UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ÉRICA EUGÊNIO LOURENÇO GONTIJO

COMPARAÇÃO DO SUCESSO NA PRODUÇÃO E QUALIDADE DE EMBRIÕES ENTRE UM LABORATÓRIO CONVENCIONAL E UM LABORATÓRIO ISO 5/7 E FATORES RELACIONADOS A GRAVIDEZ

Goiânia
2016

TERMO DE CIËNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **[ ] Dissertação** **[x] Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Érica Eugênio Lourenço Gontijo					
E-mail:	ericagontijo1@yahoo.com.br					
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	[x]Sim	[ ] Não				
Vínculo empregatício do autor	Centro Universitário UnirG					
Agência de fomento:					Sigla:	UnirG
País:	Brasil	UF:	TO	CNPJ:	0121.0830/0001-06	
Título:	COMPARAÇÃO DO SUCESSO NA PRODUÇÃO E QUALIDADE DE EMBRIÕES EM ENTRE UM LABORATÓRIO ISO 5/7 E UM LABORATÓRIO CONVENCIONAL E FATORES RELACIONADOS A GRAVIDEZ					
Palavras-chave:	Embriões humanos, laboratório ISO 5/7, reprodução humana, fatores de risco, infertilidade, fertilização, qualidade laboratorial em FIV					
Título em outra língua:	COMPARISON OF SUCCESS IN PRODUCTION AND QUALITY OF EMBRYOS BETWEEN A CONVENTIONAL LABORATORY AND A LABORATORY ISO 5/7 AND FACTORS RELATED TO PREGNANCY					
Palavras-chave em outra língua:	Embryos, ISO 5/7 laboratory, assisted human reproduction, risk factors					
Área de concentração:	Dinâmica do Processo Saúde-Doença					
Data defesa:	23/06/2016					
Programa de Pós-Graduação:	Ciências da Saúde					
Orientador (a):	Mário Silva Approbato					
E-mail:	approbato.m@gmail.com					
Co-orientador (a):						
E-mail:						

3. Informações de acesso ao documento:
Liberação para disponibilização?[1] [x] total [ ] parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:
[ ] Capítulos. Especifique: _____

[ ] Outras restrições: _____

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.
O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

_____ Data: 11 /07 /2016
Assinatura do (a) autor (a)

[1] Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

ÉRICA EUGÊNIO LOURENÇO GONTIJO

COMPARAÇÃO DO SUCESSO NA PRODUÇÃO E QUALIDADE DE EMBRIÕES ENTRE UM LABORATÓRIO CONVENCIONAL E UM LABORATÓRIO ISO 5/7 E FATORES RELACIONADOS A GRAVIDEZ

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutora em Ciências da Saúde.
Orientador: Dr. Mário Silva Approbato

Goiânia
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Gontijo, Érica Eugênio Lourenço
COMPARAÇÃO DO SUCESSO NA PRODUÇÃO E QUALIDADE DE EMBRIÕES ENTRE UM LABORATÓRIO CONVENCIONAL E UM LABORATÓRIO ISO 5/7 E FATORES RELACIONADOS A GRAVIDEZ [manuscrito] / Érica Eugênio Lourenço Gontijo. - 2016.
xii, 121 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Mário Silva Approbato.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Medicina (FM), Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Goiânia, 2016.
Bibliografia. Anexos.
Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Embriões humanos. 2. laboratório ISO 5/7. 3. reprodução humana. 4. infertilidade. 5. qualidade laboratorial em FIV. I. Approbato, Mário Silva , orient. II. Título.

CDU 61

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluna: Érica Eugênio Lourenço Gontijo

Orientador : Dr. Mário Silva Approbato

Membros:

1. Dr. Mário Silva Approbato

2. Dr[a]. Hugo Machado Sanchez

3. Dr[a]. Juliana Boaventura Avelar

4. Dr[a]. Aline Almeida Barbaresco D´Alessandro

5. Dr. Walmirton Bezerra D' Alessandro

OU

4. Dr. Marcos Gontijo da Silva

5. Dr. Eliane Gouveia de Moraes Sanchez

Data:23/06/2016

Dedico este trabalho...

À Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, criador dos céus e da terra, que me concedeu forças para conseguir concluir mais uma etapa da minha vida, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Ao meu amor, companheiro em todas as horas, meu grande incentivador, Marcos Gontijo da Silva, por todo apoio, carinho e compreensão, sem o qual não poderia ter chegado até aqui.

Ao meu amado filho João Pedro Eugênio, por todo carinho e amor, meu companheiro de viagens.

A minha mãe Teresinha Eugênio, tia Dinha Eugênio, meus irmãos Ana Flávia Eugênio Lourenço Maciel e Daniel Eugênio a meu querido cunhado Marcos Vinicius Maciel, por todo apoio durante essa jornada de viagens ao longo desses anos.

Ao meu orientador Dr. Mário Silva Approbato por todo apoio e disponibilidade irrestrita, agradeço por sua forma crítica, inteligente e criativa de arguir as idéias apresentadas, o que deram norte a este trabalho, facilitando o alcance de seus objetivos.

A professora Doutora Ana Maria de Castro e ao doutorando Hansttter Hallison que permitiram e ofereceam condições técnicas para que parte deste estudo fosse realizado no Laerph/IPTSP.

A todos os funcionários do Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas, em especial a Mônica Canedo S. Maia e Tatiana Moreira da Silva.

A todos os colegas de doutorado, pelo convívio e aprendizado.

As pacientes que constituiram o grupo de estudo, pois sem elas esse trabalho não existiria.

A querida Valdecina Quirino Rodrigues, secretária do programa de pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás, pelo apoio e ajuda nos momentos importantes dessa caminhada.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS ..... **VII**

SUMÁRIO ..... **VIII**

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS ..... **X**

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS ..... **XI**

RESUMO ..... **XII**

ABSTRACT ..... **XIV**

1. INTRODUÇÃO **1**

1.1 JUSTIFICATIVA 4
1.2 HISTÓRICO DA REPRODUÇÃO ASSISTIDA 6
1.3 ASPECTOS OBSTÉTRICOS DA REPRODUÇÃO HUMANA ASSISTIDA 7
1.3.1 INFERTILIDADE FEMININA *7*
1.3.2 INFERTILIDADE MASCULINA *9*
1.3.3 DOSAGENS HORMONAIS *10*
1.3.4 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DOS OÓCITOS *10*
1.3.5 TECNICAS DE REPRODUÇÃO HUMANA ASSISTIDA (RHA) USADAS NO BRASIL *12*
1.3.5.1 TÉCNICAS DE BAIXA COMPLEXIDADE 13
1.3.5.2 TÉCNICAS DE ALTA COMPLEXIDADE 13
1.4 REGULAMENTAÇÃO DA RHA NO BRASIL 16
1.4.1 Sistema Nacional de Produção de Embriões (SisEmbrio) *18*
1.4.2 Produção de células germinativas e embriões humanos utilizados nas técnicas de fertilização in vitro *18*
1.4.3 Informações sobre indicadores de qualidade em Bancos de Células e Tecidos Germinativos- BGTC *19*
1.5 A QUALIDADE DO AR EM AMBIENTES HOSPITALARES CLIMATIZADOS E EM BCTG E SUA INFLUÊNCIA NA OCORRÊNCIA DE INFECÇÕES 22
1.5.1 Ambientes hospitalares *22*
1.5.2 Controle de qualidade do Laboratório de Reprodução Humana *24*
1.6 CONTAMINAÇÃO MICROBIANA DO AR E DE CULTURAS DE EMBRIÕES EM LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA 27

2 OBJETIVOS **29**

2.1 GERAL 29
2.2 ESPECÍFICOS 29
2.2.1. Realizar uma revisão bibliográfica sobre a relação entre alterações bioquímicas, ambientais e microbiológicas e o sucesso da técnica de fertilização in vitro (Artigo1). *29*
2.2.2. Comparar o sucesso na fertilização e reprodução entre os laboratórios ISO 5/7 e convencional (Manuscrito 1). *29*
2.2.3 Avaliar no LabRep outros fatores não dependentes do laboratório, porém relacionados ao sucesso da fertilização assistida (Manuscrito 2). *29*

3. MATERIAL E MÉTODOS **30**

3.1 LOCAL DO ESTUDO 30
3.2 PERÍODO DO ESTUDO 31
3.3 ASPECTOS ÉTICOS 31
3.4 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA 31
3.5 DESENHO DO ESTUDO 32
3.6 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO 32
3.7 VARIÁVEIS ESTUDADAS 33
3.7.1 Sisfert (Banco de dados do LabRep/HC/UFG) 33

3.7.2 Variável estudadas 34
3.8 DEFINIÇÃO DAS VARIÁVEIS DO ESTUDO 35
3.9 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS 37

4. RESULTADOS 38

4.1 ARTIGO 1 39
4.2 MANUSCRITO 2 46
4.3 MANUSCRITO 3 63

CONSIDERAÇÕES FINAIS DA TESE 82

REFERÊNCIAS 83

ANEXOS 93

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Quadro 1	Resumo dos dados informados no SisEmbrio referentes à produção de células (oócitos) e embriões segundo a Unidade Federativa (ano base: 2014).	19
Quadro 2	Resumo dos indicadores por Unidade Federada, Região e Nacional, Brasil, ano base 2014.	20
Quadro 3	Indicadores dos Bancos de Células e Tecidos Germinativos da Região Centro-Oeste (anobase: 2014).	21
Tabela 1	Classes de limpeza do ar para níveis de partículas em suspensão em salas limpas e zonas limpas segundo a Organização Internacional de Normalização (ISO) norma 14644-1.	26
Figura 1	Figura 1: Organograma da seleção das mulheres atendidas no laboratório de reprodução humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás nos anos de 2013 e 2014.	33
Anexo 1	Protocolos e procedimentos realizados no LabRep.	94
Anexo 2	Parecer Consubstanciado do comitê de ética.	97
Anexo 3	Formulário para coleta de dados.	101
Anexo 4	Normas da revista de Saúde Pública (RSP).	105
Anexo 5	Normas da Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia.	109
Anexo 6	Normas do Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida (JBRA).	117
Anexo 7	Certificado de submissão do artigo 1 a Revista de Saúde Pública	121

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCTG	Bancos de Células e Tecidos Germinativos
CID	Classificação Internacional de Doenças
COC	Hiperestimulação Ovariana Controlada
ESHRE	Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia
FIV	Fertilização *in vitro*
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
FUEFE	Fundação Universitária de Endocrinologia e Fertilidade de Porto Alegre
Hcg	Hormônio da Gonadotrofina Coriônica
HTF	HumanTuba lFluid
IIU	Inseminação Artificial Intra-uterina
ICSI	Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide
IMC	Índice de Massa Corporal
LabRep/HC/UFG	Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás
LH	Hormônio Luteinizante
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RHA	Reprodução Humana Assistida
SISEMBRIO	Sistema Nacional de Produção de Embriões
SOP	Síndrome dos ovários policísticos
TSH	Hormônio estimulante da tiroide
Sisfert	Sistema de Fertilização Assistida HC/UFG

RESUMO

INTRODUÇÃO: A frequência de produção de embriões e sucesso na gravidez são os principais parâmetros usados para verificar a qualidade de laboratórios de reprodução humana. **OBJETIVO:** Comparar o sucesso na produção e qualidade de embriões, taxa de sucesso e fatores relacionados a gravidez no LabRep/HC/UFG, antes de profundas adequações estrututurais, quando era classificado como laboratório convencional e após as adequaçãos, quando passou a ser classificado como um laboratório ISO 5/7 e os fatores relacionados ao sucesso da fertilização. **MÉTODO:** O desenho do estudo foi do tipo caso controle. Os dados foram inseridos no programa Epi-Info 3.3.2 ® e analisados no programa BioEstat 5.3 ®. Foram avaliadas a relação entre os grupos e dos fatores e o sucesso da gravidez pelo *odds ratio* (OR) e qui-quadrado (p=0,05). O estudo se deu no Laboratório de Reprodução Humana do HC/UFG Goiânia-Goiás. Foram pesquisadas informações de 278 ciclos de mulheres que submeteram a uer técnica de FIV, ICSI E IIU, como tratamento de Reprodução Humana Assistida no período do estudo. O trabalho foi dividido em três artigos para melhor compreensão dos resultados. No primeiro artigo realizou-se uma revisão bibliográfica sobre relação entre alterações bioquímicas, ambientais e microbiológicas e o sucesso da técnica de fertilização in vitro. O segundo artigo avaliou a qualidade embrionária e o terceiro, os fatores de risco com capacidade de interferir no sucesso da gestação. Na primeira análise foram pesquisadas: clivagem do embrião, resultado do βHCG, qualidade embrionária e a contaminação microbiológica dos meios de cultivos de embriões. Na segunda, foram avaliados o tamanho dos folículos por mulher, quantidade de oócitos aspirados, captados, inseminados e injetados, esquema de estimulação ovariana, infecções maternas, período de infertilidade e qualidade espermática. **RESULTADOS:** No primeiro trabalho científico onde comparou-se o sucesso na produção e qualidade de embriões, taxa de sucesso e contaminação microbiológica nos meios de cultura onde os embriões foram cultivados antes das adequações estrututurais, quando era classificado como laboratório convencional e após

as adequações, quando passou a ser classificado como um laboratório ISO 5/7, foi observado que no laboratório ISO 5/7, houve 74,1% de sucesso na formação de embriões e no convencional 67,8% (OR:1,30; IC:0,47-3,61; χ^2:0,24; *p*:0,81). No laboratório ISO 5/7 96,6% dos embriões gerados eram A ou B, já no laboratório convencional, 90,4% eram A ou B. O sucesso de gravidez no laboratório ISO 5/7 foi de 22,8% e no laboratório convencional de 36,2% (OR:1,9; IC: 0,81-4,52; χ^2: 2,24; *p*: 0,13). No segundo trabalho científico onde avaliou-se os fatores relacionados a gravidez no LabRep/HC/UFG, foi encontrado correlação do insucesso de gravidez com os fatores femininos: ter mais de 40 anos (OR: 6,04; IC: 1,34-27,08; *p:*0,010), tempo de infertilidade superior a 97 meses (OR: 4,49; IC: 1,65-12,.21; *p:*0,001) e possuir endométrio com espessura inferior a 10mm (OR: 5,42; IC: 2,44-12,05; *p:*0,001). Os fatores masculinos com correlação foram: oligozoospermia (OR: 3,35; IC: 1,41-7,92; *p:*0,010), teratozoospermia (OR: 4,14; IC: 1,89-9,07; *p:*0,010). Foi encontrado contaminação microbiológica em 6.11% das amostras de sêmen. **CONCLUSÕES:** No primeiro trabalho científico foi possível concluir que não houve diferença estatística entre os resultados dos entre os dois laboratórios. No segundo trabalho científico concluiu-se que os fatores relacionados ao insucesso do tratamento de reprodução assistida encontrados foram: idade superior a 40 anos, tempo de infertilidade superior a 96 meses e espessura endometrial inferior a 10mm e presença de sêmen de baixa qualidade.

