostos. Manuseá-los lentamente é uma boa prática.

5. MANUTENÇÃO DOS EQUIPAMENTOS E PROBLEMAS MAIS FREQUENTES

.....

- Deve-se calibrar o equipamento de congelamento, realizando a manutenção adequada.
- Sugere-se o uso de um monitor externo de temperatura para verificar a temperatura do *seeding*.

- Sugere-se ter uma impressora para assegurar que a curva de congelamento programada seja realizada.
- Checar os pontos de possível fuga de nitrogênio: checar a conexão da bomba de nitrogênio com a mangueira e checar a presença da arandela. Sugere-se deixá-lo conectado em vez de fazê-lo em cada procedimento. Checar se a mangueira de metal possui um material isolado para que mantenha o frio. Checar se o tanque de nitrogênio de alimentação ao sistema possui vácuo, para que o nitrogênio não evapore.
- Manutenção dos níveis de nitrogênio dos tanques de armazenamento.

PLANILHA DE CONGELAMENTO DE ZIGOTOS E EMBRIÕES

Nome da paciente: _____ Data aspiração: _____
 Nome do esposo: _____ Data congelamento: _____
 Número do congelamento: _____
 Ciclo natural: _____ Reposição hormonal: _____
 Estado de congelamento: PN ___ D2 ___ D3 ___

EMBRIÃO NÚMERO		1	2	3	4	5	6
1	Núcléolos em distribuição Z1 ou Z2						
2	Clivagem precoce						
3	Número de células no Dia 2						
4	Grau de fragmentação no Dia 2						
5	Multinucleação de blastômeros no Dia 2						
6	Número de células no Dia 3						
7	Grau de fragmentação no Dia 3						
8	Multinucleação de blastômeros no Dia 3						
TOTAL							

Número da palheta	Número de embrião	Estado ou número de células	Qualidade

Método de congelamento: Convencional _____
 Em passos _____
 DMSO _____
 Vitrificação _____

Número do Tanque de nitrogênio líquido: _____
 Número da caneca: _____

Observações _____

Biólogo: _____

PLANILHA DE DESCONGELAMENTO DE ZIGOTOS E EMBRIÕES

Nome da paciente: _____ Data descongelamento: _____

Nome do esposo: _____ Data aspiração: _____

Número do descongelamento: _____ Data congelamento: _____

Ciclo natural: _____ Reposição hormonal: _____

Estado de congelamento: PN ____ D2 ____ D3 ____

	Nº Palieta	Nº Embrão	Aparência Data _____ (Desenho- Foto)	Nº células Grau do embrião Nº células mortas ao descongelar	Aparência Data _____ Desenho-Foto	Nº células Grau do embrião	Hatching	Transferido
1								
2								
3								
4								
5								
6								

Número de embriões descongelados: _____

Número de embriões transferidos: _____

Tipo de transferência: _____

Tipo de catéter: _____

Nº de embriões que ficarão congelados: _____

Observações _____

Biólogo: _____

6. VITRIFICAÇÃO E DESCONGELAMENTO DE OÓCITOS, ZIGOTOS E EMBRIÕES: uma alternativa à criopreservação convencional.

i) Background Físico

A definição física de vitrificação é a solidificação de uma solução (a água é rapidamente esfriada e conformada em um estado como vidro desde a fase líquida) a temperatura muito baixa, não por cristalização do gelo senão por uma elevação extrema da viscosidade durante o esfriamento (4). Em contraste com os protocolos lentos, existe uma característica única de protocolos de esfriamento “rápido” (Tab. 1).

Tabela 1. Benefícios primários da vitrificação

1.	Contato direto entre as células e o nitrogênio líquido
2.	Não há cristalização do gelo
3.	Utilizam-se altas concentrações de crioprotetor (aprox 5.0M), o que permite um tempo muito curto de exposição ao crioprotetor
4.	Vitrificação e aquecimento rápido
5.	O pequeno volume utilizado provoca um aumento significativo nas taxas de esfriamento
6.	As taxas de esfriamento são de 15.000 a 30.000 °C/min (5-7)
7.	Minimiza os danos osmóticos
8.	Reduz o tempo do procedimento de criopreservação (a vitrificação pode realizar-se entre 2 a 10 min.)
9.	Os protocolos são muito simples
10.	Elimina-se o alto custo de equipamentos de congelamento programáveis

Há duas formas para alcançar a vitrificação de água dentro das células:

1. Aumentar a velocidade da condução da temperatura
2. Aumentar a concentração do crioprotetor

Portanto, a vitrificação é o resultado da alta taxa de esfriamento associada à alta concentração de crioprotetor.

ii) A importância das Taxas de Esfriamento

Durante a criopreservação, a taxa de esfriamento é o parâmetro que tem maior impacto sobre uma amostra biológica que é esfriada desde a temperatura fisiológica até a do nitrogênio líquido. Quando as células são submersas no nitrogênio líquido, este se aquece e ebule intensamente (enquanto produz gás nitrogênio), evaporação, e um abrigo de vapor se forma ao redor das células. Como resultado, o vapor que rodeia as células cria um isolamento que corta a transferência de temperatura, e isto provoca uma diminuição da taxa de esfriamento.

No entanto, para alcançar estas taxas mais altas de esfriamento é melhor transferir calor através de líquido em vez de vapor, porque a condutividade em líquido é maior que em vapor. Para aumentar a probabilidade de que a amostra esteja rodeada por líquido em vez de vapor, o tamanho da amostra deve ser minimizado, assim o tamanho do abrigo de vapor também é reduzido e a taxa de esfriamento é aumentada. Além disso, para alcançar as altas taxas de esfriamento, é necessário usar altas concentrações de solução crioprotetora, a qual diminui a formação de cristais de gelo. Uma consequência negativa disso é que às vezes o crioprotetor é muito tóxico. Uma prática comum para reduzir a toxicidade do crioprotetor e não sua efetividade, é colocar as células primeiro em uma solução crioprotetora de menor a maior concentração.

Freqüentemente, a solução de vitrificação pode conter uma combinação quase equimolar de Etileno-glicol (EG) e Dimetil sulfóxido (DMSO). Ao reduzir a quantidade de crioprotetores requeridos, os efeitos osmóticos e tóxicos diminuirão. É possível reduzir a concentração de crioprotetor e assim sua toxicidade, pelas taxas aumentadas de esfriamento e aquecimento (5).

iii) Container para Procedimentos de Vitrificação

Para minimizar o volume da solução de vitrificação, utilizam-se containers especiais durante o processo, chamados OPEN PULLED STRAWS (OPS) (6-10), ou a Flexipet de COOK (5-11). Além disso, estes containers são utilizados para conseguir altas taxas de esfriamento:

- Microgotas (12)
- Grades de cobre para microscopia eletrônica (13-17)
- Rede de nylon (18)
- Cryoloop (5,10,19, 20, 21, 22)

O método de vitrificação OPS (23) tem sido aplicado com sucesso em oócitos bovinos maduros, e em embriões bovinos pré-compactados e em estado de pré-implantação (6), assim como em oócitos maduros humanos e de camundongo. Recentemente, gestações e nascimentos bem sucedidos depois de usar FDP ou OPS para embriões em pronúcleos têm sido relatados (11, 24, 25). Na grade de microscopia eletrônica, blastocistos e oócitos bovinos, assim como zigotos multinucleados têm sido vitrificados com sucesso (15). De modo interessante, um novo dispositivo de vitrificação chamado VITMASTER é capaz de diminuir rapidamente a temperatura no nitrogênio líquido a -205 - 210°C (comparada a -196°C) e isso é obtido criando-se um vácuo parcial, portanto aumenta significativamente a taxa de esfriamento por usar nitrogênio líquido muito viscoso. Este dispositivo de vitrificação foi introduzido por Arav et al. (26) e tem sido usado com sucesso em vitrificação de oócitos bovinos, ovinos e humanos (5, 26, 27).

iv) Tipos de crioprotetores, açúcares e macromoléculas

Os meios tampões usados para vitrificação são Buffer Fosfato Salino (PBS) ou Meio de Cultura com Hepes como o HTF.

O crioprotetor mais comumente aceito para procedimentos de vitrificação é Etileno -glicol (EG; MW 62.02), este parece ter menor efeito tóxico em embriões e blastocistos de camundongo (28-33), difusão e equilíbrio rápidos de EG dentro da célula através da zona pelúcida e à membrana celular (32). As gestações e nascimentos vivos normais obtidos com oócitos e embriões criopreservados em animais (29, 31) e humanos (33-38) sugerem que esta molécula é uma boa escolha para a vitrificação em humanos.

Os aditivos com grandes pesos moleculares, tais como disacárideos tipo sacarose ou trihalose não penetram na membrana celular, mas reduzem significativamente a quantidade de crioprotetor requerido e a toxicidade de EG por diminuir a concentração requerida para obter uma criopreservação bem sucedida de oócitos e embriões humanos. Está claro que as soluções de sacarídeos não-permeáveis podem servir como buffer osmótico para a recuperação bem sucedida de células criopreservadas (39). A incorporação de compostos não permeáveis na solução de vitrificação e a incubação de células nesta solução antes da vitrificação, ajudam a retirar mais água das células, e diminui o tempo de exposição das células aos efeitos tóxicos dos crioprotetores. A sacarose não permeável também atua como um buffer osmótico que pode resultar da diluição do aditivo crioprotetor depois do armazenamento. Além disso, a remoção do agente crioprotetor depois do aquecimento apresenta o problema de ter que reduzir a toxicidade às células. Durante o aquecimento usando uma concentração extracelular de sacarose (por exemplo 1M), balancea-se a alta concentração de crioprotetor dentro da célula, e isso reduz a diferença de osmolaridade entre os compartimentos intra e extra celulares. Esta alta concentração de sacarose não pode evitar totalmente a expansão da célula, mas pode reduzir a velocidade e magnitude da expansão.

Além disso, as macromoléculas polietileno glicol (PEG; PM 8.000), polivinylpirrolidina (PVP; PM 360.000) e Ficoll (PM 70.000 o 400.000) modificam as propriedades de vitrificação das soluções. Alguns estudos tem avaliado o potencial dos efeitos benéficos de acrescentar tais solutos macromoleculares à solução para facilitar a vitrificação dos embriões, por exemplo melhorando muito a viabilidade dos oócitos depois da criopreservação e reduzindo notavelmente a variabilidade vista com as soluções de vitrificação somente (40-44).

Estes polímeros podem proteger os embriões ao moderar o estresse mecânico que ocorre durante o congelamento (41). Eles modificam as propriedades de vitrificação das soluções reduzindo significativamente a quantidade de crioprotetor requerido para alcançar a vitrificação, mas têm pouco ou nenhum efeito na transição a vidro das soluções (43). Estes também influenciam na viscosidade das soluções de vitrificação e reduzem a toxicidade do crioprotetor mediante uma concentração mais baixa. Além disso, os polímeros podem ser capazes de construir uma matriz viscosa para a encapsulação dos embriões que antecede a cristalização durante o esfriamento e o aquecimento (40,44). Muito recentemente, em um estudo, desenhou-se e provou-se soluções crioprotetoras que combinavam concentrações altas de polímeros com crioprotetores pouco penetrantes. Estas combinações resultaram em altas taxas de desenvolvimento de embriões de camundongo de 2 células depois do esfriamento e aquecimento rápidos.