PALAVRAS-CHAVE: Embriões humanos, laboratório ISO 5/7, reprodução humana, fatores de risco, infertilidade, fertilização, qualidade laboratorial em FIV

ABSTRACT

INTRODUCTION: The frequency of embryo production and successful pregnancy are the main parameters used to measure the quality of human reproduction laboratories. **OBJECTIVE:** We compared the success in the production and quality of embryos, success rate and factors related to pregnancy in LabRep/HC/UFG before deep adjustments estrututurais, when it was classified as conventional laboratory and after adequaçãos, when it began to be classified as an ISO 5/7 laboratory and factors related to the success of fertilization. **METHOD:** The study was divided into two parts. The first evaluated the embryo quality and the second risk factors capable of interfering with the success of pregnancy. information of 278 cycles of women were surveyed who submitted any Assisted Human Reproduction technique during the study period. In the first analysis were surveyed: cleavage of the embryo, the result of βHCG, embryo quality and microbiological contamination of the means of embryos crops. In the second, they evaluated the size of follicles per woman, amount of aspirated oocytes, raised, inseminated and injected, ovarian stimulation scheme, maternal infections, infertility period and sperm quality. The study design was a case control. Data were entered into Epi-Info 3.3.2 and analyzed in BioEstat 5.3 program. We evaluated the relationship between the groups and the factors and the success of pregnancy the odds ratio (OR) and chi-square test (p = 0.05). **RESULTS:** In the first analysis it was observed that the ISO 5/7 laboratory, there were 74.1% successful in the formation of embryos and the conventional 67.8% (OR: 1.30, CI: 0.47 -3.61; $א^2$: 0.24, p: 0.81). 5/7 96.6% ISO laboratory embryos were generated A or B, since the conventional laboratory, 90.4% were A or B. The pregnancy success in the laboratory ISO 5/7 was 22.8%, and conventional laboratory 36.2% (OR: 1.9197 CI: 0.81 to 4.52; $א^2$: 2,24; p: 0.13). The second correlation was found with pregnancy failure female factors: having more than 40 years (OR 6.04, CI: 1.34 to 27.08; p: 0.010), higher infertility time 97 months (OR: 4.49, CI: 1.65 to 12, .21; p: 0.00) and have endometrial thickness of less than 10mm (OR: 5.42, CI: 2.44 to 12.05; p:0.001). The male factors with correlation were: oligozoospermia

(OR:3,35; IC:1,41-7,92; p:0,010) e teratozoospermia (OR:4,14; IC:1,89-9,07; p:0,010).Microbiological contamination was found in 11.06% of semen samples. **CONCLUSIONS:** There was no statistical difference between the results of the two laboratories, however we observed a trend of better quality embryos in ISO 5/7 laboratory. It was concluded that the patients attended the LabRep/HC/UFG, present a great heterogeneity of clinical profiles and different reproductive characteristics. It shows how a major challenge that encourages the ongoing investment in cutting edge technology and processes, as well as constant improvement of the multidisciplinary team that make up the lab.

KEYWORDS : Human embryos , ISO 5/7 laboratory , human reproduction , risk factors , infertility, fertilization laboratory quality in IVF

1. INTRODUÇÃO

A Reprodução Humana Assistida (RHA) é, essencialmente, a capacidade humana de intervir no processo de concepção natural, com o intuito de propiciar a homens e mulheres com infertilidade o sonho da maternidade ou paternidade (BENTO; ESTEVES; AGARWAL,2013; GONTIJO; APPROBATO, 2013).

Infertilidade é a inaptidão para procriação (GOUVEIA, 1907). Salienta-se que problemas de infertilidade são disfuções registradas na Classificação Internacional de Doenças – CID e, podem ser tratadas (GRADVOHL; OSIS; MAKUCH, 2013; PAVAN; AARESTRUP; BERTOLDI, 2013; PROTO *et al*., 2013; DZIK *et al.*,2014). Nos últimos dez anos a quantidade de casais com problemas de infertilidade totalizam cerca de 30% daqueles com idade reprodutiva e levou a um aumento na busca de casais por tratamento de infertilidade *(* GRADVOHL; OSIS; MAKUCH, 2013).

Em todo o mundo, cerca de 15 a 20% dos casais possuem problemas de infertilidade em algum momento da sua vida reprodutiva (BUSHNIK et al., 2011). De acordo com o Ministério da Saúde, no Brasil, cerca de 278 mil casais em idade reprodutiva possuem dificuldade de concepção natural (Ministério da Saúde, 2011).

O estilo de vida de homens e mulheres cooperam para o aumento de casos de infertilidade em todo o mundo. De uma forma geral consegue-se atribuir aos problemas de infertilidade fatores ambientais, como partículas de poeira, odores, bactérias, fungos e também os fatores intrínsecos como a idade,ovulação, fator tuboperitoneal, endometriose e por causas masculinas, como a baixa concentração de espermatozóides (SINGH;JAISWAL,2011; MENDES *et al*.,2014; ESTEVES; BENTO, 2015; MORAES *et al.*, 2015).

O problema de esterilidade e infertilidade gera ao casal consequências como o desgaste físico e emocional (DOUGLAS,2007; ANTUNES, 2013).

Nos últimos trinta anos não houve uma elevação na taxa geral de infertilidade, porém ocorreu um avanço em sua avaliação, bem como em seu

tratamento. Tendo como resultado, uma elevação do número de mulheres buscando tratamentos em idades avançadas (SPEROFF; FRITZ, 2013).

O desenvolvimento das técnicas de reprodução assistida levou a uma elevação nos índices de gestação. A RHA envolve um grupo de técnicas, como o coito programado, inseminação artificial intra-uterina (IIU) e fertilização extracorpórea, que abrange a fertilização *in vitro* (FIV) clássica e a fertilização *in-vitro* por meio de injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) (DZIK *et al*., 2014). Para que isso ocorra é necessário o envolvimento de uma equipe multidisciplinar, tendo participação de médicos, enfermeiros, biomédicos e bioquímicos, atuando desde a indução da ovulação até a implantação do embrião (BUSSO *et al.,* 2007).

Vários parâmetros influenciam no sucesso da fertilização assistida: números de folículos na indução, qualidade de oócitos obtidos e qualidade de embriões. Alguns pesquisadores observaram a diminuição na produção de embriões e consequentemente redução de sucesso na gravidez quando a sua produção/manipulação ocorre em locais com condições químicas inadequadas. Com a remodelação de instalações, remoção de produtos químicos essa realidade tem mudado. No entanto, existem poucos estudos que relataram a correlação entre os níveis tóxicos (por exemplo, bactérias, poeira, materiais particulados, e compostos voláteis como odores) e a diminuição do desenvolvimento de embriões (BOONE *et al.*, 1994; GONTIJO; APPROBATO, 2013; FERNANDES *et al.*, 2014; FOIZER *et al*., 2014; ESTEVES, 2015; ESTEVES; BENTO, 2015; HEITMANN *et al*., 2015; MUNCH *et al.*, 2015).

O objetivo essencial da RHA é a manipulação de espermatozoides e oócitos de forma eficaz e segura, com a finalidade de produzir embriões viáveis, levando ao nascimento de crianças saudáveis e ainda protegendo a saúde dos profissionais envolvidos no processo (BOONE *et al*.,1994).

A forma mais aconselhável de conseguir manter ótimos índices de qualidade e segurança na manipulação de gametas é através da introdução de um controle de qualidade (BOONE *et al*.,1994; ESTEVES; BENTO, 2015; MUNCH *et al.*, 2015).

O controle de qualidade no laboratório de reprodução humana é de extrema importância para obter sucesso nos resultados do tratamento. A

precisa efetuação de todos os procedimentos influencia diretamente nos resultados, isto porque os gametas e embriões podem sofrer contaminação (FOIZER *et al*., 2014).

A constância da contaminação microbiológica em meios de cultivo de embriões teve o seu primeiro relato em 1997, e desde então têm sido frequentemente relatada, colaborando diretamente para levar a resultados positivos na FIV (FOIZER *et al*., 2014).

O laboratório de reprodução humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (LabRep/HC/UFG) mudou suas instalações em dezembro de 2013. As suas instalações eram do tipo convencional, não atendiam as normativas da Anvisa, pois tal fato ainda não era obrigatório nesse período, o que poderia interferir nos resultados da fertilização assistida. Tal fato instigou a mudança para um local mais apropriado e que respondessem as exigências da RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) nº 33 de 17 de fevereiro de 2006. O LabRep/HC/UFG foi instalado em dezembro de 2013 em um novo local que foi previamente preparado, obedecendo a legislação da vigilância sanitária sobre as normas para o funcionamento de um laboratório de reprodução humana.

Este trabalho se propôs a comparar o sucesso na produção e qualidade de embriões, taxa de sucesso e fatores relacionados a gravidez no LabRep/HC/UFG, antes das adequações estrututurais, quando era classificado como laboratório convencional e após as novas exigências da Anvisa, quando passou a ser classificado como um laboratório ISO 5/7.

1.1 JUSTIFICATIVA

Existe um crescente interesse mundial na implantação de clínicas de reprodução assistida, devido à crescente demanda de mulheres inférteis que não conseguem engravidar espontaneamente por tratamento de baixa complexidade (IIU ou por coito programado) que vislumbram a possibilidade de engravidar e vir a dar a luz a crianças saudáveis. Em paralelo ao crescimento exponencial do número de clínicas surge também a necessidade de pesquisas que esclareçam fatores interferentes que prejudiquem ou alterem os resultados das técnicas em uso atualmente (HEITMANN *et al.*, 2015).

Os estudos sobre a reprodução humana assistida abrangem desde aspectos da ciência básica, técnicas modernas de inseminação artificial e implantação uterina de embriões, estratégias de correção da infertilidade causada por infecções. Há também a necessidade do conhecimento sobre as alterações provocadas pelos fatores ambientais e atmosféricos no interior das instalações físicas onde ocorre a manipulação de gametas e embriões (FOIZER;AMARAL;SADOYAMA, 2010).

Acredita-se que o controle da climatização, temperatura, umidade do ar, contaminação dos meios de cultura e a vazão de ar sejam fatores fundamentais para a uniformização dos procedimentos de reprodução assistida e dos resultados obtidos (ESTEVES, 2015).

Estudos tem demostrado que os gametas masculinos e femininos, bem como embriões humanos são extremamente vulneráveis à presença de poluentes presentes nos laboratórios de reprodução humana. Os agentes considerados tóxicos para gametas e embriões são: fumaça, poeira, solventes orgânicos, materiais de limpeza, mofo, bolor, monóxido de carbono, componentes referentes às instalações do laboratório (adesivos, tintas, dentre outros) (FOIZER *et al*., 2014; MUNCH *et al*., 2015).

A composição química das partículas encontradas no ar de interiores, incluído o interior de loboratórios é modificável, podendo conter impurezas e conter fibras minerais, fibras sintéticas, fungos, restos de insetos e resíduos alimentares, pólen, aerossóis de produtos de consumo e alérgenos (SOUZA; FORTUNA, 2011).

Os países desenvolvidos destinam muitos recursos a programas e pesquisas sobre reprodução assistida enfatizando a climatização e o ambiente interno. Os estudos tem chegado de forma avassaladora, e o primeiro impulso é adotar imediatamente uma abordagem já testada. Entretanto, uma análise mais profunda mostra que ainda existem dúvidas quanto à escolha da melhor estratégia, pois todas têm pontos positivos e negativos. As variações climáticas nas diferentes partes do planeta induzem desafios específicos a cada localidade (TEIXEIRA;BRIONIZIO;PEREIRA, 2010).

Antes de implantar uma metodologia de controle de qualidade, é fundamental conhecer as suas particularidades e analisar cuidadosamente as diferentes possibilidades, para determinar qual é a estratégia mais efetiva em termos de custos humanos e financeiros. Sendo o Brasil um país de nível continental, e sabendo-se que há uma enorme variação climática e ambiental, é indispensável obter informações sobre as características locais (SOUZA *et al*., 2010; GONTIJO; APPROBATO, 2013)

A necessidade de dispor de dados locais não exclui a grande importância da troca de experiências: cada estudo, se bem realizado, mesmo em localidades distantes umas das outras, servem de base para o delineamento dos programas e para o conhecimento cada vez maior sobre o assunto (ESTEVES, 2012).

No Brasil e estado de Goiás, são escassas as informações sobre a interferência do ambiente no sucesso das técnicas de reprodução assistida. Por esse motivo, este estudo pode contribuir ativamente para avaliar o impacto do ambiente dentro dos laboratórios dos resultados de tratamento de fertilização assistida.

1.2 HISTÓRICO DA REPRODUÇÃO ASSISTIDA

Em 1868 Girault enumerou 12 casos de fecundação artificial em uma mulher, datando o primeiro de 1838 e dos quais 8 tinham sido bem sucedidos. Este autor injetou sêmen na vagina, para levar o espermatozoide diretamente ao útero, sendo o precursor inseminação intra-uterina (GOUVEIA,1907).

Na década de 70, na Ingraterra, Patrick C. Steptoe e Robert Edwards realizaram a primeira FIV com sucesso e em 25 de julho de 1978, nasce o primeiro bebê de proveta chamada de Louise Joy Brow (STEPTOE; EDWARDS, 1978a).

No Brasil, o primeiro bebê de proveta por FIV nasceu em 7 de outubro de 1984, Anna Paula Caldeira, realizado pelo Dr. Milton Nakamura (MOURA *et al.*,2009).

No Chile, em 1985, foi publicado o episódio da primeira gestação conquistado por transferência de gametas (FERNANDEZ *et al.*, 1985).

No início da década de 90, iniciaram os trabalhos com o novo procedimento que revolucionou o tratamento de RHA, a injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) (PALERMO et al.,1992).

No Brasil, em 1996, iniciou-se a técnica de amadurecimento de oócitos em laboratório. Nesse mesmo ano na Inglaterra, uma mulher de 51 anos gera o seu próprio neto (PEREIRA, 2011).

Nessa mesma época um fato revolucionou a comunidade científica: nasceu o clone de uma ovelha, liderado pelo britânico Ian Wilmut (WILMUT *et al.*, 1997).

Em 2006, o grupo colegiado da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) cria a primeira resolução que regulamenta as diretrizes a serem seguidas nos laboratórios de reprodução humana no Brasil (ANVISA, 2006).

Nos últimos 20 anos, a RHA se fortaleceu no Brasil, inaugurando muitas clínicas em diferentes regiões do país. Poucos avanços foram feitos nesse período, recebendo destaque a criopreservação (FREITAS; SIQUEIRA; SEGRE, 2008).

Atualmente, existe uma busca contínua para aperfeiçoar as técnicas de RHA, com o intuito de obter melhores resultados nas mulheres que se submetem a técnica de Reprodução Assistida (PEREIRA, 2011).

1.3 ASPECTOS OBSTÉTRICOS DA REPRODUÇÃO HUMANA ASSISTIDA

1.3.1 INFERTILIDADE FEMININA

Vários fatores podem ser responsáveis pela infertilidade feminina, como: anomalias do cariótipo, alterações ovulatórias, obstrução nas tubas uterinas, muco cervical incapaz, alterações patológicas uterinas, sequela de doenças inflamatórias pélvicas, lesão tubária e causas desconhecidas (NUNES, 2007).

Em todo o mundo nas últimas décadas, há uma inclinação nas mulheres em adiar a maternidade, fato que pode ser comprovado pela diminuição do número de gestações em mulheres abaixo de 40 anos e aumento desse número entre mulheres acima dos 40 anos (KLIPSTEIN *et al.,* 2005).

O índice de fertilidade feminina piora com o aumento da idade, podendo ser observado um agravamento com idade superior a 35 anos, possuindo os piores índices a partir dos 40 anos de idade (MORAES *et al*., 2015).

Acredita-se na existência de defeitos nos estágios tardios de desenvolvimento folicular antral. Parece que as mulheres acima de 40 anos possuem alterações no processo de formação, crescimento e maturação folicular que caracteriza-se pela ovulação de um folículo que possui menor diâmetro, prejudicando a probabilidade de fertilização (CUNHA; WANDERLEY;GARRAFA, 2007; MORAES *et al*., 2015).

Em uma pesquisa, estudaram 932 mulheres inférteis que realizaram FIV ou ICSI . A idade delas variou entre 22 a 46 anos. E a média de sucesso do tratamento foi de 45,4% nas mulheres com faixa etária entre 22 a 30 anos e 25,1% nas mulheres com idade acima de 30 anos, mostrando diminuição significativa de sucesso do tratamento (ABREU *et al*., 2006).

Outro fator que influencia negativamente na fertilidade é a obesidade. Isso porque muitas mulheres obesas apresentam queda na fertilização natural, maior índice de abortos espontâneos, má resposta aos tratamentos de reprodução humana e uma tendência a complicações obstétricas. Uma pesquisa sistemática a respeito da influência da obesidade na reprodução humana, mostrou uma diminuição do sucesso da gravidez e a necessidade de se fazer uso medicamentoso de gonadotrofina em quantidades maiores do que as mulheres não obesas, além de uma elevação de índices de abortos (PASQUALI; PATTON; GAMBINERI, 2007; BELLVE *et al*., 2010).

No entanto, outros autores acreditam que o Índice de Massa Corporal (IMC) aumentado não interfere no resultado do tratamento de reprodução humana (THUM *et al*., 2007; MARTINUZZI *et al*., 2008; VILARINO *et al*., 2010).

Uma fundamentação científica para divergências de opinião dos diferentes autores a respeito da interferência ou não da obesidade nos resultados do tratamento de reprodução humana é a prevalência das pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) neste grupo, interferindo nos resultados do tratamento (MARTINUZZI *et al*., 2008; ORVIETO *et al*., 2009).