MATERIAIS:

i) Compostos para soluções de vitrificação, manuseio e meios de cultura

- Soro Sintético Substituto, SSS (Irvine Scientific, 99193).
- Etileno glicol (EG) (Sigma, E9129).
- Dimetil sulfoxido (DMSO) (Sigma, D2650).
- Sacarose (Sigma, S1888).
- Polietileno glicol (Sigma, P4463).
- Ficoll (Sigma, F4375).
- Óleo mineral (SAGE BioPharma)
- HTF com HEPES (In-Vitro Care, 2002-5)
- HTF (In-Vitro Care, 2001)

- Meios de cultura de embriões
Dia 1-3: IVC 1 (In-Vitro Care, San Diego, CA)
Dia 3-5, CCM (Vitrolife, Gothenburg, Suécia)

ii) Placas de Vitrificação e cultura

- Placa para procedimento de vitrificação (150326, Nunc, Nalgene)
- Placa de 6 poços para procedimento de aquecimento (Genesis Instruments, Elmwood, WI, USA).

iii) Suportes de gametas e embriões para vitrificação

- Cryoloop (Hampton Research, Laguna Niguel, CA)
- Flexipet-denuding pipette (FDP, Cook IVF, Spencer, IN)
- Hemi-straw system (IVM, L'Aigle, France).
- Palhetas de congelamento de 0,5 ml com lacres plásticos (Cryo Bio Systems, França)
- Pipetas Pasteur de vidro estiradas.

MÉTODOS

i) Usando os suportes

a) Cryoloop (0.5 mm de diâmetro)

Lane e seus colaboradores descreveram pela primeira vez o método de vitrificação utilizando o Cryoloop (20,21). Brevemente, os oócitos são expostos a HM (Hepes Medium) por 10 minutos à temperatura ambiente e em seguida são transferidos à solução de vitrificação 1 (VS1), para logo após serem finalmente transferidos à solução de vitrificação 2 (VS2). Durante este tempo, o loop de nylon é submerso dentro da solução VS2 para criar uma película muito fina de VS2, por tensão superficial, no loop de nylon. Depois de uma exposição muito curta dos oócitos a VS2, eles são colocados dentro dos Cryoloops previamente preenchidos com a película muito fina de VS2 utilizando um Flexipet (FDP) de 140 μm , os oócitos se mantêm por tensão superficial. O Cryoloop com os oócitos é então submerso em nitrogênio líquido e então a tampa é enroscada até fechar o criovial com a ferramenta não metálica que havia sido submersa previamente em nitrogênio líquido. Grade padronizadas são usadas para armazenar os viales em nitrogênio líquido.

b) Pipetas de denudação Flexipet (FDP)

A vitrificação com FDP é um método muito parecido ao método de vitrificação descrito como OPS, o qual foi relatado por Vajta et al (6). Brevemente, os oócitos são previamente tratados com VS1. Depois de pré-esfriar os oócitos, estes são postos em VS2, para depois transferi-los a uma quantidade mínima de VS2 em gotas de 20 μl , desde onde eles são carregados na FDP em aproximadamente 1 a 2 μl de crioprotetor colocando a FDP em um ângulo de 30°, e permitindo que os oócitos subam na FDP por ação da capilaridade. A ponta da pipeta é então submersa diretamente dentro do nitrogênio líquido em um ângulo de 10°, e colocada dentro de uma palheta de 0,25 ml previamente identificada e submersa em nitrogênio líquido.

Em seguida, a palheta é tampada com uma tampa plástica colorida devidamente identificada antes de ser transferida para o tanque de nitrogênio líquido.

c) Sistema de Hemi-Palheta (Hemi-Straw System, HSS)

O procedimento de vitrificação com HSS foi relatado pela primeira vez por Vandervorst et al (45). A palheta de 0,25 ml é preparada da seguinte maneira: cortar um extremo da palheta com um bisturi, de tal modo que este extremo permaneça aberto (aproximadamente 1 cm), para que seja fácil aspirar uma gota pequena ($<1.0\ \mu\text{l}$) dentro da face interna da abertura. Brevemente, os oócitos ou embriões são previamente tratados com VS1. Depois de pré-esfriar os oócitos ou embriões, estes são postos em VS2, para depois serem transferidos a uma quantidade mínima de VS2 em gotas de $20\ \mu\text{l}$, os quais são carregados em um volume pequeno ($<1.0\ \mu\text{l}$) dentro da face interna da abertura da palheta de 0.25 ml (HSS). A HSS é então submersa diretamente dentro do nitrogênio líquido verticalmente, e colocada dentro de uma palheta de 0,5 ml previamente identificada e submersa em nitrogênio líquido ou em um vial de 5ml. Em seguida a palheta é tampada com uma tampa plástica colorida, devidamente identificada, antes de ser transferida para o tanque de nitrogênio líquido.

ii) Vitrificação de Oócitos utilizando o Cryoloop e o Sistema de Hemi-Palheta (Hemi-Straw System ou HSS)

a) Preparo dos meios e passos para o procedimento de vitrificação

Preparar as soluções de vitrificação para oócitos humanos

- A HTF-Hepes 20% SSS (20 ml de HTF-Hepes + 5 ml de SSS)
- B 10% EG, 10% DMSO e 1mg/ml PEG (2.5 ml de EG + 2.5 ml de DMSO + 0,025 g de PEG completar com 25ml solução A). Misture e filtre em um frasco de 50 ml (estéril)
- C 20% EG, 20% DMSO e 1mg/ml PEG, 10 mg/ml Ficoll, e 0.65M de sacarose (5 ml de EG + 5 ml de DMSO + 0,025 g de PEG + 0,025 g de Ficoll + 5,5 g de sacarose completar com 25ml solução A). Misture e filtre em um frasco de 50 ml (estéril)

b) Procedimento:

Manter um recipiente cheio de nitrogênio líquido

1. Em uma placa de 4 poços, à temperatura ambiente, acrescentar 0,5 ml de solução A em um poço.

2. Prepare uma placa de cultura com gotas de 0,1 ml de soluções B, C e uma gota adicional de 20 ml de solução C.
3. Equilibrar os oócitos em solução A por 10 minutos.
4. Esvaziar a pipeta em um espaço limpo, enchê-la com a solução B e pegar os oócitos de solução A.
5. Transferir os oócitos à solução B por 60 segundos, esvaziar a pipeta e carregar solução C.
6. Transferir a C por 20 segundos.
7. Enquanto os oócitos são incubados em solução C, submergir o Cryoloop em solução C para formar a película fina no loop de nylon.
8. Recolha os oócitos e coloque de 4 a 5 no Cryoloop mantidos pela força da tensão superficial. Examinar que todos os oócitos estejam no loop.
9. Submergir o Cryoloop de nylon carregado no nitrogênio líquido, enroscar fortemente a tampa usando a ferramenta não metálica que havia sido submersa previamente no nitrogênio líquido.
10. Colocar o vial em grades e em seguida no tanque de armazenamento.
11. No caso de haver mais oócitos para vitrificar, repetir os passos 1 a 10.

Quando se usa HSS como portador, repetir os passos 1 a 6

7. Carregar os oócitos no extremo aberto da hemi-palheta no menor volume possível.
8. Submergir a hemi- palheta (com os oócitos) diretamente no nitrogênio líquido (verticalmente).
9. Introduzir a hemi-palheta dentro da palheta de 0,5 ml (pré-esfriada em nitrogênio líquido) e tampar com sua tampa plástica colorida, identificando-a adequadamente.
10. Armazene os oócitos no tanque de armazenamento.
11. Caso tenha mais oócitos para vitrificar, repetir os passos 1 a 10.

c) Preparo dos meios para o processo de aquecimento

Preparando as soluções de aquecimento

- A HTF-Hepes 20% SSS (20 ml de HTF-Hepes + 5 ml de SSS)
- B 1.0M de sacarose (8.55 g de sacarose e leve a 25ml com solução A). Misture e filtre em um frasco de 50 ml (estéril)
- C 0.5M de sacarose (4.27 g de sacarose e leve a 25ml com solução A). Misture e filtre em um frasco de 50 ml (estéril)
- D 0.25M de sacarose (2.13 g de sacarose e leve a 25ml com solução A). Misture e filtre em um frasco de 50 ml (estéril)
- E 0.125M de sacarose (1.0 g de sacarose e leve a 25ml com solução A). Misture e filtre em um frasco de 50 ml (estéril)

d) Procedimento

1. A 37°C, preparar uma placa de 6 poços com 1,0 ml das soluções E, D, C, B e A.
2. Remover o Cryoloop de nylon ou a HSS do nitrogênio líquido e colocar o Cryoloop ou a hemi- palheta diretamente na solução B. Esperar 2 minutos.
3. Transferir os oócitos à solução C por 3 minutos.
4. Transferir os oócitos às soluções D e E por 5 minutos cada uma.
5. Transferir os oócitos à solução A e deixar por 5 minutos.
6. Lavar os oócitos na placa de lavagem e incubar para cultura (aproximadamente 4 horas antes de realizar o ICSI).

iii) Vitrificação de Embriões usando Flexipet-Denuding Pipette (FDP)

a) Preparo dos meios e passos para o procedimento de vitrificação

Preparo das soluções de vitrificação para embriões humanos

- A HTF-Hepes 20% SSS (20 ml de HTF-Hepes + 5 ml de SSS)
- B 9% EG (2.25 ml de EG + 22.75 ml de A). Misturar e filtrar em um frasco de 50 ml (estéril)
- C 34% EG, e 1.0 M sacarose (8.5 ml de EG + 8.55 g de sacarose, levar a um volume de 25 ml com A). Misturar e filtrar em um frasco de 50 ml (estéril)

b) Procedimento:

Manter um recipiente cheio de nitrogênio líquido onde possa submergir as palhetas

1. À temperatura ambiente, preparar uma placa de cultura, com gotas de 0,1 ml das soluções B e C, acrescentar uma gota adicional de solução C de 20 ml.
2. À temperatura ambiente, transferir os embriões à solução B por 5 minutos.
3. Esvaziar a pipeta em um espaço limpo, enchê-la com a solução C e pegar os embriões da solução B.
4. Transferir os embriões à solução C por 20 a 30 segundos, em seguida, transferi-los à gota de 20 ml de solução C rapidamente.
5. Carregar 4 a 5 embriões por capilaridade, tocando com o extremo estreito do FDP na solução C.
6. Submergir o FDP carregado diretamente no nitrogênio líquido (em um ângulo de 10°), em seguida, introduzir a FDP dentro de uma palheta de 0,25 ml (pré-esfriada em nitrogênio líquido) e identificada previamente.
7. Tampar com sua tampa plástica colorida, identificando-a adequadamente.
8. Colocar em escadinhas e guardar verticalmente no tanque de armazenamento de embriões.
9. No caso de ter mais embriões para vitrificar, repetir os passos 1 a 8.

c) Preparo dos meios para o processo de aquecimento

Preparando as soluções de aquecimento

- A HTF-Hepes 20% SSS (20 ml de HTF-Hepes + 5 ml de SSS)
- B 1.0M de sacarose (8.55 g de sacarose e leve a 25 ml com A). Misturar e filtrar em um frasco de 50 ml (estéril).
- C 0.5M de sacarose (4.27 g de sacarose e leve a 25ml com solução A). Misturar e filtrar em um frasco de 50 ml (estéril)
- D 0.25M de sacarose (2.13 g de sacarose e leve a 25ml com solução A). Misturar e filtrar em um frasco de 50 ml (estéril)
- E 0.125M de sacarose (1.0 g de sacarose e leve a 25ml com solução A). Misturar e filtrar em um frasco de 50 ml (estéril)

d) Procedimento

1. A 37°C, preparar uma placa de 6 poços com 1,0 ml de soluções D, C, B e A.
2. Remover o FDP do nitrogênio líquido e submergir diretamente na solução B, se expelem os embriões. Esperar 2 minutos.
3. Transferir os embriões à solução C por 2 minutos.
4. Transferir os embriões à solução D por 2 minutos.
5. Transferir os embriões à solução A e deixar por 1 minuto (enxagüar).
6. Transferir os embriões à placa de cultura com HTF-20% SSS.

iv) Vitrificação de embriões de dia 3 utilizando o Cryoloop e o sistema de Hemi-Palheta (Hemi-Straw System o HSS)

a) Preparo dos meios e passos para o procedimento de vitrificação

Preparar as soluções de vitrificação para embriões humanos

- A HTF-Hepes 20% SSS (20 ml de HTF-Hepes + 5 ml de SSS).
- B 10% EG e 10% DMSO (2.5 ml de EG + 2.5 ml de DMSO + 20ml de solução A). Misturar e filtrar em um frasco de 50 ml (estéril).
- C 20% EG, 20% DMSO e 0.40M de sacarose (5 ml de EG + 5 ml de DMSO + 3,4 g de sacarose, levar a 25ml com solução A). Misturar e filtrar em um frasco de 50 ml (estéril).

b) Procedimento:

Manter um recipiente cheio de nitrogênio líquido

1. Em uma placa de cultura, à temperatura ambiente, acrescentar 0,1 ml das soluções B, C e uma gota adicional de 20 ml de solução C.
2. Colocar os embriões na solução B por 4 minutos.
3. Esvaziar a pipeta em um espaço limpo, enchê-la com a solução C e pegar os embriões da solução B.
4. Transferir os embriões à solução C por 20 - 30 segundos, e então levar à gota de 20 ml da solução C.
5. Manter na solução C por 20 segundos.
6. Enquanto os embriões são incubados na solução C, submergir o Cryoloop na solução C para formar a película fina no Cryoloop de nylon.
7. Pegar os embriões e colocar de 4 a 5 no Cryoloop, ajudado pela força da tensão superficial. Certificar-se de que todos os embriões estejam no loop.