A combinação entre fatores como obesidade e infertilidade parece estar relacionada com a redução da frequência das ovulações. Existe uma relação entre obesidade e SOP, sendo a anovulação mais frequentemente encontrado em mulheres diagnosticadas com SOP obesas (>50% das pacientes com SOP) que nas portadoras de SOP não-obesas (PASQUALI, 2006; BELLVE *et al*., 2010).

Um estudo realizado por Robker et al. (2009) mostrou que em mulheres obesas o ambiente folicular também está alterado, mesmo nas mulheres em que não foi diagnosticado a SOP, com a elevação das taxas folicular de insulina, lactato, triglicerideos e proteína C reativa .

Em 2008, dois pesquisadores revelaram que hormônios derivados do tecido adiposo (exemplo: leptina e adiponectina) influenciam diretamente a reprodução e fertilidade (KYROU; TSIGOS, 2008).

1.3.2 INFERTILIDADE MASCULINA

Cerca de 50% dos casos de infertilidade humana, o fator responsável é o masculino. As principais causas são fatores intrínsecos, como: espermograma fora dos padrões da normalidade, alterações endócrinas, anomalias do cariótipo, azoospermia obstrutiva e secretora, câncer, anejaculação, lesões do escroto, criptorquia, ejaculação retrógrada, anomalias anatômicas e causas desconhecidas (NUNES, 2007).

A infertilidade masculina é dividida em apenas problemas de infertilidade masculina (30%) e infertilidade masculina associada a feminina (20%). Contudo, cerca de 50% dos casos de infertilidade masculina são oriundas de causas desconhecidas, podendo ser adquiridos ou congênitos (YU; YUNG-MING, 2010).

Vários fatores extrínsecos podem influenciar na infertilidade masculina, dentre eles: sedentarismo, uso excessivo de álcool, drogas, tabagismo, exposição ao calor excessivo, contato com substâncias químicas. Para análise da infertilidade masculina é de extrema importância a avaliação da história do paciente, bem como a do exame físico. Posteriormente deve-se realizar uma análise da qualidade espermática (HAMADA;ESTEVES; AGARWALL 2011).

Normalmente, a análise da qualidade espermática depende da avaliação minunciosa das características do ejaculado, dando destaque para a concentração, motilidade e análise morfológica (BUSHNIK *et al*., 2011).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, o semên possui os seus parâmetros dentro da normalidade quando: a concentração de espermatozoides está acima de 20 milhões por ml; e quanto a motilidade, pelo menos 50% dos espermatozoides devem possuir uma progressão linear. Quanto à morfologia, é considerado dentro dos padrões da normalidade quando no mínimo 30% dos espermatozoides apresentam formas ovais normais (WHO, 1999).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o sêmen para ter os parâmetros dentro da normalidade (normozoospermia) deve possuir: a concentração de espermatozóides acima de 15 milhões por ml; a quantidade

total de espermatozoides acima de 39 milhões e quanto à motilidade total, pelo menos a metade dos espermatozoides deve possuir uma progressão linear, com motilidade acima de 40%; hipospermia (volume de sêmen ejaculado inferior a 1.5 mililitros); astenozoospermia (redução ou ausência da mobilidade dos espermatozoides); teratozoospermia (menos de 4% de espermatozoides com morfologia normal); azoospermia (ausência de espermatozoides no sêmen.) e necrozoospermia (ejaculado com pelo menos 75% dos espermatozoides mortos) (WHO, 2010).

1.3.3 DOSAGENS HORMONAIS

Os distúrbios ovulatórios são encontrados em cerca de 20% a 30% das mulheres com infertilidade. Eles caracterizam-se por se apresentar em pacientes com amenorreia ou oligomenorreia acompanhadas de anovulação, quando o desenvolvimento e a ruptura folicular estão comprometidos e o oócito não é liberado (IZZO, 2008).

Para investigar problemas de infertilidade oriundos de causas hormonais preconiza-se realizar dosagens de FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante). A importância das dosagens desses hormônios é pelo fato de estarem associados ao amadurecimento e ruptura do folículo de Graaf. Outros hormônio são importantes para esclarecer o motivo da anolulação: estradiol, prolactina, TSH, T4 livre e testosterona (ALDRIGHI, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Os hormônios FSH e LH são avaliados entre o segundo e o quinto dia do ciclo menstrual, nesses dias, em mulheres que não apresentam alterações hormonais, as concentrações do hormônio FSH são maiores que a de LH (PORTO, 2007).

1.3.4 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DOS OÓCITOS

Durante o processo de desenvolvimento do folículo maduro, são encontrados algumas células da granulosa envolvendo-o. Essas células são

responsáveis por nutrir o oócito maduro durante o seu crescimento (KIM *et al*., 2008).

A sua camada de células mais profunda é conhecida como corona radiata. Essa camada é de extrema importância para o oócito, pois oócitos maduros que não apresentam o cúmulos, podem ter a sua qualidade comprometida (KIM *et al*., 2008).

Assim como o oócito depende da camada radiata para a sua nutrição, o cumulus também necessita do oócito para sua diferenciação, regulação e funções normais. Existem algumas projeções celulares específicas (das células do cumulus para a superfície do oócito) que induzem a uma ligação física e fechada com o oócito. Um dos componentes primordiais do complexo cumulus oophorus é a matriz extracelular em que as células do cumulus penetram. O processo de ovulação é um acontecimento que leva a secreção e regulação da matriz extracelular, tendo como resultado um aumento da camada do cumulus; esse procedimento resulta em um ambiente essencial para a fertilização. Essa união do cumulus oophorus e corona pode ser classificado, com auxílio de um microscópio óptico em maduro, maturidade intermediária e imaturo (GILCHRIST;LANE; THOMPSON, 2008).

O oócito é classificado como maduro (metáfase II) quando ele possui um complexo cumulus/corona expandido. Quando essa relação do complexo cumulus e corona está menos expandido, este oócito fica classificado em um estágio intermediário de maturidade (metáfase I). Uma ausência de expansão da relação do cumulus e corona está associada à imaturidade do oócito (prófase) (GILCHRIST; LANE; THOMPSON, 2008).

Segundo Kahraman; Yakin; Donmez (2000) um oócito para ser considerado de boa qualidade deve ter uma maturação citoplasmática e nuclear de forma simultânea.

O processo de maturação nuclear evidencia-se pela progressão do oócito até o estágio de metáfase II, que fica em repouso até o momento exato da ovulação (KIM *et al*., 2008).

A etapa de maturação citoplasmática diz respeito ao processamento do oócito para sua ativação, fertilização e desenvolvimento embrionário. Essa etapa é de grande relevância, pois verifica-se a recomposição das

organelas citoplasmáticas, tendo como resultado a migração dos grânulos corticais para os arredores do citoplasma (KAHRAMAN; YAKIN; DONMEZ .,2000; KIM *et al*., 2008).

Graças a técnica de ICSI, retira-se as células da camada do cumulus oophorus tendo assim a possibilidade de observar os aspectos morfológicos dos oócitos por meio de uma microscopia de luz. Através desta técnica foi possível observar as alterações morfológicas do oócito (AGGELIS *et al.*, 2006).

Um oócito para ser considerado de boa qualidade deve apresentar o seu citoplasma descorado com moderada quantidade de grânulos (TEN *et al*., 2007).

Não existe um consenso entre os autores sobre a influência das características dos oócitos e o sucesso do tratamento de fertilização. Vários pesquisadores defendem que oócitos sem defeitos morfológicos levam a melhores resultados na fertilização. Já uma outra parte dos autores sugerem pouca influência morfológica dos oócitos na taxa de fertilização (CIOTTI *et al.*, 2004; ESFANDIARI *et al*., 2005).

Esfandiari et al. (2005) em seu relato de caso, descreveram uma gravidez bem sucedida após a transferência de embriões a partir de oócitos com morfologia anormal. A avaliação dos dados comparativos entre as condições de funcionamento antes e depois das normativas da Anvisa, pretende avaliar o impacto dessas regras sobre o sucesso dos procedimentos realizados.

1.3.5 TECNICAS DE REPRODUÇÃO HUMANA ASSISTIDA (RHA) USADAS NO BRASIL

Reprodução assistida envolve um conjunto de técnicas de manipulação *in vitro*, dentro de um laboratório específico para manipulação de embriões, com o objetivo final de obter uma gravidez química. Os procedimentos envolvidos na reprodução assistida são divididos em dois grupos: os de alta e baixa complexidade (MOURA; SOUZA; SCHEFFER 2009)

1.3.5.1 TÉCNICAS DE BAIXA COMPLEXIDADE

A) INSEMINAÇÃO INTRA-UTERINA (IIU)

Em meados do século XIX, julgava-se que a infertilidade era apenas um problema de fator feminino e, portanto, a técnica de IIU não era utilizada para tratar a infertilidade masculina. Somente no ano de 1884, ao examinar um casal com problemas em conceber um filho, o médico Pancoast, constatou que o problema de esterilidade era de fator masculino (RAMIREZ-GALVEZ, 2008).

A técnica de IIU foi a primeira técnica utilizada para tratar problemas de infertilidade, proporcionando aos casais o direito à perpetuação de sua descendência. Essa técnica é muito utilizada atualmente, oferecendo baixos custos, dentre as outras técnicas. Por outro lado, sua taxa de eficácia é menor do que a FIV (RAMIREZ-GALVEZ, 2008).

Essa técnica está inserida no grupo de procedimentos de baixa complexidade, onde inicialmente os espermatozoides passam por uma etapa de capacitação. Nessa etapa, os espermatozoides tornam-se mais ativos e são introduzidos, com auxílio de um cateter, na parte profunda do útero, assim a fertilização ocorre de forma espontânea (SILVA, 2011).

1.3.5.2 TÉCNICAS DE ALTA COMPLEXIDADE

Antes de realizar um tratamento de fertilização *in vitro*, é necessário a realização de exames de infecções. A Anvisa, por meio da RDC 23/11 exige que todos os casais tenham sorologias para HIV, VDRL e HTLV I e II, HbsAg, anti HCV, anti HBC IgG e IgM, sorologia para Clamídia IgG, rubéola IgG, chagas IgG e IgM citomegalovírus, toxoplasmose. Diante de algum resultado positivo para HIV e hepatites, existe a necessidade do procedimento ser realizado em laboratório específico isolado, não podendo ocorrer em concomitância com casos soronegativos (ANVISA, 2011).

A) FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* – FIV

A FIV clássica, está inserida no grupo de alta complexidade e consiste no manuseio dos gametas feminino e masculino em laboratório, ocorrendo, durante o procedimento, a fertilização *in vitro* espontânea dos óvulos pelos espermatozoides, com posterior formação de pré-embriões que são conduzidos para o útero. Entre as principais indicações para a aplicação dessa técnica estão os fatores tuboperitoneais; a infertilidade masculina, onde após o processamento do sêmen, este apresente entre 5 a 10 milhões de espermatozoides, com forma e motilidade dentro dos padrões da normalidade; três ou mais tentativas sem sucesso de inseminação artificial intrauterina; e esterilidade sem causa aparente (STEPTOE; EDWARDS, 1978b; PEREIRA, 2011).

Após a avaliação do útero e seus anexos, realiza-se uma hiperestimulação ovariana controlada (COC). Essa hiperestimulação, na maioria das vezes, possibilita o encontro de um maior número de oócitos maduros, e como consequência, um número aumentado de embriões. Com isto, tem-se a possibilidade de escolher embriões melhores, sem fragmentação, para a transferência uterina, levando a uma maior chance de gestação (CHEN *et al*., 2013).

B) INJEÇÃO INTRA-CITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDE (ICSI)

A técnica de ICSI foi desenvolvida no ano de 1992 em Bruxelas, sendo considerada uma técnica inovadora para tratamento da infertilidade masculina. Ela está enquadrada no grupo de técnicas de grande complexidade e transformou o tratamento para a infertilidade masculina de alto grau, aumentando a possibilidade de êxito nesse tratamento (SILVA, 2011).

A grande utilização desta técnica levou a um aumento nas taxas de reprodução humana, obtendo um maior sucesso no tratamento (gravidez). Atualmente o seu uso é fundamental no arsenal terapêutico para o

tratamento da infertilidade. Essa técnica refere-se a um método delicado e refinado, que diariamente permite o nascimento de milhares de crianças em todo o mundo e que é considerada extremamente segura e eficaz, quando realizada por embriologistas experientes (GRACIANO, 2014).

Essa técnica baseia-se na introdução de um único espermatozoide dentro dos oócitos obtidos a partir dos ovários da mulher, originando-se assim embriões. Depois de formados, esses embriões são transferidos para o útero, onde poderão implantar-se e originar uma gravidez (DZIK *et al.*, 2014).

Quando realiza um ciclo de ICSI, a mulher começa a ser submetida a tratamento com hormônios. São estes medicamentos (semelhantes aos hormônios que existem naturalmente no organismo feminino) que vão estimular os ovários a produzirem mais oócitos que o habitual. O desenvolvimento dos oócitos é controlado através da realização periódica de ultrassonografias e análises sanguíneas. Quando o médico verifica que os folículos ovárianos já estão suficientemente desenvolvidos, é administrada o hormônio da gonadotrofina coriônica humana – hCG, cuja função é promover a libertação dos ovócitos a partir dos folículos (CIOTTI *et al.*, 2004; SILVEIRA *et al*., 2013).

Segundo Aggelis et al., (2006), uma vez formados, os embriões (geralmente um a quatro) são colocados no útero da mulher, para que ocorra a implantação e como consequência, a gravidez. Os embriões podem ser transferidos do 3º até o 6º dia após a coleta de oócitos. Essa técnica é indicada nos seguintes casos:

- Alterações graves na concentração, características físicas e/ou mobilidade dos espermatozoides;
- Aumento da quantidade de anticorpos anti-espermatozoide;
- Falta de fecundação em tentativas de FIV convencional;
- Sêmen congelado;
- Ejaculação retrógrada;
- Ausência congênita ou obstrução dos canais deferentes;
- Homens vasectomizados.

A ICSI é também particularmente útil nas situações em que os espermatozoides por qualquer razão não conseguem adentrar nos oócitos e

nos casos em que estes têm fomato anormais. Nos casos de mulheres com reserva ovariana diminuída, poderá ser preferível autilização da técnica de ICSI em vez da FIV tradicional, pois o risco de uma eventual falha de fecundação da técnica de FIV poderia colocar em risco todo o tratamento. A ICSI também pode ser utilizada nos casos em que é necessário recorrer oócitos de doadoras (TEN *et al*., 2007).

1.4 REGULAMENTAÇÃO DA RHA NO BRASIL

No Brasil existem 106 laboratórios de Reprodução Humana. Desses apenas nove são instituições públicas e 97 são particulares. Das instituições públicas, seis fornecem todo o tratamento de forma gratuita e três instituições públicas fornecem o serviço de forma gratuita, porém cobram pela medicação utilizada pelo casal. A cidade do Rio de Janeiro, conta com um serviço público que fornece apenas os exames para estabelecer o diagnóstico da causa da infertilidade (ANVISA, 2015).

Havia no Brasil uma falta de legislação, em especial relacionada ao número de pré-embriões transferidos. Isso fez com que as gestações múltiplas aumentassem exponencialmente, essas concepções são tidas como um grande problema de saúde pública, pois existe um risco elevado causados às mães, às crianças levando a um alto custo para o sistema público de saúde (FREITAS; SIQUEIRA; SEGRE, 2008).

Ainda se dispunha de um fator agravante (antes de 2006), para regulamentação da reprodução humana. Visto que as técnicas eram regulamentadas somente pelas normativas éticas constituídas pelo Conselho Federal de Medicina. Somente em 2006 a Diretoria Colegiada da Anvisa criou a Resolução (RDC) n^{o} 33 de 17 de fevereiro de 2006, que posteriormente foi atualizada pela RDC n^{o} 23 de 27 de maio de 2011, que estabeleceu normas para os laboratórios de Reprodução Humana no Brasil (ANVISA, 2011).

A resolução RDC n^{o} 23, de 27 de maio de 2011 no capítulo IV que regulamenta a infra-estrutura e as características dos ambientes e

equipamentos dos Bancos de Células e Tecidos Germinativos (BCTG preconiza que:

"Art. 38 O laboratório de fertilização *in vitro* deve possuir:

I-sistema de climatização que mantenha pressão positiva em relação aos ambientes adjacentes;

II- condições de controle da temperatura entre 23ºC a 27ºC;

III- umidade relativa do ar de 40% a 70%;

IV- vazão mínima de ar total de 45 $(m^3/h)/m^2$;

V- vazão mínima de ar exterior de 15 $(m^3/h)/m^2$ e;

VI- filtragem mínima no insuflamento com filtros G3+carvão ativado+F8.