8. Submergir o Cryoloop de nylon carregado no nitrogênio líquido, enroscar fortemente a tampa usando a ferramenta não metálica que havia sido submersa previamente no nitrogênio líquido.
9. Colocar o vial em grades e em seguida no tanque de armazenamento.
10. Caso haja mais embriões para vitrificar, repetir os passos 1 a 9.

Quando se usa HSS como portador, repetir os passos de 1 a 5

6. Carregar os embriões no extremo aberto da hemi-palheta no menor volume possível.
7. Submergir a hemi-palheta (com os embriões) diretamente no nitrogênio líquido (verticalmente).
8. Introduzir a hemi-palheta dentro da palheta de 0,5 ml (pré-esfriada em nitrogênio líquido) e tampá-la com sua tampa plástica colorida, identificando-a adequadamente.
9. Armazenar os embriões no tanque de armazenamento.
10. Caso tenha mais embriões para vitrificar, repetir os passos 1 a 9.

c) Preparo dos meios para o processo de aquecimento

Preparando as soluções de aquecimento

- A HTF-Hepes 20% SSS (20 ml de HTF-Hepes + 5 ml de SSS).
- B 1.0M de sacarose (8.55 g de sacarose e leve a 25ml com solução A). Misturar e filtrar em um frasco de 50 ml (estéril).
- C 0.25M de (2.13 g de sacarose e leve a 25ml com solução A). Misturar e filtrar em um frasco de 50 ml (estéril).
- D 0.125M de (1.0 g de sacarose e leve a 25ml com A). Misturar e filtrar em um frasco de 50 ml (estéril).

d) Procedimento

1. A 37°C preparar uma placa de 6 poços com 1,0 ml das soluções D, C, B e A.
2. Remover o Cryoloop de nylon ou a HSS do nitrogênio líquido e colocar o Cryoloop ou a hemi-palheta diretamente na solução B. Esperar 5 minutos.
3. Transferir os embriões à solução C por 3 minutos.

4. Transferir os embriões à solução D por 2 minutos.
5. Transferir os embriões à solução A e deixar por 5 minutos.
6. Transferir os embriões à placa de cultura com CCM 20% SSS, lavar 3 vezes, e incubar para cultura.

CONCLUSÕES

Em conclusão, aumentar a velocidade de condução térmica e diminuir a concentração de crioprotetores é uma estratégia ideal para a criopreservação celular por métodos de vitrificação. Há duas formas de alcançar a vitrificação da água dentro das células eficientemente: a primeira é aumentar a diferença de temperatura entre as mostras e o meio de vitrificação e a segunda é encontrar materiais com uma condução de calor rápida. Entretanto, a taxa atual de procedimentos de vitrificação pode variar extremamente dependendo do dispositivo utilizado, da proeficiência técnica e também do movimento específico de imersão (**Tabela 6**).

É importante mencionar que cada célula tem sua própria taxa de esfriamento, por exemplo, os oócitos são células mais propensas a danificarem-se por frio que outros estados de desenvolvimento, tal como embriões ou blastocistos. O protocolo de vitrificação “universal” ainda não existe. A vitrificação tem tido pouco impacto prático na reprodução humana e é em grande parte ainda experimental, já que: 1) as taxas de sobrevida relatadas têm sido inconsistentes, 2) muitos suportes têm sido usados para vitrificação, 3) muitas soluções têm sido formuladas e isto não tem ajudado a concentrar o esforço em um só enfoque. Por outro lado, os relatos de gestações bem sucedidas obtidas após a vitrificação estimulam mais investigação, mas claramente faz-se necessário melhorar as taxas de sobrevida inconsistentes depois da vitrificação (46).

Tab. 6: Variáveis de vitrificação que podem influenciar profundamente em sua eficiência

1.	Tipo e concentração do crioprotetor (todos os crioprotetores são tóxicos)
2.	O meio base que se utilize (meio de manuseio)
3.	A temperatura à qual é exposta a solução de vitrificação
4.	O intervalo de tempo no qual as células são expostas ao crioprotetor antes de submersas em nitrogênio líquido.
5.	A variabilidade no volume do crioprotetor que rodeia as células
6.	O dispositivo que é usado para a vitrificação (tamanho do abrigo de vapor e taxa de esfriamento)
7.	Proeficiência técnica do embriologista
8.	A qualidade dos oócitos e embriões e seu estado de desenvolvimento
9.	O contato direto do nitrogênio líquido e a solução de vitrificação que contém o material biológico pode ser fonte de contaminação (50-53).



REFERÊNCIAS

1. Chen C. (1986). Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* i: 884-886.
2. Diedrich K, Al-Hassani S, Van der Ven H & Krebs D. (1987). Successful in vitro fertilization of frozen thawed rabbit and human oocyte. *J. In Vitro Fert. Embryo Transfer* 3: 65-69.
3. Van Huem JH, Siebzehruebl ER, Koch R, Trotnow S & Lang N. (1987). Birth after cryopreservation of unfertilized oocytes. *Lancet* i: 752-753.
4. Fahy, G.M., McFarlane, D.R., Angell, C.A., and Meryman H.T. (1984) Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21, 407-426.
5. Liebermann, J., Tucker, M.J., Graham, J.R., Han, T., Davis, A., Mathiopoulou, H., et al. (2002). The importance of cooling rate for successful vitrification of human oocytes: comparison of the Cryoloop con the flexipet. *Biol Reprod* 66 (Suppl 1), 195 abstract 240.
6. Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, P.J., Jacobsen, H., Greve, T. et al. (1998) Open Pulled Straws (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 51, 53-58
7. Chen, S.U., Lien, Y.R., Chen, H.F., Chao, K.H., Ho, H.N., and Yang, Y.S. (2000) Open pulled straws for vitrification of mature mouse oocytes preserve patterns of meiotic spindles and chromosomes better than conventional straws. *Hum Reprod* 15, 2598-2603
8. Chen, S.U., Lien, Y.R., Chao, K.H., Lu, H.F., Ho, H.N., and Yang, Y.S. (2000) Cryopreservation of mature human oocytes by vitrification con ethylene glycol in straws. *Fertil Steril* 74, 804-808.
9. Hurtt, A.E., Landim-Alvarenga, F., Seidel, G.E. Jr., and Squires, E.L. (2000) Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. *Theriogenology* 54, 119-128.
10. Oberstein, N., O'Donovan, M.K., Bruemmer, J.E., Seidel, G.E. Jr., Carnevale, E.M., and Squires, E.L. (2001) Cryopreservation of equine embryos by open pulled straws, Cryoloop, or conventional cooling methods. *Theriogenology* 15, 607-613.

11. Liebermann, J., Tucker, M.J., Graham, J., Han, T., Davis, A., and Levy, M. (2002) Blastocyst development after vitrification of multipronucleate embryos using the flexipet denuding pipette (FDP). *RBMOnline* 4, 146-150.
12. Papis, K., Shimizu, M., and Izaike, Y. (2000) Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology* 15, 651-658.
13. Hong, S.W., Chung, H.M., Lim, J.M., Ko, J.J., Yoon, T.K., Yee, B. et al. (1999) Improved human oocyte development after vitrification: a comparison of thawing methods. *Fertil Steril* 72, 142-146.
14. Park, S.P., Kim, E.Y., Kim, D.I., Park, N.H., Won, Y.S., Yoon, S.H. et al. (1999) Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscopic grid. *Hum Reprod* 14, 2838-2843.
15. Park, S.P., Kim, E.Y., Oh, J.H., Nam, H.K., Lee, K.S., Park, S.Y. et al. (2000) Ultra-rapid freezing of human multipronuclear embryos using electron microscope grids. *Hum Reprod* 15, 1787-1790.
16. Chung, H.M., Hong, S.W., Lim, J.M., Lee, S.H., Cha, W.T., and Ko, J.J. (2000) In vitro blastocyst formation of human oocytes obtained from unstimulated and stimulated cycles after vitrification at various maturational stages. *Fertil Steril* 73, 545-551.
17. Wu J, Zhang L, Wang X. 2001 In vitro maturation, fertilization and embryo development after ultrarapid freezing of immature human oocytes. *Reproduction*, 121(3):389-93
18. Matsumoto, H., Jiang, J.Y., Tanaka, T., Sasada, H., and Sato, E. (2001) Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology* 42, 139-144.
19. Liebermann, J. and Tucker, M.J. (2002) Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification. *Reproduction* 124, 483-489.
20. Lane, M., Schoolcraft, W.B., and Gardner, D.K. (1999) Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel Cryoloop container-less technique. *Fertil Steril* 72, 1073-1078.
21. Lane, M., Bavister, B.D., Lyons, E.A., and Forest, K.T. (1999) Container-less vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nat Biotechnol* 17, 1234-1236.
22. Yeoman, R.P., Gerami-Naini, B., Mitalipov, S., Nusser, K.D., Widmann-Browning, A.A., and Wolf, D.P. (2001) Cryoloop vitrification yields superior survival of Rhesus monkey blastocysts. *Hum Reprod* 16, 1965-1969.

23. Vajta, G., Booth, P.J., Holm, P., Greve, T., and Callesen H. (1997) Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the Open Pulled Straw (OPS) method. *Cryo-Lett* 18, 191-195.
24. Jelinkova, L., Selman, H.A., Arav, A., Strehler, E., Reeka, N., and Sterzik, K. (2002) Twin pregnancy after vitrification of 2-pronuclei human embryos. *Fertil Steril* 77, 412-414.
25. Selman, H.A., and El-Danasouri, I. (2002) Pregnancies derived from vitrified human embriones. *Fertil Steril* 77, 422-423.
26. Arav, A., Zeron, Y., and Ocheretny, A. (2000) A new device and method for vitrification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. *Theriogenology* 53, 248.
27. Isachenko, V., Alabart, J.L., Nawroth, F., Isachenko, E., Vajta, G., and Folch, J. (2001) The open pulled straws vitrification of ovine GV-oocytes: positive effect of rapid cooling or rapid thawing or both? *Cryo-Lett* 22, 157-162.
28. Kasai, M., Hamguchi, Y., Zhu, S.E., Miyake, T., Sakurai, T., and Machida, T. (1992) High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol based solution by a simple method. *Biol Reprod* 46, 1042-1048.
29. Zhu, S.E., Kasai, M., Otoge, H., Sakurai, T., and Machida, T. (1993) Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solutions. *J Reprod Fertil* 98, 139-145.
30. Ali, J., and Shelton, N. (1993) Vitrification of preimplantation stages of mouse embryos. *J Reprod Fertil* 98, 459-465.
31. Ali, J., and Shelton, N. (1993) Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. *J Reprod Fertil* 99, 471-477.
32. Emiliani, S., Van den Bergh, M., Vannin, A.S., Biramane, J., and Englert, Y. (2000) Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse embriones, 4-cell embryos and blastocysts. *Hum Reprod* 15, 905-910.
33. Shaw, J.M., Ward, C., and Trounson, A.O. (1995) Evaluation of propanediol, ethylene glycol, sucrose and antifreeze proteins on the survival of slow-cooled mouse pronuclear and 4-cell embryos. *Hum Reprod* 10, 396-402.
34. Kuleshova, L., Gianaroli, L., Magli, C., Ferraretti, A., and Trounson, A. (1999) Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Hum Reprod* 14, 3077-3079.

35. Yoon TK, Chung HM, Lim JM, Han, S.Y., Ko, J.J., and Cha, K.Y. (2000) Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitrified oocytes in a stimulated in vitro fertilization transfer program. *Fertil Steril* 74, 180-181.
36. Yokota, Y., Sato, S., Yokota, M., Ishikawa, Y., Makita, M., Asada, T. et al. (2000) Successful pregnancy following blastocyst vitrification. *Hum Reprod* 15, 1802-1803.
37. El-Danasouri, I., and Selman, H. (2001) Successful pregnancies and deliveries after a simple vitrification protocol for day 3 human embryos. *Fertil Steril* 76, 400-402.
38. Mukaida, T., Nakamura, S., Tomiyama, T., Wada, S., Kasai, M., and Takahashi, K. (2001) Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts con use of a Cryoloop containerless technique. *Fertil Steril* 76, 618-623.
39. McWilliams, R.B., Gibbons, W.E., and Leibo, S.P. (1995) Osmotic and physiological responses of mouse embriones and human oocytes to mono- and disaccharides. *Hum Reprod* 10, 1163-1171.
40. Kasai, M., Komi, J.H., Takakamo, A., Tsudera, H., Sakurai, T., and Machida, T. (1990) A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, conout appreciable loss of viability. *J Reprod Fertil* 89, 91-97.
41. Dumoulin, J.C., Bergers-Janssen, J.M., Pieters, M.H., Enginsu, M.E., Geraedts, J.P., and Evers, J.L. (1994) The protective effects of polymers in the cryopreservation of human and mouse zonae pellucidiae and embryos. *Fertil Steril* 62, 793-798.
42. O'Neill, L., Paynter, S.J., and Fuller, B.J. (1997) Vitrification of mature mouse oocytes: Improved results following addition of polyethylene glycol to a dimethyl sulfoxide solution. *Cryobiology* 34, 295-301.
43. Shaw, J.M., Kuleshova, L.L., MacFarlane, D.R., and Trounson, A.O. (1997) Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll, or dextran. *Cryobiology* 35, 219-29.
44. Kuleshova, L.L., Shaw, J.M., and Trounson, A.O. (2001) Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. *Cryobiology* 43, 21-31.
45. Vandervorst, M., Vanderzwalmen, P., Standaart, V., Debauche, C., Bertin, G., Zech, H. et al. (2001) Blastocyst transfer after vitrification in a hemi-straw (HS) system. *Hum Reprod* 16(abstract book 1): 153-154. Abstract P-133.
46. Liebermann, J., Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, and Tucker, M.J. (2002) The potential importance of vitrification in reproductive medicine. Minireview. *Biol Reprod* (in press).



Capítulo 5: Cultura e Criopreservação de Blastocistos

A cultura de blastocistos por meios seqüenciais permite diminuir as gestações múltiplas nas Técnicas de Reprodução Assistida (TRA). Até poucos anos atrás, os embriões só podiam ser cultivados em laboratório por dois ou três dias, com uma taxa de implantação de 10-15 %. Com o desenvolvimento do co-cultivo de Menezo (1) e dos meios seqüenciais de Gardner (2), foi possível cultivar embriões viáveis em laboratório até o 5º dia, tendo como consequência as seguintes vantagens:

- O embrião em estado de blastocisto tem maior capacidade de implantação, por isto é possível obter altas taxas de gestação transferindo um menor número de embriões.
- Ao transferir menos embriões, minimiza-se a taxa de gestações múltiplas, um dos principais problemas das técnicas de reprodução assistida (3)
- Em condições naturais, os embriões chegam ao útero no quinto ou sexto dia procedentes da trompa, que é o momento em que o útero possui maior receptividade.
- A transferência de blastocistos não só ajuda a sincronizar o embrião com o trato feminino da mulher, como também facilita a identificação de embriões com pouco ou nenhum potencial de desenvolvimento, o que permite a diminuição do número de embriões a ser congelado.

1. CULTURA DE BLASTOCISTOS EM MEIOS SEQUENCIAIS

Protocolo de Gardner (2004^a)

MATERIAIS

- Meios de cultura seqüenciais para embriões (Vitrolife Gothenburg, Suécia).
- Óleo mineral (Vitrolife Gothenburg, Suécia).
- Placas de cultura 60 x 15 (Nalgene Nunc Internacional, Dinamarca).
- Placas de cultura, Falcon 3037.
- Pipeta automática 5 a 40 µl.
- Ponteiras estéreis.
- Pipetas volumétricas de 1 a 10 ml estéreis.
- Pipetas Pasteur estiradas ou sistemas como Stripper (Mid Atlantic Diagnostics) ou Flexipet denuding pipette (Cook IVF)

PROCEDIMENTO

1. Para os procedimentos de obtenção de oócitos, fecundação (ou microinjeção) e cultura até o estado de 2PN, referir-se aos capítulos anteriores.

Existem vários estabelecimentos comerciais que oferecem meios seqüenciais com diferentes fórmulas e resultados. Gardner recomenda trabalhar com um só sistema de meios seqüenciais para cada paciente, não misturar meios de diferentes sistemas e trabalhar com 6% CO₂, 5% O₂ e 89% N₂.

2. No dia da aspiração folicular, preparar as placas de cultura (60 x 15 mm) com 4 gotas (25 µl) de meio G1, na borda da placa, no sentido horário às 3, 6, 9 e 12 e outras duas gotas no centro da placa, que servirão para lavagem. Cobrir com 9 ml de óleo mineral, acrescentar outros 25 µl de meio a cada gota. Preparar placas Falcon 3037 com 1 ml de meio G1 no centro e 2 ml de meio G1 fora. Não preparar mais de duas placas de uma vez.
3. Deixar as placas em equilíbrio durante a noite (mínimo 4 horas).
4. Avaliar a fecundação e transferir os embriões (2PN) à placa Falcon 3037, lavar três vezes; em seguida transferir os embriões às gotas do lavado da placa 60 x 15 mm, e ir agrupando os embriões nas gotas da borda, em grupos de no máximo 4 embriões.
5. Cultivar os embriões nestas placas até as 72 horas.
6. Na manhã (8 a.m.) do terceiro dia, preparar as placas de meio G2 da mesma maneira como descrevemos para meio G1 (passo # 2). Permitir que as placas se equilibrem na incubadora por pelo menos 4 horas; em seguida, os embriões podem ser transferidos às placas de meio G2, com o mesmo procedimento descrito anteriormente.
7. Os embriões serão cultivados nestas placas até o dia 5
8. No dia 5, os embriões que se desenvolverem a blastocistos serão classificados de acordo com a Escala de Gardner (4), sendo transferidos 1 ou 2 blastocistos (5). A transferência pode ser realizada no meio G2 ou em Embryoglué (6)
9. Os blastocistos excedentes podem ser congelados segundo os protocolos que estão descritos neste manual.

2. CONGELAMENTO LENTO DE BLASTOCISTOS

Este protocolo foi descrito por Menezo (1997 e 2001) para congelar blastocistos obtidos por co-cultivo.

Veeck (7) modificou as soluções de congelamento e descongelamento utilizando um buffer Hepes com 20 % de proteínas, o que produziu uma melhora considerável nos resultados.

MATERIAIS

- Placas de 4 poços (Nunc, Nalgene).
- Soro Sintético Substituto, SSS (Irvine Scientific, 99193).
- Meio HTF-Hepes (Irvine, 9962).
- Sacarose (Sigma, S1888).
- Glicerol (Sigma, G2025).
- Palheta de 0,5 ml com tampa (Cryo Bio Systems, France).
- Pipetas Pasteur estiradas.

PREPARO DAS SOLUÇÕES DE CONGELAMENTO:

Solução A: Meio de cultura com buffer bicarbonato

Solução B: 5% Glicerol em meio de cultura A. (6,25 g de Glicerol/ L)

Solução C: 9% Glicerol 0.2M Sacarose em meio de cultura A. (11,3 g de Glicerol/ L)

PROCEDIMENTO:

1. Preparar uma placa de 4 poços, com soluções A, B e C.
2. À temperatura ambiente, transferir os blastocistos à solução A por 1 minuto.
3. Transferir os blastocistos à solução B, por 10 minutos.
4. Transferir os blastocistos à solução C, por 10 minutos.
5. Carregar os blastocistos na palheta.
6. Colocar as palhetas no congelador de embriões.
7. Iniciar o programa de congelamento a 26°C, levar a -7 °C a uma taxa de 2° C por minutos. Realizar o *seeding* manual e esperar 10 minutos. Levar a -38°C a uma taxa de 0.3 °C por minutos. Submergir a palheta em nitrogênio líquido. Guardá-la no botijão de armazenamento de embriões.

DESCONGELAMENTO

PREPARO DAS SOLUÇÕES DE DESCONGELAMENTO PARA BLASTOCISTOS HUMANOS

Solução A: Meio de cultura com buffer bicarbonato 0,5 M Sacarose

Solução B: Meio de cultura com buffer bicarbonato 0,2 M Sacarose

Solução C: Meio de cultura para blastocisto

PROCEDIMENTO

1. Remover a palheta do nitrogênio líquido
2. Descongelar a palheta 1 minuto à temperatura ambiente.
3. Submergir a palheta na água a 30°C por 1 minutos.
4. Expelir os embriões em uma placa de cultura estéril.
5. À temperatura ambiente, transferir os blastocistos à solução A por 10 minutos.
6. Transferir os blastocistos à solução B por 10 minutos.
7. Transferir os blastocistos à solução C e cultivar a 37°C em incubadora de CO₂ por 2 horas; caso veja a re-expansão, lavar em solução C fresca e transferir ao útero.

NOTA: todos os meios de congelamento e descongelamento preparados comercialmente e prontos para seu uso podem ser adquiridos em Sage Biopharma: 1-) Quinn´s Advantage Blastocyst freezing kit, 3 x 12, ART-8015, 2-) Quinn´s Advantage Blastocyst thaw kit, 3 x 12, ART-8016. G-Freezekit Blast 10075, G-Thawkit Blast 10076.

3. VITRIFICAÇÃO DE BLASTOCISTOS COM O SISTEMA DE HEMI-PALHETA (HEMI-STRAW)

Este procedimento foi descrito por Liebermann e Tucker em 2002 (8), como alternativa aos procedimentos de congelamento convencionais.

PROTOCOLO DE VITRIFICAÇÃO

MATERIAIS

- Placas de 4 poços (Nunc, Nalgene).
- Placa para procedimento de vitrificação (150326, Nunc, Nalgene)
- Soro Sintético Substituto, SSS (Irvine Scientific, 99193).
- Meio HTF-Hepes (Irvine, 9962).
- Meios de cultura de embriões Dia 3-5, CCM (Vitrolife Gothenburg, Suécia).
- Sacarose (Sigma, S1888).
- Etileno Glicol (EG) (Sigma, E9129).
- Hemi-straw system (IVM, 'Aigle, France).
- Palheta de 0,5 ml com tampa (Cryo Bio Systems, France).
- Pipetas Pasteur estiradas.

PREPARO DAS SOLUÇÕES DE VITRIFICAÇÃO

Solução A: HTF-Hepes 20% SSS (20 ml de HTF-Hepes + 5 ml de SSS)

Solução B: 10% EG (2.5 ml de EG + 22.5 ml de A). Misture e filtre em um frasco de 50 ml (estéril)

Solução C: 40% EG, e 0.40 M sacarose (10 ml de EG + 3.4 g de sacarose, levar a um volume de 25 ml com A). Misture e filtre em um frasco de 50 ml (estéril)

PROCEDIMENTO:

Manter um recipiente cheio de nitrogênio líquido onde possa submergir as palhetas.