§ 1º O ambiente a que se refere o *caput* deste artigo não deve possuir qualquer instalação hidrossanitária, tais como pias, ralos ou lavatórios.

§ 2º O insuflamento de ar do sistema de climatização da sala a que se refere o *caput* deste artigo deve ser efetuado de forma a não interferir no fluxo do equipamento utilizado para a manipulação de amostras.

Art.39 A manipulação das amostras deve ser efetuada em uma área limpa classificada, no mínimo, como ISO Classe 5, segundo a Resolução de Diretoria Colegiada da ANVISA nº 50, de 2002, ou a que vier a substituí-la, e, para a obtenção dessas condições, o Bancos de Células e Tecidos Germinativos (BCTG) deve utilizar uma das seguintes opções:

I- cabine de segurança biológica Classe II Tipo A;

II- módulo de fluxo unidirecional ; ou

III- sala classificada, como ISO classe 5 no mínimo, segundo as orientações da Resolução de Diretoria Colegiada ANVISA n^o 50, de 2002, ou a que vier a substituí-la.

Parágrafo único. No caso do inciso III deste artigo, o BCTG deve obrigatoriamente possuir uma antecâmara de acesso à sala de processamento."

Em virtude do grande risco sofrido pelas mulheres e concepto nas gestações múltiplas, em 16 de junho de 2015, foi criada pelo Conselho Federal de Medicina a resolução Nº 2.121/2015, que estabelece um limite para a tranferência de embriões de acordo com a idade (CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA, 2015).

"Art. I - PRINCÍPIOS GERAIS:

7 - O número máximo de oócitos e embriões a serem transferidos para a receptora não pode ser superior a quatro. Quanto ao número de embriões a serem transferidos, fazem-se as seguintes determinações de acordo com a idade: a) mulheres até 35 anos: até 2 embriões; b) mulheres entre 36 e 39 anos: até 3 embriões; c) mulheres com 40 anos ou mais: até 4 embriões; d) nas situações de doação de óvulos e embriões, considera-se a idade da doadora no momento da coleta dos óvulos.

1.4.1 Sistema Nacional de Produção de Embriões (SisEmbrio)

O SisEmbrio foi criado no ano de 2008, segundo a ANVISA (2015), pela Resolução de Diretoria Colegiada/Anvisa RDC, e remodelado pela RDC nº 23/2011, com os seguintes intuitos:

a) Saber a quantidade de embriões humanos criados nos laboratórios de reprodução humana e que estão congelados nos bancos de células e tecidos germinativos.
b) Manter os informes a respeito de embriões doados para pesquisa em células-tronco, de acordo com a Lei nº 11.105/2005 e Decreto no 5.591/2005 atualizados.
c) Comunicar os informes pertinentes à elaboração de células germinativas (oócitos e embrião), como: a quantidade de ciclos de fertilização assistida efetuados, número de oócitos criados, número de oócitos inseminados, número de oócitos que após a sua fertilização possuem 2 pronúcleos, número de embriões divididos, bem como o número de embriões descartados por serem classificados como inviáveis.
d) Realizar a publicação de indicadores de qualidade dos Bancos, com o intuito de trazer uma melhora constante da qualidade dos laboratórios de reprodução assistida.

1.4.2 Produção de células germinativas e embriões humanos utilizados nas técnicas de fertilização *in vitro*

Apenas 106 Bancos de Células e Tecidos Germinativos (BCTGs) comunicaram sua produção, conforme exigências da RDC nº 23/2011. O quadro 1 mostra o total de transferência de embriões, 60.668, nas mulheres que submeteram as técnicas de fertilização *in vitro* em todo o país. Do total de tratamentos, foram informados 27.871 ciclos de tratamento de fertilização, possuindo uma totalidade de oócitos de 257.006 (ANVISA, 2015).

A divulgação da resolução nº 23/2011 da Anvisa definiu novos dados de criação de células e tecidos germinativos, para proporcionar o otimização de indicadores de qualidade dos BCTGs. O quadro 1 resume os dados de:

quantitativo de tratamentos de fertilização *in vitro* ocorridos, número de oócitos criados, número de embriões transferidos e quantidade de embriões desprezados por serem considerados inviáveis; conforme a resolução RDC nº 23/2011, os embriões que não tiverem divisão em quarenta e oito horas após o processo de fertilização deverão ser classificados como inviáveis e deverão ser descartados (ANVISA, 2015).

Quadro 1: Resumo dos dados informados no SisEmbrio referentes à produção de células (oócitos)e embriões segundo a Unidade Federativa (ano base: 2014).

Unidade Federada	Quantidade de serviços	Número de ciclos realizados	Número de oócitos produzidos	Número de embriões transferidos	Número de embriões descartados
BA	2	853	7.571	1.409	1.164
CE	3	910	6.506	3.040	246
DF	3	788	7.581	1.729	1.263
ES	2	455	3.809	1.305	376
GO	3	838	7.401	2.238	832
MA	1	62	671	172	76
MT	1	244	2.817	601	480
MS	1	226	2.105	493	543
MG	12	2.400	21.877	5.204	4.914
PA	1	119	784	222	168
PR	13	1.852	14.598	4.031	2.244
PE	1	245	2.941	1.831	370
PI	2	212	2.597	578	373
RJ	9	2.820	29.116	6.500	3.202
RN	1	57	474	160	-
RS	6	2.199	19.433	4.782	3.236
SC	6	748	6.382	1.907	1.041
SP	37	12.649	118.691	24.004	21.076
SE	2	194	1.652	462	226
Total	106	27.871	257.006	60.668	41.830

Fonte: SisEmbrio/Anvisa-2015, dados obtidos em 20/02/2015.

1.4.3 Informações sobre indicadores de qualidade em Bancos de Células e Tecidos Germinativos- BGTC

De acordo com a ANVISA (2015), a gerência de sangue, tecidos, células e órgãos-GSTCO postulou algumas medidas com o intuito de contribuir com a qualidade e na verificação realizada pela vigilância sanitária nos BCTGs. Esses indicadores, juntamente com as avaliações da vigilância sanitária, levarão a um resultado satisfatório quanto a qualidade e segurança na excução de técnicas de fertilização *in vitro.*

O quadro 2 demonstra os resultados dos indicadores propostos, a saber:

• Quantidade média de oócitos por mulher, formados a partir dos ciclos de fertilização *in vitro* realizados;

• Taxa de fertilização *in vitro*;

• Taxa de clivagem embrionária.

Os dados dos indicadores no âmbito regional e nacional demonstram maior média de óocitos por mulher (9,5) nas regiões Centro Oeste e no Sudeste, quando contrastados com a porcentagem no país (9,2) (ANVISA, 2015).

A taxa de clivagem, manteve-se constante quando comparada com os dados nacionais. Já as taxas de fertilização, mostrou resultados superiores e compatíveis com pesquisas internacionais, oscilando de 65% a 75% (ANVISA, 2015).

Quadro 2: Resumo dos indicadores por Unidade Federada, Região e Nacional, Brasil, ano base 2014.

Unidade Federada	Quantidade de serviços	Média de oócitos por mulher	Média da taxa de fertilização	Média da taxa de clivagem embrionária
BA	2	8,9	64%	95%
CE	3	7,1	73%	98%
MA	1	10,8	79%	95%
PE	1	12,0	81%	97%
PI	2	12,3	80%	98%
RN	1	8,3	54%	109%**
SE	2	8,5	81%	95%
Nordeste	12	8,85	72%	97%
DF	3	9,6	72%	94%
GO	3	8,8	73%	88%
MT	1	11,5	76%	96%
MS	1	9,3	72%	98%
Centro-Oeste	8	9,5	73%	92%
PA	1	6,6	62%	94%
Norte	1	6,6	62%	94%
ES	2	8,4	77%	100%
MG	12	9,1	77%	92%
RJ	9	10,3	73%	98%
SP	37	9,4	73%	95%
Sudeste	60	9,5	74%	95%
PR	13	7,9	71%	97%
RS	6	8,8	75%	97%
SC	6	8,5	78%	98%
Sul	25	8,4	74%	97%
Nacional	106	9,2	74%	95%

Fonte: SisEmbrio/Anvisa-2015, dados obtidos em 20/02/2015.

O quadro 3 demonstra os indicadores dos BCTGs da Região Centro Oeste no ano de 2014, porém os dados não podem ser analizados de forma

isolada pois não foram pareados em relação a fatores como: idade e morbidade, que refletem na qualidade dos gametas (ANVISA, 2015).

A atualização e publicação dos dados dos indicadores de qualidade dos BCTGs é um mecanismo a mais para os laboratórios específicos utilizarem suas informações para verificarem sua eficácia, provocando a busca de melhores resultados dos tratamentos de FIV (ANVISA, 2015).

Quadro 3. Indicadores dos Bancos de Células e Tecidos Germinativos da Região Centro-Oeste (ano base: 2014).

UF	Nome Fantasia	Média de oócitos por mulher	Média da taxa de fertilização	Média da taxa de clivagem embrionária
DF	Hospital Regional da Asa Sul - HRAS	7,6	61%	99%
	Genesis	8,9	74%	87%
	Instituto Verhum	11,2	73%	98%
GO	Fertile Diagnosticos	10,8	73%	93%
	Hospital das Clínicas da UFG	4,2	68%	98%
	Humana Medicina Reprodutiva	8,9	75%	81%
	Clínica In Vitro	Não Informado*		
MT	Life Reprodução Humana	11,5	76%	96%
	Clínica Intro	Não Informado*		
	X&Y Medicina e Diagnóstico	Não Informado*		
MS	Fertility Campo Grande	9,3	72%	98%
Média Centro-Oeste		9,5	73%	92%
Média Nacional		9,2	74%	95%

Fonte: SisEmbrio/Anvisa-2014, dados obtidos em 20/02/2015.

1.5 A QUALIDADE DO AR EM AMBIENTES HOSPITALARES CLIMATIZADOS E EM BCTG E SUA INFLUÊNCIA NA OCORRÊNCIA DE INFECÇÕES

1.5.1 Ambientes hospitalares

Na década de 30, foram criados os primeiros ambientes climatizados, onde eram controlados a temperatura do ambiente e a umidade do ar, levando conforto para a população que ali conviviam (TEIXEIRA; BRIONIZIO; PEREIRA, 2010).

Na década de 70, aparecem os primeiros casos de problemas de saúde oriundos dos indivíduos que ocupavam os ambientes climatizados artificialmente. Somente na década de 80 iniciaram os primeiros estudos sobre o assunto, relatando a presença da “Síndrome dos Edifícios Doentes”. Em 1983 a Organização Mundial de Saúde (OMS) destacou que os indivíduos que ocupavam ambientes climatizados artificialmente possuíam uma alta prevalência desta síndrome. Esta síndrome traz vários sintomas incluem cefaléia, problemas oculares, sintomas nasais e dificuldade de manter a concentração no trabalho, problemas esses causados principalmente pela presença de material particulado (TEIXEIRA; BRIONIZIO; PEREIRA, 2010).

Material particulado é a expressão usada para denominar uma mistura física e química de várias substâncias que estão suspensas no ar em estados sólido ou líquido. Dentre os vários materiais poluentes presentes no interior dos ambientes climatizados, os particulados possuem a forma mais aparente de poluição, sendo facilmente detectados. O material particulado total é denomindada pela expressão matéria particulada em suspensão, porém a partícula para ser inalada deve possuir o tamanho pequeno para conseguir passar pelas vias aéreas superiores e alcançar os pulmões (MADRID *et al.*, 2010).

Para avaliar os índices de ventilação de um ambiente climatizado utiliza-se a princípio, a taxa de CO_2, onde determina-se a quantidade de ar externo misturado com o ar recirculado. Em condições normais, as taxas superiores a 10.000 ppm, já indicam que o nível de ventilação podem estar

inadequadas para conseguir retirar os poluentes mais nocivos que podem estar presentes (SOUZA; FORTUNA, 2011).

Os contaminantes, como fungos, bactérias, algas, ácaros, amebas usam algumas partículas como, pedaços de insetos mortos, pele humana e pêlos, pólen onde multiplicam-se, dobrando a população a cada 20 segundos, eles são dependentes do parasitismo celular para multiplicação (SOUZA; FORTUNA, 2011).

Desde 1985 já eram conhecidos os riscos dos ambientes hospitalares no Brasil, e eles foram classificados por seu potencial de risco para infecção em:1) áreas classificadas como não críticas, onde não são ocupadas por pacientes (escritórios e almoxarifado); 2) áreas semicríticas, que são ocupadas por pacientes que não exigem cuidados intensivos ou de isolamento (enfermarias e ambulatórios); 3) áreas críticas, são aquelas áreas que podem oferecer risco potencial para a infecção, seja por realização de procedimentos invasivos ou presença de pacientes com sistema imunológico apresentando baixa resistência ou ainda pelo risco ocupacional com trabalhadores que manuseiam substâncias infectantes (BRASIL, 1985).

Os agentes carreadores de partículas que podem causar contaminação são classificadas em internos e externos. Dentre os agentes internos podemos destacar os indivíduos que circulam no local, os ventiladores, ar condicionado, nebulizadores e umidificadores, pisos e vasos de plantas e até mesmo certos tipos de alimentos. Em relação aos agentes externos podemos destacar o solo, a água, o material orgânico em desagregação, a poeira oriunda de construções e reformas. No ambiente interno a contaminação microbiológica pode ser considerada um problema grave, pois uma série de fatores permite a propagação e a liberação desses agentes biológicos no ar. Um dos fatores que contribuem para o crescimento e a liberação desses microorganismos são a alta umidade do ar, uma diminuição da ventilação e ar condicionado que possuem água ou condensação em algumas partes (torres de resfriamento) (COZMAN, 2011).

Aparelho de ar condicionados tem um grande potencial para contaminar-se com partículas, poeira e filtros colonizados, geradas na sua maioria por hospedeiros e afetam principalmente os indivíduos

imunocomprometidos. Como, fungos e bactérias conseguem sobreviver em ambientes secos por longos períodos (EICKHOFF, 1994; TEIXEIRA; BRIONIZIO; PEREIRA, 2010).

Os microorganismos com maior prevalência em locais climatizados são: as bactérias *Legionella pneumophila, Bacillus* spp, *Flavobacterium* spp, *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Mycobacterium tuberculosis, Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, Actinomyces* spp, *Acinetobacter* spp; os fungos *Paracoccidioides* spp, *Penicillium* spp, *Cladosporium* spp e *Fusarium* spp. Em relação a prevalência fúngica, o *Aspergillus spp* é o de maior gravidade, quando agregado à infecção em pacientes imunocomprometidos (COZMAN, 2011).

1.5.2 Controle de qualidade do Laboratório de Reprodução Humana

Para manter a qualidade em laboratórios de reprodução humana é de extrema importância a implementação de sistemas de controle de qualidade eficazes, mantendo a garantia a padronização metodológica em todos os seus procedimentos (ESTEVES, 2012).

O Brasil passou a tomar medidas mais rígidas em relação ao controle de qualidade dos laboratórios de reprodução humana a partir da promulgação da resolução normativa n^{o}. 33, de 17 de fevereiro de 2006, pela ANVISA (ANVISA 2006; ANVISA, 2011).

Esta resolução fundamenta-se na proposição de que é indispensável assegurar a saúde pública, resguardando-se do risco de transmissão de qualquer doença infecto-contagiosa através de material biológico contaminado (ESTEVES, 2007; ESTEVES; BENTO, 2013).

O aperfeiçoamento na normalização, competência, transparência e rastreamento em todas as ações desenvolvidas em laboratórios de reprodução assistida possibilitará o aumento da segurança das atividades, outrossim solidificará a competência dos serviços prestados, no sentido de que são eficientes para realizarem resultados de qualidade e com

baixíssimos riscos para a saúde da população (ESTEVES, 2007; ESTEVES; BENTO, 2013).

Alguns pesquisadores alegam que a elaboração de modelos de gestão de qualidade levará a um acréscimo no preço das atividades. Outrossim, eles argumentam o real efeito de algumas deliberações sendo que uma delas é a importância do controle ambiental no laboratório de fertilização assistida, pois o risco de infecções oriunda das atividades de reprodução assistida é muito pequena (MORTIMER, 2005).