1. À temperatura ambiente, preparar uma placa de cultura, com gotas de 0,1 ml de B e C, acrescentar uma gota adicional de C de 20 μ l.
2. À temperatura ambiente, transferir os blastocistos à solução B por 4 minutos.
3. Esvaziar a pipeta em um espaço limpo, enchê-la com a solução C e pegar os blastocistos de B.
4. Transferir os blastocistos à solução C por 20 a 30 segundos; em seguida, transferi-los à gota de 20 μ l de C.
5. Deixar os blastocistos nesta gota por 20 segundos.
6. Carregar os blastocistos no extremo aberto da hemi-palheta no menor volume possível.

7. Submergir a hemi-palheta (com os blastocistos) diretamente em nitrogênio líquido (verticalmente).
8. Introduzir a hemi-palheta dentro da palheta de 0,5 ml (pré-esfriada em nitrogênio líquido) e tampá-la com sua tampa plástica colorida, identificando-a adequadamente.
9. Guardar os blastocistos no botijão de armazenamento de embriões.
10. No caso de haver mais blastocistos para vitrificar, repetir os passos 1 a 9.

DESCONGELAMENTO

PREPARO DAS SOLUÇÕES DE AQUECIMENTO PARA BLASTOCISTOS HUMANOS

Solução A: HTF-Hepes 20% SSS (20 ml de HTF-Hepes + 5 ml de SSS)

Solução B: 0.125 M sacarose (1.0 g de sacarosa, levar a um volume de 25 ml com A). Misture e filtre em um frasco de 50 ml (estéril)

PROCEDIMENTO

1. A 37°C, preparar uma placa de 4 poços, um poço com B, e 3 poços com meio CCM 20% SSS equilibrado.
2. Remover a palheta do nitrogênio líquido, retirar a hemi-palheta com blastocistos, e colocá-la diretamente no extremo com os blastocistos em B, manter por 5 minutos.
3. Transferir os blastocistos ao meio CCM 20% SSS equilibrado, lavar três vezes e incubar para cultivo.

1. Ménézó Y, Sakkas D, Veiga A. 2001. Cryopreservation of blastocysts.



REFERÊNCIAS

- In: ART and the human blastocyst. Serono Symposia USA, Springer-Verlag New York, Inc. 188-195.
2. Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schelenker T and Schoolcraft WB. 1998. Culture and transfer of human blastocyst increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril* 69:84-88.
 3. Milki AA, Fisch JD, Behr B. 1999. Two-blastocyst transfer has similar pregnancy rate and decreased gestation rate compared with three-blastocyst transfer. *Fertil Steril* 72:255-258.
 4. Gardner DK, Lane M, Stevens J et al. 2000. Blastocysts score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril* 73:1155-1158.
 5. Gardner DK, Surrey E, Dinjarez D, Leitz A, Stevens J, Schoolcraft WB. 2004. Single blastocyst transfer: a prospective randomized trial. *Fertil Steril* 81:551-555
 6. Schoolcraft WB, Lane M, Stevens J, Gardner DK. 2002. Increased hyaluronan concentration in the embryo transfer medium results in a significant increase in human embryo implantation rate. *Fertil Steril* 78(Supplement 1):pS5.
 7. Veeck L. 2004. The Norfolk Experience. In: ART: Where did it come from and where from and where is it headed? . Thirty-Seventh Annual Postgraduate Program ASRM.
 8. Liebermann J, Tucker MJ, Graham JR, Han T, Davis A, Mathiopoulou H, et al. 2002. The importance of cooling rate for successful vitrification of human oocytes: comparison of the cryoloop with the flexipet. *Biol Reprod* 66(Suppl 1), 195 abstract 240.



Capítulo 6: Diagnóstico Genético Pré-implantacional

Segundo Dr. Roberto Coco

O PGD é uma alternativa de diagnóstico pré-natal para identificar anomalias genéticas e cromossômicas antes da implantação ou concepção do embrião. É conhecida por sua sigla PGD (do inglês *Preimplantational Genetics Diagnosis*).

Indica-se o PGD a casais férteis ou inférteis. Nos casais férteis com aumento de risco genético e nos inférteis de causa genética ou não por ter mais possibilidade de concepções cromossomicamente anormais. Neste último grupo de pacientes, como ainda não é possível uma análise de todo o complemento cromossômico, realiza-se o *screening* das aneuploidias mais frequentes (13, 16, 18, 21, 22, X e Y).

O *screening* de aneuploidias é conhecido por sua sigla PGS de acordo ao proposto pelo Consenso da ESHRE.

O PGD envolve a extração de um ou dois blastômeros do pré-embrião com a ajuda de um microscópio e micromanipulador. Como todas as células são totipotenciais nos primeiros dias do desenvolvimento (até o dia 14), considera-se que a extração de um ou dois blastômeros não é prejudicial para o posterior desenvolvimento normal do embrião.

Em um embrião, todos os seus blastômeros deveriam ser idênticos à constituição genética determinada no momento da fecundação dos gametas. Portanto, com o estudo de um ou dois blastômeros, é possível conhecer a constituição genética do embrião.

Devido ao fato de que aproximadamente 40% dos oócitos fecundados ficam detidos antes do 3º dia, não é aconselhável realizar a biópsia embrionária antes desse dia. Realizá-la somente naqueles embriões que atingiram o desenvolvimento de 8 células para assegurar-se de que o estudo foi realizado em embriões viáveis, pois 80% dos pré-embriões que atingiram o estágio de 8 células até o 3º dia prosseguem seu desenvolvimento até blastocisto. Deste modo, os pré-embriões diagnosticados como normais que atingem o estágio de blastocisto são potencialmente implantáveis.

Deve-se completar o estudo genético em um ou dois dias para realizar a transferência embrionária no 5º ou 6º dia, do contrário, eles deverão ser congelados para posterior transferência.

Transferem-se somente os embriões viáveis livres da possível desordem genética avaliada no PGD.

Portanto, o PGD não assegura o nascimento normal de um bebê, mas minimiza a possibilidade da criança nascer com a desordem genética para o qual realmente tem maior risco de que ocorra, pois estuda-se somente a anomalia em risco e não todo o complemento cromossômico e/ou gênico.

1. QUEM PODERIA REALIZAR PGD?

Pode-se dizer que o PGD apresenta benefícios para:

- Mulheres > 35 anos que desejam uma gravidez evolutiva.
- Homens com sêmen severamente alterado.
- Mulheres portadoras de doenças genéticas ligadas ao cromossomo X.
- Homens portadores de doenças genéticas ligadas ao cromossomo Y.
- Mulheres ou homens com translocações cromossômicas ou outras anomalias.
- Casais com várias tentativas fracassadas de procedimentos de FIV/ICSI.
- Casais com abortos repetidos por causa cromossômica.
- Pessoas portadoras de doenças recessivas ou dominantes, autossômicas ou ligadas ao sexo.

2. AS PRINCIPAIS VANTAGENS DO PGD.

As principais vantagens do PGD são:

- Maior chance de ter filhos livres da desordem genética que possam possuir.
- Evitar que o casal viva a angústia de ter que decidir entre conservar ou abortar um feto anormal, pois realiza-se o estudo antes da concepção, diferentemente do diagnóstico genético pré-natal convencional que se realiza entre o primeiro e segundo trimestre da gestação.
- Maior taxa de gravidez evolutiva por diminuir significativamente a taxa de aborto espontâneo ao transferir embriões sem as anomalias cromossômicas que podem ocorrer mais freqüentemente, pois a sobrevivência dos embriões anormais é significativamente menor em relação aos embriões normais.
- Diminuir a incidência de muitas desordens genéticas.
- A redução significativa dos custos médicos.
- Evitar o desgaste emocional de ter um filho com alguma desordem genética.

3. COMO SE REALIZA O PGD?

.....

Apesar de existir a possibilidade de recuperar os pré-embriões originados no corpo da mãe com lavagens uterinas, aconselha-se obtê-los com os procedimentos de fertilização “*in vitro*”. Além disso, para minimizar os riscos de contaminação com células parentais e/ou alheias, recomenda-se a ICSI, onde o profissional injeta somente um espermatozóide em cada um dos óvulos desprovidos de células da granulosa. Uma ou duas células, dependendo dos estudos a serem realizados, serão extraídas de cada um dos pré-embriões de 8 células e posteriormente serão analisados de acordo com a desordem que os afeta.

Deve-se completar o diagnóstico dos mesmos no máximo em dois dias, para poder transferir a fresco aqueles blastocistos livres da desordem genética; caso contrário, eles deverão ser congelados para posterior transferência. Igualmente, quando se obtém muitos embriões normais, como não é possível transferir todos, deverão ser congelados. Deste modo, o casal com um só procedimento poderia completar o planejamento familiar. Para extrair uma ou duas células do pré-embrião, primeiramente deve-se realizar a abertura da zona pelúcida.

A abertura da zona pelúcida pode ser realizada de várias maneiras (ver esquemas):

- 1) Mecânica: cortando um segmento da mesma com a ajuda de uma pipeta;
- 2) Química: dissolvendo-a com uma solução ácida;
- 3) Com laser: realizando alguns disparos de laser modulados através do sistema ótico do microscópio.

Antes da biópsia, os pré-embriões podem ser colocados em um meio adequado para afrouxar as uniões celulares (PBS sem Ca nem Mg) à temperatura ambiente. Posteriormente, coloca-se cada um dos pré-embriões em microgotas de PBS completo suplementado com 5% de albumina humana sob óleo perfeitamente rotulados. Não convém colocar mais de 2 ou 3 pré-embriões por placa para minimizar a exposição a condições adversas. Com a ajuda do microscópio e micromanipulador, coloca-se o pré-embrião que vai ser biopsiado no centro do campo e o focaliza com objetiva de 400X. Seleciona-se o blastômero que será extraído e o posiciona adequadamente com a micropipeta de sustentação. Realiza-se a perfuração da zona pelúcida e extrai-se o blastômero, aspirando-o suavemente com uma micropipeta de biópsia de blastômeros. A célula aspirada deve conter um só núcleo. Utilizá-la de acordo com o estudo genético indicado. Fixá-la em um lâmina se for para estudo cromossômico e se for gênico colocar em um microtubo contendo ou não solução para lise celular para em seguida realizar a PCR.

4. COMO SE REALIZA A BIÓPSIA?

Contrário a biópsia dos corpúsculos polares, a biópsia de blastômero avalia a contribuição de ambos progenitores. Além disso, permite prevenir desordens ligadas aos cromossomos X ou Y. Como não se pode garantir que todos os oócitos fecundados sobrevivam nos primeiros estágios da embriogênese, essa é mais uma razão para a realização da biópsia de blastômeros, pois sua realização ao terceiro dia nos pré-embriões que atingiram o desenvolvimento de 8 células assegura que estamos trabalhando sobre pré-embriões potencialmente viáveis.

i) Biópsia dos Corpúsculos Polares (CP):

A biópsia do 1º CP prévia a fecundação do óvulo avalia o resultado da primeira divisão meiótica da mulher. Como também podem ocorrer erros durante a segunda divisão do óvulo, é necessário estudar também o 2º CP para evitar erros diagnósticos. A segunda divisão do óvulo completa-se com a penetração do espermatozóide e a fecundação do mesmo. Portanto, a biópsia do 2º CP é realizada quando o óvulo estiver fecundado. Como ambas biópsias não permitem avaliar os erros gametogênicos masculinos e como existe a possibilidade de erros desde a primeira clivagem do óvulo fecundado, prefere-se a biópsia de blastômeros, pois permite avaliar ambas as contribuições parentais. A biópsia de corpúsculos polares é útil somente quando as mulheres têm risco de transmissão de doenças genéticas ou maior possibilidade de originar óvulos cromossomicamente anormais inerentes a idade das mesmas.

ii) Biópsia de Blastômeros

Como foi mencionado acima, para não cometer erros diagnósticos, deve-se biopsiar sempre ambos corpúsculos polares. Nos países onde está proibida a biópsia do pré-embrião, a biópsia do 1º CP prévia à fecundação só indicaria erros durante a primeira divisão meiótica e equivaleria ao estudo genético do óvulo de acordo ao descoberto no primeiro corpúsculo polar, que é um exame indireto. Como o 2º CP aparece logo após a fecundação do óvulo, a realização de sua biópsia teria a mesma conotação que a biópsia pré-embriônica. Quando não houver argumentações filosóficas e/ou legais para expor o óvulo o mínimo possível a condições adversas, a biópsia dos dois corpúsculos polares pode ser simultânea sempre que a análise a realizar for por FISH.