Existem várias críticas quanto a necessidade do controle da qualidade do ar do laboratório de fertilização assistida, porém os críticos baseiam-se apenas em conceitos empíricos e não comprovados (ESTEVES, 2007; ESTEVES; BENTO, 2013).

Segundo a RDC n^{o}. 33, de 17 de fevereiro de 2006, pela Anvisa, estabeleceu-se que a partir da publicação da sua resolução, os laboratórios de reprodução humana teriam o prazo de até um ano para às adequações a suas normativas, e que esses laboratórios passariam a ser chamados de “Banco de Células e Tecidos Germinativos (BCTG)”(ANVISA, 2006; (ANVISA, 2011).

Os principais pontos exigidos pela normativa n^{o} 33, de 17 de fevereiro de 2006, que foram atualizados pela RDC n^{o} 23 de 27 de maio de 2011, foram: implantar um programa de garantia da qualidade (criação de um manual técnico-operacional; criação do procedimento operacional padrão) (POP) e providenciar uma infraestrutura adequada para a manipulação de embriões, através da criação de salas específicas, que tenham:

No que tange ao paciente, a sala específica para preparo de sêmen (com sistema de climatização positiva e temperatura entre 21 a 24 ºC; umidade relativa do ar entre 40% e 60%; vazão mínima de ar total de 45 (m^3/h)/m^2; vazão mínima de ar exterior de 15 (m^3/h)/m^2 e filtragem mínima no insuflamento com filtros G3 (filtro grosso) e filtros F8 (filtros finos capazes de prender partículas de 0,4 µm).

O local específico do laboratório para fertilização é designado para que contenham as mesmas especificidades quanto ao sistema de climatização da sala de preparo de embriões, e ainda a manipulação de

gametas deve ser realizada em uma sala denominada como sala limpa, esta sala deve ser classificada como ISO 5 (Até 3.520 partículas de 0,5µm e 29 partículas de 5µm por metro cúbico) (TABELA 1) (ESTEVES; BENTO, 2015).

Tabela 1- Classes de limpeza do ar para níveis de partículas em suspensão em salas limpas e zonas limpas segundo a Organização Internacional de Normalização (ISO) norma 14644-1.

Partículas/m^3 por tamanho: ISO 14644-1

	0.1 µm	0.2 µm	0.3 µm	0.5 µm	1 µm	5 µm
ISO 1	10	2				
ISO2	100	24	10	4		
ISO3	1,000	237	102	35	8	
ISO4	10,000	2,370	1,020	352	83	
ISO5	100,000	23,700	10,200	3,520	832	29
ISO6	1,000,000	237,000	102,000	35,200	8,320	293
ISO7				352,000	83,200	2,930

Fonte: ESTEVES; BENTO, 2015.

As partículas contaminantes são oriundas dos processos de instalações, equipamentos e pelos próprios funcionários do laboratório. Algumas dessas partículas estão constantemente no laboratório, como vírus, bactérias, com partículas inertes submicrométricas de medição <1 mm ou outras partículas podem estar temporariamente suspensas, como por exemplo: resíduos de limpeza, roupas, pele com partículas inertes submicrométricas de medição 1-100 µm. Contudo partículas acima de 0,3 µm tem potencial de contaminação no ambiente de fertilização *in vitro*. Essa contaminação ocorre porque as bactérias e outros contaminantes podem se unir às partículas, então uma diminuição das partículas leva a um aumento da qualidade de ar (ESTEVES; BENTO, 2015).

1.6 CONTAMINAÇÃO MICROBIANA DO AR E DE CULTURAS DE EMBRIÕES EM LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA

Existem relatos da associação entre condições químicas e ambientais insalubres do ar (por exemplo, bactérias, poeira, materiais particulados e compostos voláteis) e a redução da taxa de sucesso na produção de embriões e na ocorrência de gravidez (BOONE *et al*., 1999; FOIZER *et al.*, 2014; ESTEVES; BENTO, 2015; HEITMANN *et al*., 2015; MUNCH *et al.*, 2015).

O Doutor William R. Boone em 1994, observou durante a ampliação de seu laboratório de reprodução assistida no Hospital de Greenville, localizado na Carolina do Sul nos Estados Unidos, um aumento de odores no laboratório. Foi observado também um aumento dos níveis de poeira e outras partículas associadas com a instalação dos equipamentos, bem como os odores provenientes de tintas e cola de azulejos. Simultaneamente a taxa de gravidez clínica reduziu e o sucesso dos procedimentos de fertilização *in vitro* diminuiu de 35% (25 de 71), em 1993, a 16% (11 de 68) em 1994 (BOONE *et al*., 1999).

Dessa forma foi demonstrado pela primeira vez que a qualidade ruim do ar prejudica o desenvolvimento embrionário em clínicas de reprodução assistida. Com a limpeza do ar e redução dos odores observou-se um aumento gradual nas taxas de gravidez durante os anos subsequentes. As taxas de gravidez aumentaram ligeiramente em 1995 (20%) após a instalação da sala limpa e, em seguida, dramaticamente em 1996 e 1997 (32% e 59%, respectivamente) (BOONE *et al*., 1999).

Peter et al (2007), durante um período de 8 anos (janeiro de 1997 a dezembro de 2004), observou que em 13.977 ciclos de FIV, a contaminação microbiana foi observada em 95 casos (0,68%) das placas de cultura para microrganismos. Todas as infecções foram comprovadas por investigações microbiológicas e foram investigados os detalhes relevantes em ambos os ciclos de tratamento de fertilidade e as cepas microbianas foram isoladas e identificadas. Os principais microrganismos identificados foram: *Escherichia coli* (n = 56; 58,9%) e as espécies de *Candida* (n = 24; 25,3%). Das cepas de *E. coli* isoladas, 41 (73,2%) eram resistentes a ambos os antibióticos

utilizados no meio de cultura e 13 (23,2%) eram resistentes a penicilina ou estreptomicina. De todas as cepas bacterianas isoladas as resistências eram de 61,4% para ambos e 30% a um dos antibióticos utilizados.

Embora a contaminação microbiana de placas de cultura de embriões ocorra ocasionalmente mesmo com o uso de meio contendo penicilina e estreptomicina, um número crescente de infecções tem sido observada nos laboratórios de reprodução humana (PETER *et al.*, 2007).

A consequência da contaminação nas placas de cultivo de patógenos leva a redução da formação de embriões saudáveis para transferência. Contudo, esses embriões apresentam dificuldade de sobreviver durante as primeiras clivagens; podem também apresentar teratogenia, ou simplesmente não conseguir implantar-se. Existe ainda um alto risco de infectar o organismo materno, com consequências temporárias ou definitivas (KASTROP *et al*., 2007; FOIZER *et al*., 2014).

Ainda não existem pesquisas relacionando malformações congênitas e contaminação microbiológica nos laboratórios de reprodução humana, porém existem evidências que sua presença danificam o aparelho reprodutivo levando a malformações em fetos bovinos (CAETANO *et al.*, 2005).

O conhecimento a respeito de que a provável contaminação seja oriunda dos gametas, ou da contaminação interna do ar, acarreta a necessidade de rastrear e controlar a contaminação microbiológica dentro do laboratório de reprodução humana, com o intuito de verificar se existe associação entre contaminação microbiológica e o sucesso na reprodução humana (FOIZER *et al*., 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Comparar fatores de sucesso no número e qualidade de embriões no LabRep/HC/UFG, antes das adequações estrututurais (laboratório de reprodução humana convencional) e após as adequações, quando passou a ser classificado como um laboratório de reprodução humana ISO 5/7.

2.2 ESPECÍFICOS

2.2.1. Realizar uma revisão bibliográfica sobre a relação entre alterações bioquímicas, ambientais e microbiológicas e o sucesso da técnica de fertilização in vitro (Artigo1).

2.2.2. Comparar o sucesso na fertilização e reprodução entre os laboratórios ISO 5/7 e convencional (Manuscrito 1).

2.2.3 Avaliar no LabRep outros fatores não dependentes do laboratório, porém relacionados ao sucesso da fertilização assistida (Manuscrito 2).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DO ESTUDO

O trabalho foi realizado no Laboratório de Reprodução Humana, localizado no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás LabRep/HC/UFG, em Goiânia, Goiás, Brasil.

É um serviço universitário na rede de saúde pública de Goiás, que atua na área da reprodução humana, e funciona sob o formato de projeto de extensão, oferecendo fertilização assistida de alta e baixa complexidade além de desenvolver pesquisas na área de Reprodução Assistida e outras relacionadas.

Foi inaugurado em 12 de dezembro de 1989 oferecendo técnicas de baixa complexidade (inseminação intra-uterina e coito programado). Em 2002 passou a oferecer também as técnicas de alta complexidade (FIV e ICSI) à população.

A equipe é composta por médicos ginecologistas e urologistas especialistas em Reprodução humana, por enfermeiras especialistas em ginecologia/obstetrícia , técnicas de enfermagem e biomédicas especialistas em embriologia. Disponibiliza ainda, a residência em ginecologia, especialidade de reprodução humana e TAV (treinamento avançado em reprodução humana), mestrado e doutorado na área.

Em dezembro de 2013, o LabRep/HC/UFG passou por profundas modificações, visando atender a RDC nº 23 de 27 de maio de 2011. Atualmente o novo laboratório de Reprodução humana do Hospital das Clínicas possui sistema de climatização que mantém pressão positiva em relação aos ambientes adjacentes; condições de controle da temperatura entre 23ºC a 27ºC; umidade relativa do ar de 40% a 70%; vazão mínima de ar total de 45 $(m^3/h)/m^2$; vazão mínima de ar exterior de 15 $(m^3/h)/m^2$ e filtragem mínima no insuflamento com filtros G3 (filtro grosso) e filtros F8 (filtros finos capaz de prender partículas de 0,4 µm) (ANVISA, 2011).

O LabRep realiza as seguintes técnicas: ICSI, FIV , IIU e coito programado. Os procedimentos seguem protocolos rígidos pré estabelecidos para todas as estapas do processo conforme Anexo 1.

3.2 PERÍODO DO ESTUDO

O estudo ocorreu entre janeiro de 2013 a dezembro de 2014 em duas etapas:

A coleta de dados aconteceu entre janeiro de 2013 a dezembro de 2013 no laboratório convencional (época em que o LabRep funcionava nas antigas instalações) e de janeiro a dezembro de 2014 no laboratório ISO 5/7 (época em que o LabRep fez as adequações estruturais e passou a ser classificado como ISO 5/7).

No primeiro momento, o laboratório estava localizado na antiga instalação, onde não possuíam condições ambientais controladas de temperatura, umidade do ar, vazão mínima do ar, filtragem mínima com filtros de carvão ativados, utilizando para esse fim somente câmaras de fluxo laminar; sendo classificado como laboratório convencional. O segundo momento, o laboratório estava localizado nas novas instalações, atendendo as exigências da RDC nº 23 do ano de 2011, sendo classificado com ISO 5/7.

3.3 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da UFG (CEP/HC- UFG), parecer 768.619 (Anexo 2). Toda a pesquisa cumpriu com as determinações da Resolução 466/2012 e suas normas complementares, resguardando o sigilo quanto a informações pessoais das pacientes evitando danos às dimensões físicas, psíquica, moral, intelectual, social, cultural e/ou espiritual das mesmas.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

O grupo estudado foi formado por 278 mulheres, sendo 87 no

laboratório convencional e 191 no laboratório ISO 5/7, que procuraram o LabRep entre janeiro de 2013 e dezembro de 2014, para tratamento de infertilidade e que realizaram uma das seguintes técnicas: ICSI, FIV ou IIU.

3.5 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo do tipo caso controle, que avaliou informações de pacientes inseridos no banco de dados de mulheres atendidas no Serviço de Reprodução Humana do LabRep/HC/UFG (Sisfert - Sistema de Fertilização Assistida HC/UFG), Goiânia,Goiás, Brasil.

Foi avaliado de forma descritiva a contaminação de placas de cultura de embriões, logo após a retirada dos embriões para transferência.

3.6 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

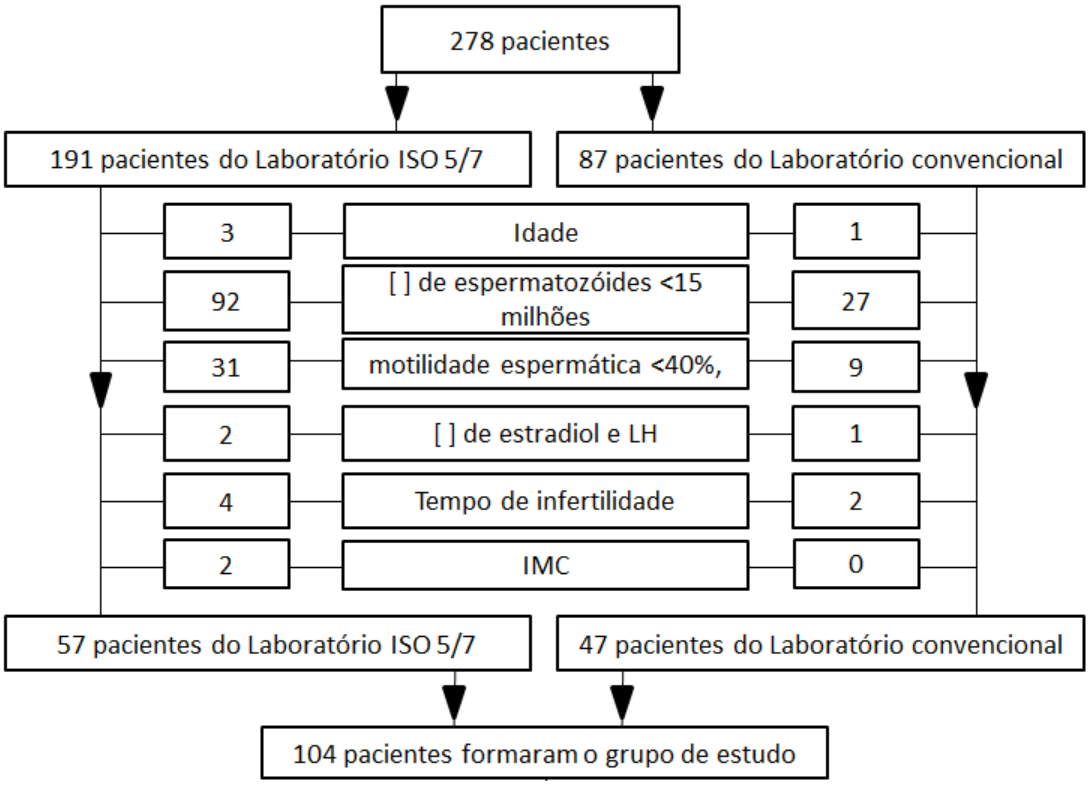
Foram incluídos na parte preliminar da pesquisa todas as pacientes que se submeteram a procedimento de reprodução assistida no LabRep que tivessem o resultado do β-hCG.

Na primeira parte do trabalho, foram realizados pareamentos das variáveis confundidoras dos dados das paciente dos dois laboratórios. Foram excluídos da análise do laboratório ISO 5/7, 33 casos que o parceiro possuía quantidade de espermatozoides pós-capacitados com concentração inferior a 15 milhões, 10 casos que o parceiro possuía espermatozoides com motilidade inferior a 40%, 14 casos com contaminação espermática, 50 casos com infecção materna, 15 casos por alteração na concentração de estradiol, FSH, Prolactina ou LH, e 12 casos com alteração no IMC, tempo infertilidade ou idade, restando 57 ciclos das 191 selecionadas.

Do laboratório convencional, foram excluídos da análise sete casos que os parceiros possuíam quantidade de espermatozoides pós-capacitados com concentração inferior a 15 milhões, dois casos que os parceiros possuíam espermatozoides com motilidade inferior a 40%, três casos com contaminação espermática, 27 casos com infecção materna, quatro casos por alteração muito discrepantes do normal (hiper ou hipo) na concentração de estradiol, FSH, Prolactina e LH, e quatro casos com alteração no IMC

(obesidade mórbida), tempo infertilidade ou idade (mais de 15 anos), restando 47 ciclos dos 87 selecionados, conforme Figura 1.

Figura 1: Organograma da seleção das mulheres atendidas no laboratório de reprodução humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás nos anos de 2013 e 2014.



O pareamento por quantidade de espermatozoides com ponto de corte de 15 milhões e a quantidade total de espermatozoides acima de 39 milhões e quanto à motilidade total, pelo menos a metade dos espermatozoides devem possuir uma progressão linear, com motilidade acima de 40%; foi feito em alinhamento com recomendação da Organização Mundial de Saúde em 2010 (WHO, 2010).

Na segunda parte do trabalho foram excluídos todos os ciclos onde as pacientes não finalizaram o tratamento ou os resultados de gravidez não estavam preenchidos.

3.7 VARIÁVEIS ESTUDADAS

3.7.1 Sisfert (Banco de dados do LabRep/HC/UFG)

Os dados das pacientes que receberam tratamento durante o período da pesquisa foram analisados e transcritos para uma ficha padronizada (Anexo 3). Os dados pesquisados foram: IMC; duração da infertilidade; abortos; sorologias pesquisadas nas mulheres (clamídia, citomegalovírus e HPV); taxa basal do FSH; taxa basal do LH; taxa basal de estradiol; taxa basal de prolactina; doenças associadas a infertilidade; espermograma; alguns tipos de procedimentos realizados no laboratório (IIU, FIV, ICSI); número de folículos aspirados; número de oócitos injetados; clivagem embrionária; número de embriões classificados e transferidos. Foram pesquisados dados dos prontuários eletrônicos do banco de dados Sisfert 2.0 (APROBATO, 2013).

Avaliação da qualidade espermática; cultura microbiológica do espermograma; cultura microbiológica pós cultivo de embriões.

3.7.2 Variável estudadas

Na primeira parte do trabalho, as variáveis analisadas foram:

- Formação de embrião: sim ou não,
- Qualidadade embrionária: A, B, C ou D,
- Sucesso da gravidez: sim (βhcg+) ou não (βhcg-).
- Contaminação das placas de cultivo de embriões após o uso.

Na segunda parte do trabalho foram:

- Fatores Femininos:
  - Tamanho dos folículos,
  - Quantidade de oócitos aspirados, captados e injetados,
  - Agentes infecciosos,
  - Duração da infertilidade, idade, IMC, espessura do endométrio e concentração dos hormônios estradiol, FSH e LH.
- Fatores Masculinos:
  - Contaminação espermática,
  - Qualidade espermática.

3.8 DEFINIÇÃO DAS VARIÁVEIS DO ESTUDO

Formação de embrião: Após a inseminação em placas pela ICSI ou FIV, foi observado a presença de embrião para ser determinado o sucesso da fertilização.

Qualidadade embrionária: Para a classificação dos embriões, seguiu-se o método de DEPA-MARTYNOW; JEDRZEJCZAK; PAWELCZYK (2007), onde os embriões foram classificados de acordo com sua fragmentação em: [A (embriões sem fragmentação e simétricos), B (embriões assimétricos com até 25% de fragmentação), C (embriões apresentando entre 25 a 50% de fragmentação) e D (embriões com 50% ou mais de fragmentação)]. Quanto pior a morfologia, menores as chances de implantação e gravidez. Os oócitos corretamente fertilizados são transferidos individualmente para gotas com óleo mineral, de 0.025ml de meio de clivagem. Como critério utilizado para avaliar a qualidade embrionária, são considerados os seguintes parâmetros: presença de fragmentos citoplasmáticos anucleados e o tamanho relativo dos blastômeros.

Sucesso da gravidez: Em relação ao sucesso do tratamento das mulheres foi analisado a concentração do hormônio βhCG na corrente sanguínea. Foi considerado como gravidez positiva os exames com concentração de βhCG igual ou superiores a 5 mIU/ml.

Tamanho dos folículos: Os oócitos foram classificados quanto ao tamanho em menores que 16mm, de 16 a 25mm e maiores que 25mm.

Quantidade de oócitos aspirados, captados e injetados: Foram avaliados a quantidade absoluta de oócitos aspirados, captados e injetados.

Sorologias: Foram avaliadas as sorologias para clamídia, Citomegalovírus (CMV) e HPV. Foram considerados resultados positivos aqueles que constavam em seus resultados: reagente para os anticorpos IgG ou IgM.

Duração da infertilidade: Foram divididas em 3 períodos: 0-3 anos; 4-8 anos e maiores de 9 anos.

Idade: Esta foi avaliada em anos e estratificada em quatro grupos: menores que 30 anos, de 31 a 35 anos, 36 a 40 anos e maiores de 40 anos.

Índice de Massa Corporal (IMC): Seguiu-se os valores propostos por Must e colaboradores, onde as pacientes foram divididas em quatro estratos: pacientes magras (IMC<20 kg/m2), peso corporal adequado; (IMC entre 20 e 24,9 kg/m2), sobrepeso (IMC entre 25 e 29,9 kg/m2) e obesas (IMC>30 kg/m2) (MUST; DALLAL; DIETZ,1991).

Concentração dos hormônios: Esta foi realizada durante a fase folicular do ciclo menstrual. As mulheres foram divididas em dois grupos, as que possuíam suas dosagens hormonais dentro da normalidade e as que possuíam suas dosagens alteradas.

Espessura endometrial: as mulheres foram classificadas em três grupos: mulheres com espessura endometrial menor que 10mm, entre 10 a 15mm e as que possuíam a espessura endometrial acima de 15mm.

Espermocultura: Presença ou ausência de contaminação. Segundo a RDC nº 33 de 17/02/2006 deve-se realizar uma coleta seminal como triagem microbiológica para detectar se existe contaminação de *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Neisseria gonorrhoeae* e bactérias aeróbias. As amostras de sêmen ideais devem possuir resultados negativos para estes microorganismos (ANVISA, 2006; WHO, 2010).

Qualidade espermática: Os espermogramas foram avaliados quanto às características morfológicas, quantidade e movimentação dos espermatozoides. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o sêmen para ter os parâmetros dentro da normalidade (normozoospermia) deve possuir: a concentração de espermatozóides acima de 15 milhões por ml; a quantidade total de espermatozoides acima de 39 milhões e quanto à motilidade total, pelo menos a metade dos espermatozoides deve possuir uma progressão linear, com motilidade acima de 40%; hipospermia (volume de sêmen ejaculado inferior a 1.5 mililitros); astenozoospermia (redução ou ausência da mobilidade dos espermatozoides); teratozoospermia (menos de 4% de espermatozoides com morfologia normal); azoospermia (ausência de espermatozoides no sêmen.) e necrozoospermia (ejaculado com pelo menos 75% dos espermatozoides mortos) (WHO, 2010).

Contaminação das placas de cultivo de embriões após o uso: Foi avaliado a existência da contaminação das placas pós cultivo de

embriões. Foi analisada a contaminação microbiológica de placas onde os embriões foram cultivados. Na FIV e ICSI, os embriões são formados e cultivados fora do corpo da mãe, em placas de cultivo, os meios de cultura oferecem os nutrientes necessários para o desenvolvimento dos embriões. Estas placas servem como estratégia para verificar se houve contaminação microbiológica, que pode interferir diretamente no sucesso da técnica. Os possíveis resultados encontrados foram: presença ou ausência de contaminação.

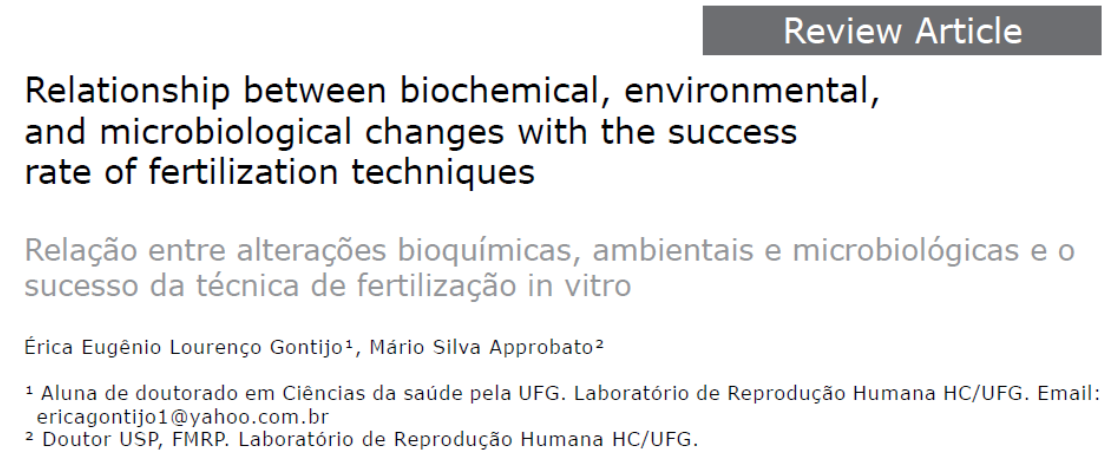
3.9 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram avaliados no programa Epi-Info 3.3.2®. Foram montadas tabelas de contingência e gráficos, para determinação da associação entre variáveis. Posteriormente, foram comparados os dados das pacientes do Laboratório convencional e do Laboratório ISO 5/ 7 por qui-quadrado . Foi adotado o nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

Artigo 1 - Relationship between biochemical, environmental, and microbiological changes with the success rate of fertilization techniques

Publicado na revista JBRA Assisted Reproduction, Volume 17, n. 6 Novembro-Dezembro de 2013.



Review Article

Relationship between biochemical, environmental, and microbiological changes with the success rate of fertilization techniques

Relação entre alterações bioquímicas, ambientais e microbiológicas e o sucesso da técnica de fertilização in vitro

Érica Eugênio Lourenço Gontijo[1], Mário Silva Approbato[2]

[1] Aluna de doutorado em Ciências da saúde pela UFG. Laboratório de Reprodução Humana HC/UFG. Email: ericagontijo1@yahoo.com.br
[2] Doutor USP, FMRP. Laboratório de Reprodução Humana HC/UFG.

Manuscrito 1 - Comparing fertilization and reproduction success in a iso 5/7 and in a conventional laboratory

Artigo submetido a revista de Saúde Pública (Anexo 7)

Manuscrito 2 - Fatores relacionados ao sucesso da fertilização assistida em pacientes atendidos em um laboratório iso 5/7 e um laboratório convencional.

A ser submetido à Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia- RBGO

4.1 Artigo 1

RELATIONSHIP BETWEEN BIOCHEMICAL, ENVIRONMENTAL, AND MICROBIOLOGICAL CHANGES WITH THE SUCCESS RATE OF FERTILIZATION TECHNIQUES

RELAÇÃO ENTRE ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS, AMBIENTAIS E MICROBIOLÓGICAS E O SUCESSO DA TÉCNICA DE FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*

Érica Eugênio Lourenço Gontijo[1], Mário Silva Approbato[2]

[1] Aluna de doutorado em Ciências da saúde pela UFG. Laboratório de Reprodução Humana HC/UFG. Email: ericagontijo1@yahoo.com.br

[2] Doutor USP, FMRP. Laboratório de Reprodução Humana HC/UFG.

ABSTRACT

The success ratefor the evaluationof the resultsof techniques of Assisted Human Reproduction implies theoccurrence of pregnancy with a live, healthy child. There are reports of the association between chemical and unhealthy environmental air conditions (bacteria, dust, particulates and volatile compounds) and reducing the success rate of embryo production and the occurrence of pregnancy. This paper reviews available information about the interference of biochemical, environmental and microbiological changes with the success of the assisted reproductive technique.

Keywords**:** Assisted Human Reproduction, Environmental conditions, In Vitro Fertilization and environmental contamination, Clean Room *In Vitro* Fertilization.

RESUMO

A taxa de sucesso para a avaliação dos resultados das técnicas de Reprodução Humana Assistida implica na ocorrência de gravidez com nascimento de uma criança viva e saudável. Existem relatos da associação entre condições químicas e ambientais insalubres do ar (por exemplo, bactérias, poeira, materiais particulados e compostos voláteis) e a redução da taxa de sucesso na produção de embriões e na ocorrência de gravidez.

Este artigo pretende revisar informações disponíveis sobre a interferência das alterações bioquímicas, ambientais e microbiológicas com o sucesso da técnica de fertilização assistida.

Palavras-chave: Reprodução Humana Assistida, Condições ambientais, contaminação ambiental, Sala limpa e Fertilização *in Vitro*.

INTRODUCTION

The Assisted Human Reproduction (AHR) is basically a human intervention in the natural process of procreation, with the aim of enabling women with problems of infertility and sterility to satisfy the desire to achieve motherhood (Esteves, 2013).

The success rate for the evaluation of the results of the techniques of RHA implies the occurrence of pregnancy with a live, healthy child (Tonguc et al., 2010). Some researchers observed a decrease in the production of embryos and consequently reduction in pregnancy success when their production/manipulation occurs in places with unhealthy chemical and environmental conditions. With the introduction of the concept of clean room that reality has changed. However, few studies have reported the correlation between the levels of toxic (bacteria, dust, particulates and volatile compounds) and a decrease in the development of embryos (Esteves, 2013; Boone et al., 1994).

Gametes and human embryos cultured in vitro are extremely sensitive tofluctu ations in temperature, humidity, light exposure, contaminants and physical trauma. Several studies suggest that toxic agents, bacteria, particles, dust and chemicals (VOCs), can affect the fertilization and embryo development (Esteves, 2013;RDC23, 2011; Martinez-Hurtado et al.,2010; International Organization for Standardization, 2009; Berneteix, 1998; Nolard, 1994).

Lacerda (2000) reports that this mechanism, together with the accumulation of 90% of recycled air, causes an increase in the number of microorganisms in order 1000-100000 times higher compared to the external environment. An

increase of 1g/m³ respirable particles cause an increase in respiratory diseases in 3%, impaired lung function, leading to mortality (Esteves, 2013).
This review aims to condense information available about the interference of biochemical, environmental and microbiological changes in the success of the assisted reproductive technique.

AIR QUALITY IN AIR-CONDITIONED ENVIRONMENTS AND ITS INFLUENCE ON THE OCCURRENCE OF INFECTIONS

Biological contaminants and bio aerosols such as fungi, bacteria, algae, mites, amoebae use particulate matter (pollen, insect fragments, flakes of human skin and hair) as substrate, where they multiply, doubling the population every 20 seconds, there for edepending on the cell parasitism for playback. Outbreaks may be associated with contamination of the se aerosols (Hurtado-Martinez *et al*., 2010).
In Brazil, hospital areas are separated considering the proposal by Spaulding (Brazil, 1985) who considered the potential risk for the occurrence of infection, grouping them into classification: non-critical areas, which are not occupied by patients, such as offices and ware houses, semi-critical areas occupied by those patients who do not require intensivecare or isolation, such as ward sand outpatient clinics; critical areas, those that off er potential risk for infection, or invasive procedures are the presence of immunocompromised patientsor by occupational risk related to the handling of infectious substances.
For the American Society for Testing and Materials (2009), sources of particles capable of carrying microorganisms causing contamination are classified into internal and external. Among the internal sources include people, fans, air conditioners, humidifiers and nebulizers, floors and potted plants and certain types of food. Regarding for eigns ources are the soil, water, decaying matter, dust from construction and remodeling.
In indoor air, microbiological contamination can be a serious problem, and a number of factors allow the growth and release of the sebiological agents in the air. High humidity, poor ventilation, ventilation and air conditioning that

have water or condensation in some parts (cooling towers) facilitate the grow thand distribution of microorganisms.

Among these factors, the high relative humidity is one of the most important, because it allows the increase of populations of mites and mold growth on damp surfaces. A study by Esteves (2013), describes the prevalent microorganisms in air-conditioned indoors, it stands between these bacteria: *Legionella pneumophila*, *Bacillus*sp, *Flavobacterium*sp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Actinomyces* sp. Fungi: *Paracoccidioides* sp, *Penicillium* sp, *Cladosporium* sp. And *Fusarium* sp and the influenza virus and respiratory syncytial virus. Eickhoff, (1994), cites *Legionella* sp, *Clostridium* sp, *Nocardia*sp relate to the transmission of infection caused by air conditioning. As to fungal contamination, *Aspergillus*sp is the most important (Nolard, 1994; Berneteix, 1998). The sources of contamination by spores of *Aspergillus* sp are potted plants, paper packaging, construction and renovation, and certain foods such as flour, bread, dried chili powder, lyophilized powders and raw food in the form of tubers.