Ao contrário, quando a desordem for gênica, deve-se realizar a biópsia de forma seqüencial, e caso não possa ser realizada pelos motivos já mencionados, a certeza diagnóstica seria muito menor. Devido aos motivos expostos, a maioria dos centros realizam biópsia de blastômeros ao terceiro dia de desenvolvimento com transferência embrionária no mesmo dia, ao quarto ou ao quinto dia.

5. O PGD É SEGURO?

.....

A experiência mundial registrada em mais de 3.000 ciclos de PGD nos demonstra que o procedimento é bastante eficiente, com uma taxa de gravidez evolutiva média de 19% e uma certeza diagnóstica de mais de 90% ou ainda mais alta em determinados estudos genéticos. A porcentagem de erro de 10% inclui os resultados falso positivos e negativos que podem ocorrer.

Os problemas potenciais que poderiam ocorrer com a técnica de FISH são vários: problemas na hibridização, má interpretação dos sinais fluorescentes, a impossibilidade de detectar anomalias estruturais, e a possibilidade de que as células do mesmo embrião tenham diferentes números cromossômicos, ou seja, que o embrião seja um mosaico cromossômico. Portanto, existe a possibilidade de que a constituição da célula estudada não corresponda às células restantes do embrião. Os problemas com os estudos por PCR podem ser devido às complicações durante a amplificação do DNA, às contaminações potenciais com DNA exógeno e outras dificuldades técnicas.

As dificuldades mencionadas poderiam levar a um diagnóstico equivocado que conduziria à não transferência de embriões normais ou à transferência de embriões anormais. Devido à mencionada possibilidade de erro diagnóstico e à possibilidade do mosaicismo genético, recomenda-se a realização do diagnóstico pré-natal CVS (vilo coriônico) ou amniocentese (no líquido amniótico) para confirmar os resultados do PGD ou PGS.

Como o PGD ou o PGS implica em um procedimento de FIV/ICSI conjuntamente com o estudo genético particular prévio à transferência embrionária, pode-se prever, prévio à realização da mesma, o número de pré-embriões não afetados a serem transferidos. Para avaliar o risco genético reprodutivo, deve-se considerar o risco genético de acordo com a desordem e o potencial embriogênico de acordo com a idade materna e/ou função ovariana.

O trabalho do embriologista implica em todo o referente ao procedimento de FIV/ICSI, biópsia embrionária, fixação dos blastômeros para FISH ou sua colocação em um microtubo para estudo por PCR.

O trabalho do geneticista implica propriamente na realização do estudo por FISH ou a realização do estudo por PCR. A exceção é a realização do PGS para ganhar eficiência reprodutiva que não necessariamente tem que ser realizado por um geneticista, e sim por um embriologista capacitado para isso. Para tanto, o centro deve dispor dos materiais e equipamentos necessários para a realização do FISH. Ao contrário, para a realização dos estudos por FISH em caso de portadores de desordens cromossômicas ou mutações gênicas, recomenda-se que sejam efetuados por geneticistas que possuam laboratório dentro ou fora do centro. Quando o embriologista fixa o blastômero na lâmina, deve sempre verificar ao microscópio de fase que o mesmo possua um núcleo adequado para sua análise posterior, caso contrário, deverá biopsiar outra célula. Quando o blastômero for analisado por PCR deve certificar-se de que a célula foi colocada no microtubo e que não ficou na pipeta de transferência. Por isso, para PCR é sempre imprescindível ver que o blastômero a biopsiar tenha núcleo e que a célula não sofreu danos.

6. REQUISITOS PARA REALIZAR O PGD:

.....

- Laboratório de micromanipulação
- Unidade de Genética ou conselheiro genético
- Laboratório de diagnóstico genético a nível cromossômico e molecular.

Recomenda-se que a assessoria prévia seja realizada por um geneticista com conhecimentos em reprodução humana e que consiga prestar esclarecimento ao casal. Assim como os demais diagnósticos pré-natais, nunca deve ser coercitivo. O casal deve ser informado sobre os seguintes pontos:

- Explicação sobre o transtorno genético e o risco que implica para a descendência.
- Opções reprodutivas e as diferentes alternativas de diagnóstico pré-natal.
- Limitações dos estudos genéticos a serem realizados.
- Esclarecer que somente é possível diagnosticar o risco em questão e que não pode-se assegurar o nascimento de uma criança normal.

- Certeza diagnóstica do procedimento.
- Decisão sobre os pré-embriões afetados.
- Decisão sobre o diagnóstico pré-natal uma vez que a gravidez tenha se estabelecido.
- Potencial possibilidade de nascidos com má formações congênitas associadas com o procedimento FIV/ICSI/PGD/PGS.
- Necessidade de continuar avaliando os nascidos.
- Descrição detalhada do procedimento.
- Complicações médicas durante a estimulação ovariana, aspiração e transferência.
- Predição sobre a resposta ovariana.
- Possibilidade de interrupção do ciclo.
- Predição do número de pré-embriões não afetados para transferir.
- Chance concreta de gravidez.
- Risco de gestação múltipla.
- Risco de aborto.

O casal, após haver recebido e entendido cada um dos pontos mencionados, deve aceitar por escrito a realização do procedimento.

A assessoria para a realização de PGS, destinado a ganhar maior eficácia reprodutiva, pode ser realizada pelo especialista em reprodução.

Os critérios para inclusão de pacientes dependem do ponto de vista genético e reprodutivo. Do ponto de vista genético, o diagnóstico tem que ser tecnicamente possível e confiável. Do ponto de vista reprodutivo, a fertilidade do casal tem que ser normal ou reverter-se com o procedimento de FIV/ICSI.

Os critérios de exclusão também dependem dos dois pontos de vista. Do genético, quando o diagnóstico não é confiável e do reprodutivo quando a mulher não tiver ovários funcionantes ou tenha contra-indicações para o procedimento de FIV/ICSI ou suportar uma gestação.

Work-up prévio a um ciclo de PGS:

- Cariótipo do casal.
- De acordo com as sondas a serem utilizadas, testá-las primeiro em cromossomos metafásicos.
- Quando se utiliza sonda DYZ1 (Yq12), testá-las sempre no marido.
- Quando se utiliza sonda D15Z1, testá-la sempre no casal, pois pode hibridizar também com o cromossoma 14.

Work-up prévio a um ciclo de PGD para alterações cromossômicas:

- Reconfirmar sempre a alteração cromossômica.
- Recomenda-se testar as sondas nas metáfases do portador.
- Usar um mínimo de sondas que permitam diferenciar todas as segregações anormais do multivalente meiótico.
- Se o portador for o marido, pode-se testar as sondas no sêmen.

Work-up prévio a um ciclo de PGD para desordem genética:

- Reconfirmar sempre a mutação no portador.
- Padronizar a técnica de PCR em uma célula única, que pode ser um linfócito, um linfoblasto ou uma célula epitelial.

Work-up prévio a um ciclo de PGD para tipagem HLA:

- Testar uma série de STRs ligados ao locus HLA nos progenitores e filho no qual se procura a compatibilidade.
- Estabelecer os haplótipos nos três.
- Selecionar os marcadores informativos, ou seja, os STRs heterozigotos que não se sobreponham entre os progenitores.
- Para descartar as potenciais recombinações meióticas, quanto mais marcadores forem utilizados, melhor será a eficiência diagnóstica.

7. CONSIDERAÇÕES ESPECIAIS

.....

Recomenda-se nos casais:

- Uso de anticoncepcional para evitar gravidez antes do PGD.
- Abstinência de relações ou relações protegidas durante o ciclo de PGD.
- Estimulação ovariana mais agressiva.

Recomenda-se durante a biópsia embrionária:

- Identificar corretamente o embrião e o blastômero.
- Remover todas as células contaminantes.
- Realizar ICSI para PGD por PCR.
- Aceita-se FIV para PGD por FISH.
- Meios de cultura seqüenciais até o 5º dia.
- Cultivar individualmente os embriões.

A biópsia de corpúsculos polares:

- Para FISH pode ser simultânea.
- Para PCR, recomenda-se que seja seqüencial.
- Recomenda-se a perfuração da zona pelúcida com laser ou mecânica.
- Desaconselha-se que seja com ácido Tyrode.

A biópsia de blastômeros:

- Recomenda-se realizar no terceiro dia.
- Não se aconselha biopsiar pré-embriões detidos.
- Não é aconselhável realizar no 5º dia.
- Para se extrair duas células, recomenda-se que o embrião tenha mais de 6 células.
- Aconselha-se que as células biopsiadas sejam mononucleadas.
- Recomendam-se a rebiópsia dos pré-embriões.
- Não necessariamente deve-se usar meio sem Ca e Mg durante a biópsia.
- Recomenda-se o menor tempo possível para a realizar a biópsia.
- Aceita-se a utilização de uma só célula para os estudos por FISH prévio a verificação do núcleo na lâmina.
- Recomenda-se mais de uma célula para os estudos por PCR.
- Pode-se re- hibridizar os núcleos.
- Recomenda-se usar sondas comerciais com certificado de controle de qualidade.
- Aceitam-se sondas *home-made*, mas com controle de qualidade.
- Recomenda-se a checagem das sondas previamente em 10 metafases ou 100 núcleos interfásicos.
- Recomenda-se testar principalmente as sondas subteloméricas ou loci específicas.
- Pode-se usar solução hipotônica prévia à fixação dos blastômeros.
- A fixação dos blastômeros sobre as lâminas pode ser realizada com Tween 20/HCl 0.01 N ou com a mistura Tween 20/HCl-metanol-ácido acético.
- Recomenda-se o uso de um set de filtros de fluorescência apropriados.
- Aconselha-se a captura computadorizada ou não dos sinais fluorescentes com câmara fria de alta resolução, principalmente para as sondas subteloméricas ou as loci específicas.
- No estudos por PCR, recomenda-se o uso de marcadores ligados ou não ao locus em questão devido ao risco de contaminação e ADO (alelo drop-out).
- Sempre validar a mutação do DNA genômico do portador e seu acondicionamento em uma só célula.
- Realizar a PCR pelo menos em 10 células únicas do portador para calcular a taxa de eficiência na amplificação e a porcentagem de ADO.
- Usar sempre controles positivos e brancos.
- A eficiência da amplificação deve ser superior a 90% e o ADO menor que 10%.
- Quando não for possível realizar a mutação, aceita-se o uso de marcadores ou STRs ligados à mutação (por estudo de ligação).
- A contaminação nunca deve ser superior a 5%.
- Se possível, os reativos devem ser prontos para o uso, com qualidade para biologia molecular, DNase free e filtrados.

- Recomenda-se sempre o uso de luvas durante o PGD por PCR, assim como também gorros, máscaras, avental e propé.
- Separação física entre os laboratórios onde se realiza a biópsia embrionária, pré-PCR, PCR e pós-PCR.
- Se possível, os laboratórios devem possuir ar condicionado com pressão positiva filtrada ou câmara de fluxo laminar.
- Limpar sempre as mesas com descontaminantes.
- Sempre lavar os blastômeros duas vezes antes de colocá-los nos microtubos para PCR.
- É preferível usar PCR fluorescente no lugar do convencional.
- É preferível usar Multiplex (mutação + STRs).
- Aceita-se a realização de uma Nested-PCR.

8. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS:

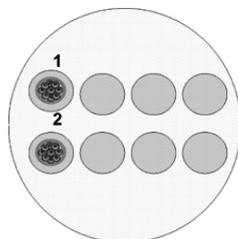
.....

- Microscópio e micromanipuladores com um dos suportes duplos, um para a pipeta perfuradora e o outro para a biópsia. Se houver um equipamento laser para perfuração da zona pelúcida, ambos suportes podem ser simples.
- Lupa estereoscópica.
- Microscópio com equipamento de epifluorescência e jogo de filtros adequados aos fluorocromos das sondas cromossômicas que serão utilizadas.
- Câmera fotográfica fria de alta resolução.
- Hibridizador tipo Hybrite.
- Banho termostaticado.
- Várias micropipetas.
- Vortex.
- Microcentrífuga.
- Timer ou cronômetro.
- Pinças.
- Filme de PVC.
- Papel toalha.
- Caixas para guardar as lâminas em que se realizou o FISH.
- Jarra de Coplin de 50 ml para lavagem das lâminas na técnica de FISH.
- Jarra de Coplin de porcelana para aquecer a 73°C.
- Micropipeta de biópsia de blastômero entre 35 e 45 μm de diâmetro.
- Micropipetas de sustentação.
- Placas de Petri.
- Pipetas Pasteur estéreis ou Stripper com tips de 100-150, 300 e 600 μm .
- Meio PBS com 5% de HAS para a biópsia embrionária.
- Meio seqüencial para o desenvolvimento dos pré-embriões biopsiados.
- Óleo mineral equilibrado.
- Lâminas limpas e desengorduradas

- Lápis diamante de ponta fina para assinalar onde se fixou o blastômero.
- Tween 20/HCl0.01 N 1:1
- Metanol/ ácido acético 3:1
- Metanol para conservar os preparados celulares.
- Tampas de vários tamanhos.
- Microtubos para PCR.
- Sondas cromossômicas convalidadas.
- Solução 0.4x SSC + 3 μ l de Tween 20 por ml.
- Solução 2x SSC + 1 μ l de Tween 20 por ml.
- Solução *antifade* e DAPI para montar os preparados.

9. REALIZAÇÃO DA TÉCNICA PGD/PGS:

- Realização da técnica de FIV/ICSI de acordo com os capítulos anteriores.
- Ao segundo dia pós-aspiração, preparar as placas para a biópsia e para a cultura dos pré-embriões biopsiados com a quantidade de gotas sob óleo necessárias.
- Aconselha-se que a placas de biópsia não tenha mais de dois pré-embriões e a mesma deveria conter 3 gotas mais por pré-embrião para a posterior lavagem da célula aspirada.

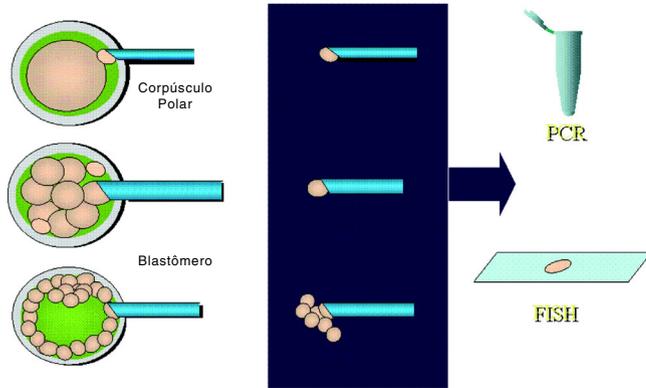


- Verificar com muito cuidado que a numeração dos pré-embriões e das células biopsiadas coincida.
- Nos casos de PGD por PCR, aconselha-se um só pré-embrião por placa e sempre lavar a pipeta de biópsia logo após cada biópsia em uma placa Petri com abundante PBS com albumina.
- Imediatamente após realizar a biópsia, colocar o embrião em meio de cultura adequado e manter na incubadora. Deixar a célula aspirada na placa até terminar todas as biópsias.
- Finalizadas as biópsias, as células aspiradas são lavadas em gotas adjacentes e posteriormente fixadas em lâminas quando são para FISH ou colocadas em microtubos quando são para PCR.

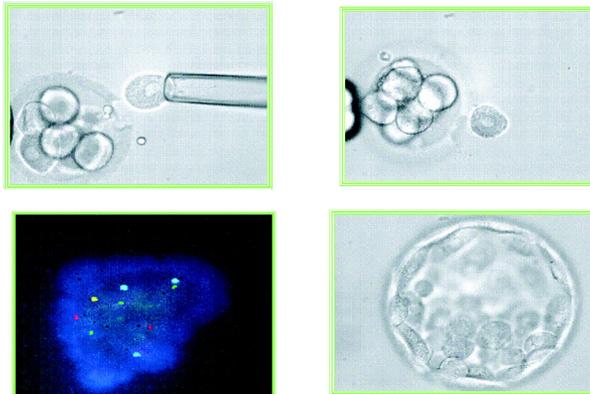
- Para PCR, deve-se tomar precauções extremas para evitar contaminação externa. O operador que carrega os pré-embriões e as células aspiradas deve usar luvas e pipetas individuais.
- Recordamos que quando tratar-se de PCR, deve-se usar controles positivos e brancos.
- Para FISH, as células, logo após lavadas, são colocadas uns minutos na solução de citrato de sódio a 1% contendo 5% de HSA, posteriormente passadas rapidamente por Tween 20 HCl e depositadas sobre as lâminas. Assim que secar o excedente de Tween 20 HCl, acrescenta-se umas gotas de metanol:acético 3:1. Quando o fixativo tiver evaporado, com um lápis diamante, faz-se um círculo no local de cada blastômero. Realiza-se todo o procedimento com lupa. Pode-se fixar vários blastômeros ou somente um por lâmina. Como as sondas possuem um custo elevado, convém que o círculo que rodeia a célula seja o menor possível para minimizar a quantidade de sonda.
- As células fixadas sobre as lâminas podem ser conservadas em metanol até sua hibridização.
- Antes de hibridizar, convém assinalar a localização dos blastômeros com as coordenadas do microscópio com contraste de fase.
- O tratamento dos preparados não necessariamente devem ser realizados prévio à hibridização.
- Alguns autores recomendam tratamento prévio à hibridização em 2xSSC contendo 1% de formaldeído, lavagem posterior em 2xSSC e desidratação de álcoois etílicos a 70, 85 e 100°. Outros usam pepsina.
- Uma vez evaporados, imediatamente antes de colocar a mistura das sondas, convém aquecer os preparados a 45°C.
- Montam-se os preparados com lamínulas pequenas, suficientes para cobrir os círculos que rodeiam as células e os cobre com filme de PVC para evitar a evaporação durante a hibridização.
- Os tempos de denaturação e hibridização serão indicados pelos fabricantes para essas sondas.
- Finalizada a hibridização, retira-se o filme de PVC e a lamínula e lava-se primeiro submergindo o preparado em 0.4xSSC contendo Tween 20 a 73°C durante dois minutos e logo em 2xSSC também contendo Tween 20 à temperatura ambiente.
- Posteriormente, montar somente com *antifade* ou DAPI de acordo com as indicações dos fabricantes.
- Observar sob microscópio de fluorescência com objetiva de imersão e analisar os sinais fluorescentes com os filtros adequados para cada sonda. Se possível, utilizar o sistema de captura com cada filtro. Esta é uma análise numérica dos cromossomos e não estrutural.

- Este tipo de análise somente infere o número de marcas para cada cromossomo se são enumeradoras, mas não a estrutura dos mesmos.

Esquemas sobre diferentes tipos de biópsias



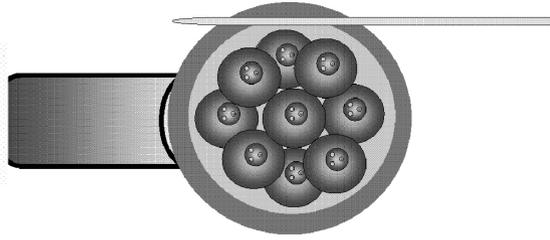
Microfotografias de biópsia de blastômero, FISH com sondas 13, 18, 21, X e Y, e posterior desenvolvimento a blastocisto.



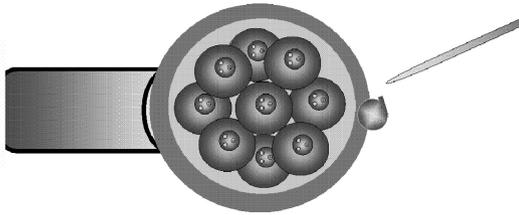
13 (vermelho)
21 (verde)
18 (aqua)

X (azul)
Y (amarelo)

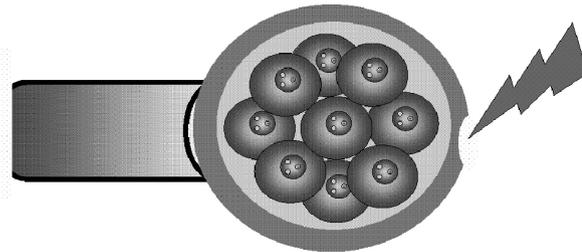
Perfuração mecânica da zona pelúcida



Perfuração química da zona pelúcida



Perfuração com laser



Predição de embriões normais a transferir de acordo com o motivo do PGD:

Desordem	Embriões anormais	Possibilidade embriogênica (%)	Embriões normais (%)
AR	1/4	50	37,50
AD	1/2	50	25
RLX	1/4	50	37,5
HLA	3/4	50	12,50
AR+HLA	1/2 x 3/4	50	9,37
AD+HLA	1/2 x 3/4	50	6,25
RLX+HLA	1/2 x 3/4	50	9,37
TR	3/4	50	12,50
FC	2/3	50	16,66
IP	1/5	50	40
sexado	1/2	50	25
EMA	1/2	50	25
EMA+FM	1/2 x 1/3	50	16,66

AR: autossômico recessivo, AD: autossômico dominante, RLX: recessiva ligada ao X, HLA: antígenos leucocitários humanos, TR: translocação recíproca, FC: fusão cêntrica, IP: inversão pericêntrica, EMA: idade materna avançada >37anos, FM: fator masculino severo (OAT oligoastenoteratozoospermia).

Como pode-se observar na tabela, na primeira coluna mostra-se a proporção de embriões normais de acordo com a desordem ou intenção de PGD; na segunda, a porcentagem média de desenvolvimento a blastocisto; na terceira, a probabilidade de embriões a serem transferidos. Ressaltamos que uma predição inferior a 30% torna muito duvidosa a transferência embrionária, ou seja, o PGD não chegaria a ser terapêutico, a menos que a mulher responda muito bem à estimulação ovariana.