CONTAMINATION OF AIR AND THE MICROBIAL CULTURES OF EMBRYOS INASSISTED REPRODUCTION LABORATORY

There are reports of the association between chemical and unhealthy environmental air conditions (bacteria, dust, particulates and volatile compounds) and reducing the success rate of embryo production and the occurrence of pregnancy (Martinez-Hurtadoetal., 2010, RDC 23, 2011, International Organization for Standardization, 2005).

In 1994, William R.Boone detected during the expansion of his assisted reproduction laboratory Hospitalin Greenville, South Carolina in the United States, tha tthe reformin creased the detect ableodors in the laboratory. Increased levelsofdust and otherparticles associated with the installation of the equipment have been observed, as well as odors from paint and gluetiles. Simultaneous lythe clinical pregnancy rate reduced and the success of in vitro fertilization procedures decreased from35% (25 of 71) in

1993to 16% (11 of 68). Thus, it demonstrated that the air quality affects embryo development in assisted reproduction clinics. The improvement of air quality and reduction of odors promoted agradual increase in the pregnancy ratein the following years. Pregnancy rates increased slightly in 1995 (20%) after the installation of the clean roomand then dramatically in 1996 and 1997(32% and 59%) respectively.

While microbial contamination of embryo culture plates occurs occasionally even with the use of media containing penicillin and streptomycin, a growing number of infections recently has been observedin human reproduction laboratories.

Peter *et al*., (2007), for a period of 8 years (January 1997 to December 2004), noted that in 13,977 IVF cycles, microbial contamination was observed in 95 (0.68%) of the culture plates by microorganisms. All infections were confirmed by microbiological investigations. Relevant details of both cycles of fertility treatment and microbial strains isolated and identified were investigated. The main identified microorganisms were Escherichia coli (n = 56, 58.9%) and Candida species (n = 24, 25.3%). Strains of E. coli isolated, 41 (73.2%) were resistant to both antibiotics used in the culture and 13 (23.2%) were resistant to penicillin or streptomycin. In all bacterial strains the resistance was 61.4% for both and 30% of the antibiotics used.

ANVISA RESOLUTION ONI NTERNAL CONTROL OF AIRIN ASSISTED FERTILIZATION LABORATORIES

While the need for specific technical requirements relating to air quality on human reproduction laboratories has been widely debated, most researchers recognize the importance of a morerigorous management of laboratories and also minimum air quality standards should be implemented. To this, ANVISA published the RDC N^{o} 23 of 27 May 2011laying down clear and strict standards to control the internal environment of the assisted reproductive laboratory.

In summary, all IVF laboratories should have an HVAC system that maintains positive air pressure relative to the surrounding environments, conditions of temperature control between 23º Cto 27ºC, relative humidity 40% to 70%,

flowmin imum total of 45 air(m^3/h)/m^2, minimum outside airflow rate of 15(m^3/h)/m^2 and minimum air supply with filtering inG3+F8+activated charcoalfilters. The environment cannot possess anyhidrosanitary installation, suchas sinks, drains orsinks. Handling of samples should beper for medina clean area classified at least as an ISO Class 5 (RDC23, 2011).

It is believed that the implementation of strict control of air quality, as required by RDC 23 is likely to have a negligible impacton the risks of contamination of the culture of embryos, however the results should beanalyzed only in the near future in Brazilian laboratories.

CONCLUSION

In a general manner, this shows the influence of chemical and environ mentalun sanitary conditions with the reduced embryo production and consequently reduction of success ful pregnancy. With clean air and reduction of odors, there is a gradually increased rate of pregnancy. There is the need to expand the knowledge about the changes caused by environmental and atmospheric factor swith in the physical premises where manipulation of gametes and embryos occurs. It is believed that control of the air, temperature, humidity, contamination of culture media and air flow are key factors for standardization of assisted reproduction procedures and results.

In Brazil there is little information about the influence of the environment on the success of assisted reproduction techniques, therefore, the formation of data bases that contribute to the up dated information about the success of IVF, can contribute to more efficient management that will subsidize more efficient strategies to control contaminant sin handling human embryos environments current lyunder the responsibility of ANVISA, improving the quality of assisted reproductive techniques in Brazil.

REFERENCES

American Society for Testing and Materials, 2009. Test Method D3467-99: Standard Test Method for Carbon tetrachloride activity of activated carbon

(ASTM D3467-04). Available from:

<http://www.astm.org/Standards/D3467.htm/> (accessed 08/08/13).

ANVISA. Brazilian National Agency for Sanitary Surveillance, 2006. Resolution RDC no. 33 of the Board of the National Health Surveillance Agency (amended by RDC23 of 27 May 2011 on setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells). Available from: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/ res 0023_27_05_2011.html/> (accessed 11/14/13).

Berneteix MT. Un combat dans lair du temps la lute contre Aspergillus. Rev. Infirm. 1998, 44:12-18.

Boone WR, Johnson JE, Locke AJ, Crane MM, Price TM. Control of air quality in an assisted reproductive technology laboratory.Fertility and Sterility. 1994,71:1-12.

Brazil. Ministry of Health Coordination Control of Hospital Infection. Manual of Infection Control.Brasilia, 1985.

Eickhoff TC. Airborne Nosocomial Infection: a contemporary perspective. Hospital Infection Control and Epidemiology. 1994; 15(10):663-672.

Esteves SC, FC Benedict.Implementation of air quality control in reproductive laboratories in full compliance with the Brazilian Cells and Tissue germinative Directive.Reproductive BioMedicine Online. 2013;26:9-21.

International Organization for Standardization. NBR ISO 14644-3 on cleanrooms and associated controlled environments-Part 3: Test methods. Brazilian Association of Technical Standards (ABNT), Brasilia, DF, Brazil, 2009.

Lacerda RA. Surgical Center. In: Fernandes ATF. Hospital infection and its interfaces in healthcare. Sao Paulo: Atheneu, 2000:1307-22

Martinez-Hurtado JL, Davidson CAB, Blyth J, Lowe CR. Holographic detection of hydrocarbon gases and other volatile organic compounds. Langmuir: 2010; 26:15694-99.

Nolard N. Les liens between les risquesasdpergillose et la contamination the environnement. Pathol.Biol. 1994;7(42):706-10.

Peter M, Kastrop M, Lia AM, Dagmar R, Gutknecht M. Microbial contamination of embryo cultures in an ART laboratory: sources and management. Hum Reprod. 2007;22(8):2243-8.

Tonguc And Var T, Onalan G, Altinbas S, Tokamak A, Karakas N, Gulerman C. Comparison of the effectiveness of single versus double intrauterine insemination with three different timing regimens. FertilityandSterility, American Society for Reproductive Medicine. 2010; 94:3-9

4.2 Manuscrito 2

COMPARING FERTILIZATION AND REPRODUCTION SUCCESS IN A ISO 5/7 AND IN A CONVENTIONAL LABORATORY

ABSTRACT

OBJECTIVE: To evaluate the tax of embryo's development, embryo quality, chemical pregnancy and microbiological evaluation of the means of embryos' cultivation from patients attended at the Human Reproduction Laboratory of the conventional laboratory and after the adjustment of RDC n° 23 de 2011, when it started to be classified as ISO 5/7 laboratory in 2013 and 2014.

METHODOLOGY: This control case study was developed at the LabRep/HC/UFG, located in Goiânia, Goiás, Brazil. It uses indirect observation as research technique in order to analyze the records of women attended at the laboratory. From the total of women researched, 87 of them were from the conventional laboratory and 191 were from the ISO 5/7 laboratory. The variables analyzed were: embryo's development, βhCG result, embryo quality and the assessed microbiological contamination of the means of embryos' cultivation. The data was inserted in the Epi-Info 33.2 program and it was analyzed in Bioestat 2.3. The groups were compared by odds ratio (OR) and chi-square with p<5%.

RESULTS: In ISO 5/7 laboratory, there was 74.1% of success in the embryo's development while in the conventional laboratory, there was 67.8% (OR: 1,30; IC: 0,47-3,61; χ^2: 0,24; p: 0.81). Moreover, in ISO 5/7 laboratory, 96.6% of the generated embryos were A or B, whereas 90.4% in the conventional laboratory (OR: 0,8906; IC: 0,27-2,89; χ^2: 0,037; p: 0,85). The pregnancy success in ISO 5/7

laboratory was 22.8% and 36.2% in the conventional laboratory (OR: 1,92; IC: 0,81-4,52; χ^2: 2,24; p: 0,13).

CONCLUSION: There was not a statistic difference between both laboratories.

Key-words: laboratory quality in FIV, ISO 5/7, embryo quality, infertility, human reproduction.

COMPARAÇÃO DO SUCESSO NA FERTILIZAÇÃO E REPRODUÇÃO EM UM LABORATÓRIO ISO 5/7 E UM LABORATÓRIO CONVENCIONAL

RESUMO

OBJETIVO: Avaliar a taxa de formação embrionária, qualidade embrionária, gravidez química e contaminação microbiológica dos meios de cultivo de embriões dos pacientes atendidos no Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás antes (quando era classificado como laboratório convencional) e após a readequação da RDC n° 23 de 2011, quando passou a ser classificado com laboratório ISO 5/7 nos anos de 2013 e 2014.

METODOLOGIA: Este é um estudo do tipo caso de caso control,e foi desenvolvido no LabRep / HC / UFG , localizado em Goiânia, Goiás , Brasil.Foram pesquisados dados de 87 mulheres atendidas no laboratório convencional e 191 no laboratório ISO 5/7. As variáveis analisadas foram: formação de embrião, resultado do βhCG , qualidade embrionária e a contaminação microbiológica dos meios de cultivo de embriões. Os dados foram inseridos no programa Epi-Info 3.3.2. ® e analisados no Bioestat 5.3®. Os grupos foram comparados por odds ratio (OR) e por qui-quadrado com p<5%.

RESULTADOS: No laboratório ISO 5/7, houve 74,1% de sucesso na formação de

embriões e no convencional 67,8% (OR: 1,30; IC: 0,47-3,61; χ^2: 0,24; p: 0,81). No laboratório ISO 5/7, 96.6% dos embriões gerados eram A ou B, já no laboratório convencional 90,4% (OR: 0,8906; IC: 0,27-2,89; χ^2: 0,037; p: 0,85). O sucesso de gravidez no laboratório ISO 5/7 foi de 22,8% e no laboratório convencional de 36,2% (OR: 1,92; IC: 0,81-4,52; χ^2: 2,24; p: 0,13). CONCLUSÃO: Não houve diferença estatística entre os dois laboratórios.

Unitermos: infertilidade, embriões humanos, fertilização, reprodução humana, qualidade laboratorial em FIV, ISO 5/7, qualidade embrionária.

INTRODUCTION

Infertility means not being able to procreate (1). Assisted Human Reproduction (AHR) consists in a group of treatment techniques used to enable reproduction in people who are infertile or sterile (2). Infertility has grown each year. Nowadays, 13-18% of couples have faced difficulties in getting pregnant (3).

There are reports of an association between unsanitary chemical and environmental air conditions (e.g. , bacteria, dust , particulate matter and volatile compounds) and reducing the rate of success in producing embryos and the occurrence of pregnancy (4,16,20)

AHP uses a set of low and high complexity techniques. Intrauterine insemination (IUI) is considered a low complexity technique, while extracorporeal fertilization methods are considered high complexity techniques. This includes classic *in vitro* fertilization (IVF) and *in vitro* fertilization through intracytoplasmic sperm injection (ICSI) (4–7).

In the last decades, worldwide, women have tended to postpone motherhood, which can be proved by the decrease in the number of pregnancies in women under 40 years old and the increase of this number among women over 40 years old (8)

In Brazil, there are 106 Human Reproduction labs. From those, nine are located in public institutions and ninety-seven are exclusively private. From the public institutions, six offer the entire treatment free. Other three labs offer free services, however they charge the medication used by the couple (9).

In the country, until 2006, there was not a legislation that regulated AHP. The human reproduction techniques were regulated by the ethic norms established by the Federal Council of Medicine. It resulted in an exponential increase in multiple pregnancies in Brazil, which is considered a public health issue because of the risks caused to the mothers, the children as well as because of the high costs to the public health system (10).

On February 17th, 2006 it was approved the resolution called RDC n. 33. In 4th chapter regulates the minimum infrastructure as well as the environments and equipment characteristics required in Germinal Cells and Tissues Banks (GCTB). Later, this resolution was updated by RDC n. 23 on May 27th, 2011. It was also created the National System of Embryo Production (SisEmbrio®) that publishes, periodically, information related to embryo production, maintenance, and use in Brazil in order to promote the development of GCTBs' quality indicators (9).

The Human Reproduction Lab at the Federal University of Goiás School Hospital (LabRep/HC/UFG) in Goiânia, created in 1998, changed its facilities in December, 2013 and went through a readaptation process, changing from a conventional to an ISO 5/7 laboratory.

The ISO 5/7 lab has a climatization system that keeps positive pressure in adjacent environments; temperature control conditions between 23°C to 27°C; relative air humidity between 40% and 70%; total air minimum flow on 45 $(m^3/h)/m^2$); exterior air minimum flow on 15 $(m^3/h)m^2$ and minimum filtering in filters insufflated with G3 (coarse filter) and F8 filters (fine filters capable of trapping particles of 0.4 μm) (4,11,12).

Regarding the living embryos manipulation room, classified as ISO Class 5, it has a biological security cabinet Class 2, Type A and an unidirectional flow module (7,9,13).

This paper aims to compare fertilization success and embryo culture plate contamination between patients treated at an ISO 5/7 lab and at a conventional lab in 2013 and 2014.

METHODOLOGY

This control case study was developed at the LabRep/HC/UFG, located in

Goiânia, Goiás, Brazil. It uses indirect observation as research technique in order to analyze the records of women attended at the laboratory.

It descriptively evaluates embryo culture plates contamination after they were transferred, based on the possibilities of those being disposed.

The study was submitted to the Federal University of Goiás School Hospital's (HC/UFG) Research Ethics Committee. It was approved under the protocol number 768619.

It was used information from the records of 87 women attended at the conventional laboratory in 2013 and 191 women attended at the ISO 5/7 laboratory in 2014. Together, the research used information of 278 women.

The study was developed between January 2013 and December 2014 and it was divided in two stages:

The data collection was done from January to December 2013 at the conventional lab (period that the LabRep developed its functions in the old facilities) and from January to December 2014 at the ISO 5/7 lab (period that the LabRep made structural adjustments).

In the first stage, although the lab was already working with laminar flow hood, it still did not have controlled temperature conditions as well as air humidity, minimum airflow and minimum filtration with activated carbon filters control. In the second phase, the lab was already located in its new facilities and it met the 2011 RDC 23 requirements, which enabled it to be classified as ISO 5/7.

The samples were classified according to age, body mass index, estradiol concentration, stimulating follicle hormone, prolactin, luteinizing hormone, sperm concentrations above 15 million per ml, the total sperm motility ≥40, infertility time, maternal infection and sperm contamination .

The classification through sperm concentration above 15 million per ml as well as through the total sperm number above 39 million and according to its total motility, at least half of the sperms need to show linear progression, with a motility level above 40%. This index was chosen according to the 2010 World Health Organization recommendation (1).

The analyses excluded 33 cases from the ISO 5/7 lab because their sperm concentration was under 15 million; 10 cases that presented motility under 40%; 14 cases that the sperm was contaminated; 50 cases that presented maternal infection; 15 cases that showed anormalities in their estradiol, FSH, prolactin and LH

concentration level; and 12 cases with age changes, BMI or infertility time. It was then, left 57 human fertilization treatment cycles to be analyzed.

From the conventional lab, the analysis excluded seven cases that the after-trained sperm concentration was under 15 million; two cases that presented motility under 40%; three cases that the sperm was contaminated; 27 cases that showed maternal infection; four cases that had variations in their estradiol, FSH, prolactin and LH concentration level; and four cases with age changes, BMI or infertility time. It was used 47 human fertilization treatment cycles.

The variables analyzed were: procedure type performed; the number of formed embryos; successful pregnancy by types of classified embryos; embryo formation; βHCG result (pregnancy result) and embryo quality.

It was developed an evaluation of the plates' contamination after embryo collection. It was analyzed 55 plates, in which the embryos were cultivated at the ISO 5/7 lab and the results were compared to the culture mediums' contamination at the conventional lab, done by a previous research conducted by Ribeiro, in 2010 (14). In IVF and ICSI, the embryos are formed and collected out of the mother's body, in culture plates. It is possible thanks to the advancement of collection tools, which offer the necessary nutrients to the embryos good development. Those collection plates represent the best place to collect and verify if there is imminent microbiological contamination because all the factors that may cause contamination converge to this cultivation plate, which directly interfere in pregnancy rates.