10. PROCEDIMENTOS PARA REALIZAR O FISH EM DUAS ETAPAS.

Segundo Dra. Catherine Staessen

Procedimento para realizar o FISH em duas etapas, permitindo detectar os cromossomos X, Y, 13, 18, 21 (1ª etapa) e 16, 22 (2ª etapa)

i) Equipamentos e materiais

1. Jarra Coplin de vidro (100 ml)
2. Lamínulas de vidro (4 mm e 24 x 50 mm/ Laborimpex)
3. Lâminas (Superfrost Plus®)
4. Câmara umidificada
5. Banho-maria (37°C, 42°C e 73°C)
6. Placa aquecedora: estável a 75°C
7. Micropipetas
8. Ponteiras para micro-pipeta (estétil)
9. Tubos de microcentrífuga (0.5 ml)
10. Vortex
11. Microcentrífuga
12. Cronômetro
13. Termômetro (0°C - 100°C)
14. Refrigerador (4°C)
15. Freezer (-20°C)
16. Água purificada
17. Pinça
18. Cola de borracha
19. Papel toalha
20. Vidraria volumétrica
21. Microscópio fluorescente + jogos de filtros adequados
22. Pipetas Pasteur
23. Sistema de aspiração controlado pela boca
24. Placas de Petri (Falcon)
25. Estereomicroscópio
26. Microscópio invertido com contraste de fase (Olympus CK2 com objetivas de: 4, 10, 20x)
27. Lápis diamante de ponta fina
28. pHmetro

ii) Reativos

1. Tween 20 (Merck ref. 822184)
2. 10X PBS
 - Na₂HPO₄.2H₂O di-Sódio hidrogenofosfato dihidrato (Merck ref. 6580.0500)

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ Dihidrogenofosfato de sódio (mono-hidrato) (Merck ref. 6346.0500)
- NaCl (Merck ref. 1.06404.0500)
- 3. 20X SSC
 - tri-Sódio citrato dihidrato (Merck ref. 6448.1000)
 - NaCl (Merck ref. 106404.0500)
- 4. 1N HCl (Merck ref 09057.1000)
- 5. Pepsina (Sigma ref. P-7000)
- 6. Fixador de *Carnoy*
 - Metanol (Merck ref. 106009)
 - Ácido acético (96 % pureza Merck ref. 62)
- 7. LSI®/WCP buffer de hibridização (Vysis ref. 32-804826)
- 8. NP-40 (Vysis ref. 32-804818)
- 9. Etanol absoluto 99.8 %
- 10. DAPI (200 ng/ml) (Vectashield NTL ref. H-1000)
- 11. 1N NaOH: para ajuste do pH

iii) Preparação dos reativos

Solução de difusão e reativos pré-tratamento

Solução de difusão

Adicionar 10 ml Tween 20 em 10 ml 0.01N HCl

0.01 N HCl

Diluir HCl 1N 1:100 com água purificada

Pepsina 10 %

Preparar solução a 10 %.

Solução de PBS (10X)

Solução A

- 16.02 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 73.84 g NaCl
- dissolver em ± 700 ml água purificada

Solução B

- 2.76 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 16.36 g NaCl
- dissolver em ± 200 ml água purificada

Ajustar solução A para pH 7.0 com solução B

Adicionar água purificada suficiente para obter 1000 ml

Autoclavar

Armazenar à temperatura ambiente

Descartar após 6 meses ou antes, caso as soluções tenham aspecto turvo ou contaminada.

Solução de PBS (1X)

Diluir a solução de PBS (10X) 1:10 com água purificada

Fixador de Carnoy

Preparar com ácido e metanol na proporção de 1/3

Preparar o fixador quando for utilizá-lo e armazenar a 4°C

Descartar após sua utilização.

a) Reativos de desidratação

Soluções Etanol 70%, 90%, 100%, 100%

Preparar as diluições (v/v) a partir da solução de 100 % etanol com água purificada

Armazenar à temperatura ambiente e descartar após 7 dias

b) Reativos Pós-hibridização

20X SSC

- 175.3 g NaCl
 - 88.23 g Citrato de Sódio dihidrato
- Dissolver em 900 ml de água purificada

Ajustar o pH para 5.3 com HCl 1N
Adicionar volume suficiente de água purificada para atingir 1000 ml
Filtrar (0.2 mm)
Armazenar à temperatura ambiente, tampada, por até 6 meses

0.4X SSC

Adicionar 20ml 20 X SSC a 850 ml de água purificada
Ajustar o pH 7.0 ± 0.2 com NaOH
Adicionar água purificada até atingir o volume 1000 ml
Armazenar à temperatura ambiente tampada, por até 6 meses

2X SSC / 0.1 % NP-40

Adicionar 100 ml 20X SSC a 850 ml de água purificada
Adicionar 1 ml NP-40 e misturar
Ajustar pH 7.0 ± 0.2 com NaOH
Adicionar água purificada até atingir 1000 ml
Armazenar à temperatura ambiente tampada, por até 6 meses

Conterstaining

DAPI (conc. 200 ng/ml)

iv) Procedimento para as duas etapas do FISH.

a) Difusão e pré-tratamento

- Lavar os blastômeros biopsiados em meio Earle suplementado com 0.5% de albumina humana, usando microscópio estéreo.
- Faça um pequeno círculo atrás da lâmina.
- Transfira o blastômero para gota de 1-2 ml de solução de difusão sobre a região marcada da lâmina. (Coonen et al., 1994)
- Espalhe o material nuclear utilizando um microscópio invertido (Olympus CK2; obj. 4x, 10x, 20x)

Ambos blastômeros do mesmo embrião são fixados na mesma lâmina bem próximos.

- Deixar as lâminas secarem à temperatura ambiente (30 minutos).
- Enxagüar em 1X PBS por 5 minutos.
- Desidratar a lâmina da seguinte forma:
 - 70 % etanol por 20 segundos
 - 90 % etanol por 20 segundos
 - 100 % etanol por 20 segundos
 - 100 % etanol por 40 segundos

- Deixar as lâminas secarem à temperatura ambiente.
- Submergir as lâminas em solução de pré-tratamento a 37°C (0.01 HCl contendo 50 ml pepsina 10%) por 5 minutos
- Enxaguar 2 vezes em água purificada
- Enxaguar 2 vezes em 1X PBS
- Submergir as lâminas no fixador Carnoy a 4°C por 10 minutos
- Enxaguar 2 vezes em 1X PBS
- Enxaguar 2 vezes em água purificada

Desidratação

- Desidratar a lâmina da seguinte forma:
 - 70 % etanol por 20 segundos
 - 90 % etanol por 20 segundos
 - 100 % etanol por 20 segundos
 - 100 % etanol por 40 segundos
- Deixar as lâminas secarem à temperatura ambiente.

v) Primera etapa do FISH:

- Aplicar 0.2 ml da solução de sonda (DXZ1, Spectrum Blue; DYZ3, SpectrumGold; LSI13, SpectrumRED; D18Z1, SpectrumAqua; LSI21 SpectrumGreen; Multivision PGT Probe Panel; Vysis Inc., Downers Grove, IL), no local onde o material foi fixado.
- Colocar a lamínula de 4 mm sobre a solução de sonda (excluir qualquer bolha de ar).
- Co-denaturar à 75°C em placa aquecedora por 3 minutos.
- Selar a lamínula com a cola de borracha.

a) Hibridização

- Preparo da câmara umidificadora.
Utilizar uma caixa de plástico com tampa.
Colocar 1 ml de H₂O purificada sobre um papel toalha e colocar sobre a base da caixa.
Colocar o suporte de lâminas na caixa.
Colocar as lâminas no suporte viradas para baixo e tampar.
- Colocar as lâminas na câmara umidificada pré-aquecida em banho-maria a 37°C.
- É necessário pelo menos 1 hora de hibridização.

b) Lavagem Pós-Hibridização

- Colocar uma jarra Coplin contendo 0.4X SSC/0.3% NP40 no banho-maria e equilibrar a $73 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Remover a lamínula da área marcada e colocar a lâmina imediatamente dentro da solução de 0.4X SSC/0.3% NP40 por 5 minutos (não colocar mais de que 4 lâminas na solução).
- Lavar as lâminas em 2X SSC / 0.1% NP-40 por 5 a 60 segundos
- Remover as lâminas da última solução.
- Aplicar 15 ml de solução *antifade* (Vectashield, Burlingame, CA) em cada área marcada e cobrir com uma lamínula (excluir excesso da solução *antifade* e bolhas) .
- Verificar os resultados utilizando um filtro adequado colocado sobre um microscópio ótico fluorescente com lâmpada de mercúrio de 100 Watts. As imagens do FISH são capturadas com um sistema computadorizado.

vi) Segunda etapa da FISH (16 CEP laranja; 22 LSI verde)

- Preparo de 10 μl de solução das sondas
 - 6.25 μl LSI buffer
 - 1.25 μl CEP 16 spectrum laranja
 - 2.50 μl LSI 22 spectrum Verde
 - colocar todos os componentes em 1 microtubo, centrifugar / misturar / recentrifugar
- Após a análise das sondas da 1ª etapa, as lamínulas são cuidadosamente removidas e as lâminas enxaguadas em 1X PBS à temperatura ambiente
- Denaturação em 0.0625XSSC por 7 minutos a 75°C
- Desidratar as lâminas da seguinte forma
 - 70 % etanol por 20 segundos a -18°C
 - 90 % etanol por 20 segundos a -18°C
 - 100 % etanol por 20 segundos a -18°C
 - 100 % etanol por 40 segundos a -18°C
- Deixar as lâminas secarem em temperatura ambiente
- Denaturação da solução da sonda em tubo de microcentrífuga Eppendorf por 5 minutos a 75°C
- Aplicar 0.2 ml da solução da sonda (16 CEP laranja; 22 LSI verde Vysis Inc., Downers Grove, IL) na área marcada
- Selar a lamínula com cola de borracha

- Colocar as lâminas na câmara umidificada pré-aquecida em banho-maria a 37°C.
- É necessário pelo menos 2 horas de hibridização.

Lavagens Pós-Hibridização

- Colocar uma jarra Coplin contendo 0.4X SSC dentro do banho-maria e equilibrar a $73 \pm 1^\circ\text{C}$
- Remover a lamínula da área marcada das lâminas e colocar a lâmina imediatamente dentro de solução de 0.4X SSC por 2 minutos (não coloque mais que 4 lâminas na solução).
- Lavar as lâminas em 2X SSC / 0.1% NP-40 por 5 a 60 segundos
- Remover as lâminas da última solução
- Aplicar 15 μl DAPI em solução *antifade* em cada área marcada e cobrir com uma lamínula (excluir o excesso da solução *antifade* e bolhas).
- Verificar os resultados utilizando um filtro adequado colocado sobre um microscópio óptico fluorescente com lâmpada de mercúrio de 100 Watts. As imagens do FISH são capturadas com um sistema computadorizado.



REFERÊNCIAS

.....

1. Pehlivan T et al, 2003: Impacto of PGD on IVF outcome in implantation failure patients. *Reproductive Biomedicine online* 6(2), 232-237.
2. Abdelhadi Iman et al, 2003: PGD of numerical abnormalities for 13 chromosomes. *Reproductive Biomedicine online* 6(2), 226-231.
3. Kuliev A & Verlinsky Y, 2004: Thirteen years' experience of PGD: report of the fifth international symposium of PGD. *Reproductive Biomedicine online* 8(2), 229-235.
4. Kahraman S et al, 2004: clinical aspects of PGD for single gene disorders combined with HLA typing. *Reproductive Biomedicine online* 9(5), 529-532.
5. PGDIS: The Preimplantation Genetic Diagnosis International Society: guidelines for good practice in PGD. *Reproductive Biomedicine Online* 9(4), 430-434.
6. Verlinsky Y, 2005: Designing babies: what the future holds. *Reproductive Biomedicine online* 10,suppl.1, 24-26.
7. Robertson JA, 2005: Ethics and the future of PGD. *Reproductive Biomedicine Online* 10, suppl. 1, 97-101.
8. Caglar GS et al, 2005: PGD for aneuploidy screening in case of repeated implantation failure. *Reproductive Biomedicine online* 10(3), 381-388.
9. Gianaroli L et al, 2005: Beneficial effects of PGD for aneuploidy support extensive clinical application. *Reproductive Biomedicine Online* 10(5), 633-640.
10. Verlinsky Y et al, 2004: Preimplantation HLA testing. *JAMA* 291(17), 2079
11. Taranissi M et al, 2005 : influence of maternal age on the outcome of PGD for aneuploidy screening in patients with recurrent implantation failure. *Reproductive Biomedicine Online* 10(5), 628-632.
12. Sermon K et al, 2005: ESHRE PGD Consortium Data Collection IV: May-Decemb 2001. *Human Reproduction* 20(1), 19-34.
13. Coonen E, Dumoulin JMC, Ramaekers FCS, Hopman AHN (1994) Optimal preparation of preimplantation embryo interphase nuclei for analysis by fluorescent in situ hybridisation. *Hum Reprod* 9, 533-537