The embryos were cultivated in HTF (Human Tubal Fluid Irvine Scientific) culture medium or in an Embryo culture medium – Vitro Life (IVF). It was collected materials from 55 embryo plates in 2014, at LabRep according to their disposing availability after they were transferred and then, they were taken to the Ratio Parasite Host Studies Laboratory (LAERPH) at the Federal University of Goiás (UFG) Tropical Pathology and Public Health Institute, where it was investigated if there was contamination and, later it was identified the microorganisms in the samples.

In order to analyze if there was contamination, it was used the culture medium BHI (Brain Heart Infusion), which was prepared according to Kastrop (15). The culture medium was replicated in the BHI tubes with broth and incubated for 24 hours at 37 ° C in the LAERPH oven (16). The blurred samples would be sub-cultivated in Nutrient Agar (to verify fungi growth), in Sated Agar Manitol to verify Staphylococcus and Bacillus growth and in MacConkey Agar to verify Gram-

negative bacteria growth. The isolated samples would be identified through morph types' characterization (blue lactophenol – fungi and Gram stain – bacteria). For gram-positive organisms, it would be performed catalase and coagulase production tests. For gram-negative bacillus, it would be done bacterial metabolic identification biochemical tests (17).

The data was evaluated in the Epi-Info 3.3.2® e BioEstat 5.3® program. It was set up contingency tables and graphs in order to determine the association among the variables. Later, Conventional Lab and ISO 5/7 patients' data was compared through chi-square ($\chi 2$) test or Fisher's exact test. It was used a 5% significance level.

This research was limited sample size . It is expected that in a larger temporal analysis , the results could be more robust , reducing the sample bias.

RESULTS

It was selected 47 women attended at the Human Reproduction Conventional Lab in 2013 and 57 women attended at the Federal University of Goiás School Hospital Human Reproduction Lab new facilities (LABREP-HC-UFG) in 2014, what together corresponds to 104 women. The women reproductive characteristics sample are described on table 1.

Tabela1: Reproductive characteristics of women treated at ISO 5/7 laboratory and conventional laboratory Hospital of the Federal University of Goiás in the years 2013 and 2014 .

Characteristics		Conventional Laboratory (47 women)	ISO 5/7 Laboratory (57 women)	*p*
Age		34.034 (IC: 25.00 - 45.00)	34.921 (IC: 21.00 - 44.00)	0.81
BMI		24.628 (IC: 19.00 - 39.00)	23.885 (IC: 17.00 - 39.00)	0.76
Estradiol		49.593 (IC: 3.08 - 551.01)	51.212 (IC: 7.90 - 364.40)	0.09
LH		6.890 (IC: 0.80 - 434.00)	8.049 (IC: 0.80 - 334.00)	0.12
FSH		8.496 (IC: 3.66 - 82.30)	6.420 (IC: 3.10 - 20.47)	0.99
Prolactin		14.950 (IC: 4.48 - 48.80)	15.370 (IC: 4.30 - 30.94)	0.07
Infertility time	12-3 years	18 (38.29%)	23 (40.35%)	0.08
	4-8 years	19 (40.42%)	21 (36.84%)	0.23
	>9 years	10 (21.28%)	13 (22.81%)	0.34

IC: confidence interval; BMI: Body mass index; LH: Luteinizing Hormone; FSH: Follicle Stimulating Hormone .

The researched analyzed 104 complete cycles, 47 from the conventional lab in 2013 and 57 from the ISO 5/7 lab in 2014. From the 47 cycles that came from the conventional lab, 20 were evaluated through ICSI, 11 through FIV and 16 through IIU. From the 57 cycles that came from the ISO 5/7 lab, 24 were analyzed through ICSI, 17 through FIV and 16 through IIU.

In regard to the number of formed embryos, through the high complexity techniques ICSI and FIV, it was observed higher success at the ISO 5/7 lab, with 74,1% (30) in relationship to the conventional lab that presented 67.8% (21) of success (Figure 1).

OR 1.30 **IC** 0.47-3.61 χ^2 0.25 ***P*** 0.81

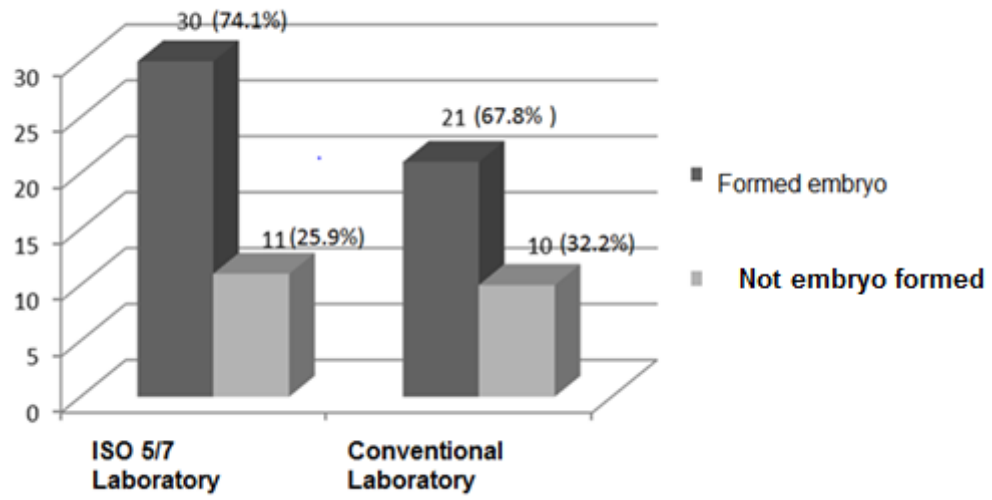


Figure 1 Comparison between embryo formation in a ISO 5/7 lab and a conventional lab in 2013 and 2014 in Goiânia, Goiás, Brazil.

For the classification of embryos , followed by the Depa-Martynów et al., (2007) (33), where embryos were classified according to their fragmentation : The A (embryos without fragmentation and symmetric), B (Asymmetric embryos with up to 25% fragmentation), C (embryos having from 25 to 50% fragmentation) and D (embryos with 50 % or more of fragmentation). The worse the morphology, the lower the chances of implantation and pregnancy. Properly fertilized oocytes are transferred individually to drop with mineral oil, 0.025ml medium cleavage. As a criterion used to assess embryo quality are considered the following parameters: presence of anucleated cytoplasmic fragments and the relative size of the blastomeres.

With reference to embryo quality, it was observed at the ISO 5/7 lab that 73.3% were classified as A, 23.3% as B and 3.3% as C and no embryo was classified as D. Meanwhile, at the conventional lab, 71.4% were classified as A, 19.0% as B, 4.8% classified as D (Figure 2).

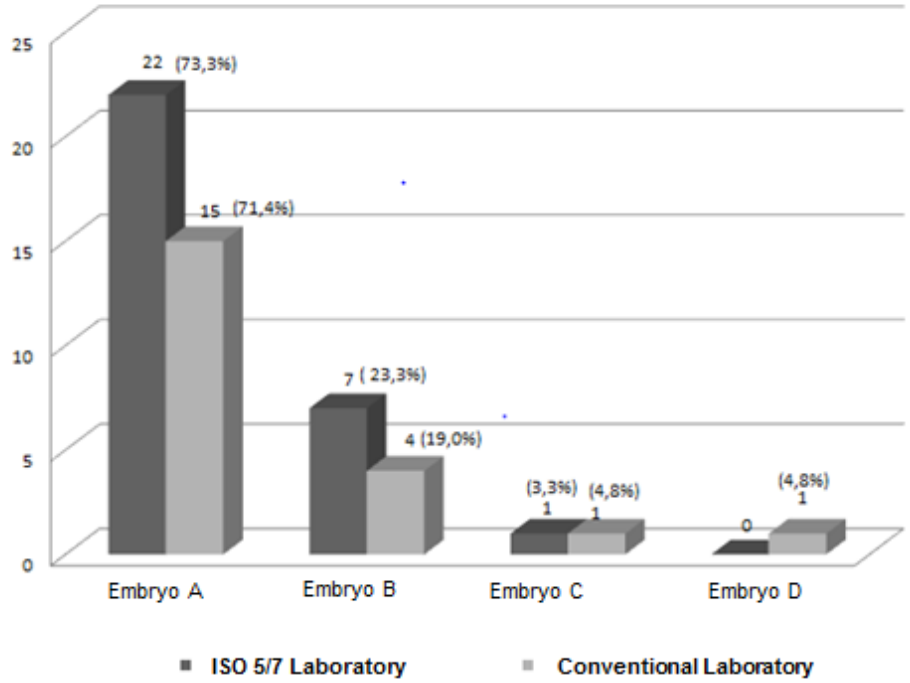


Figure 2 Patients distribution according to embryo frequency classes A, B, C and D at the ISO 5/7 Lab and at the conventional lab in 2013 and 2014, in Goiânia, Goiás, Brazil.

It was observed at the ISO 5/7 lab that 96,6% (73,3% A and 23,3% B) of the embryos generated were classified as A or B, which means, they were good. At the conventional lab, 90,4% (71,4% A and 19,0% B) were A or B (Figure 3).

OR 0,8906 **IC** 0,27-2,89 χ^2 0,037 ***P*** 0,85

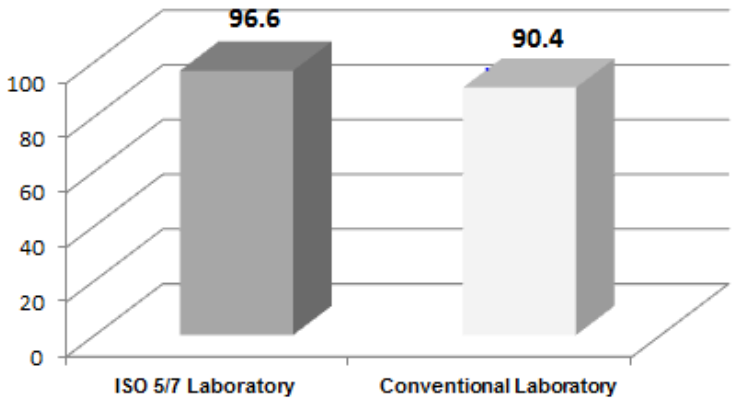


Figure 3 Patients distribution according to embryos A or B and C or D percentage between the ISO 5/7 and the conventional lab in 2013 and 2014, in Goiânia, Goiás, Brazil.

Comparing pregnancy success, it was detected that at the ISO 5/7 lab the pregnancy index was 22,8%. In the meantime, at the conventional lab it was 36.2% (Figure 4).

OR: 1,9197; IC: 0,81-4,52; p: 0,13; χ^2 2,24

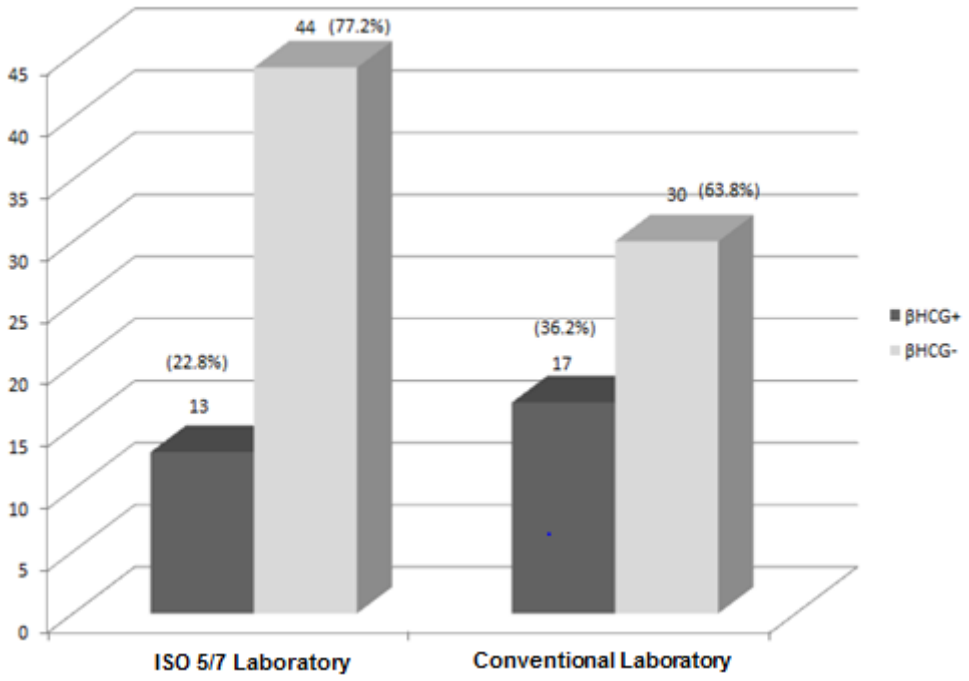


Figure 4 Comparison between pregnancy success at the ISO 5/7 laboratory and at the conventional lab in 2013 and 2014, Goiânia, Goiás, Brazil.

It was evaluated embryo culture medium microbiological contamination after the embryos were transferred into the women's uterus.

No sample showed microbiological contamination and, consequently, there was no interference in the human reproduction treatment results and success.

DISCUSSION

In AHR labs, quality control is very relevant in order to achieve a successful treatment. The correct execution of techniques directly influences the results. A high level of hygiene, cleaning and material disposal must be observed to prevent

embryos and culture plates' equipment infection. Fungicides should be added to the plates, in which the embryos are grown, as it increases microorganisms' resistance. Each step during the manipulation of gametes and embryos should be performed using precisely filed aseptic techniques.

In 2014, the ISO 5/7 lab achieved 74,1% of embryo formation. The conventional lab (data from 2013) achieved 67,8%, which is not considered a significant difference. On the other hand, in regard to embryo quality (embryos A or B), it was found 96,6% of those embryos at the ISO 5/7 lab, while the conventional lab presented 90,4%. The rates were inferior; however there weren´t significant statistic difference.

Khoudja and his colleagues evaluated the blastocyst production rate before and after the installation of a new air filtration system. He noticed that there was a significant increase of 38,1% to 51,1% in the blastocyst production rate after the new air filtration system was installed (18).

An observational study in 468 ICSI cycles compared embryo production in two labs. The first lab's facilities had a clean room with an air filtration system in the culture room. The second one had conventional facilities and its air filtration system was independent. The lab that had clean room achieved better results. It produced higher quality embryos when compared to the conventional lab (19).

Munch et al. (2015) developed an observational research and compared 524 FIV fresh cycles and 156 cryopreserved cycles in the same lab in two different periods of time. In the first period, the lab had a carbon filtration system and in the second one there wasn´t a filtration system (20). The embryo cleavage rates decreased when the filtration system was removed, but it increased when the system with carbon filtration was reintroduced.

A research conducted by Ziebe and his colleagues verified that embryo rates type A implemented were 28%, while type D was only 5% (21).

Giorgett et al. (1995) studied more than 900 FIV cycles. The results show a lower pregnancy rate when it was implanted a type D embryo, 4,5%. Staessen and his colleagues achieve only one pregnancy and transferred 68 embryos that were highly fragmented. In another publication, Shulman et al, did not achieve any pregnancy (22–24). Although embryos morphologically classified as D are able to start a pregnancy, some researchers believe that the fetus does not have high chances to be born. For example, Giorgetti et al. achieved only 3,8% of birth. Ebner and his

colleagues reported that children born with fetal malformation rate with embryos classified as C and D are respectively 13.3 and 36.4%. It can be possibly explained by the higher degree of apoptosis, chromosomal disorder 32 and regulatory proteins loss (22,24,25).

In Donadio and his colleagues' research it was found 42% of pregnancy with embryos morphologically classified as A, 38% of pregnancy with embryos type B, 24% of pregnancy with group C embryos and 11% of pregnancy in women that received embryos morphologically classified as D. Showing indices similar to those found in other studies, showing the tiny, but still present evolutionary capacity of these embryos, even with many fragmentations in their morphology (26).

In our research the results were similar to those found by Ziebe et al. (1997); Giorgett et al. (1995) and Donadio et al. (2005), in which were noticed higher success in production and embryo quality at the ISO 5/7 lab, where it was implemented a filtering system (21,26,27).

In regard to pregnancy success (βHCG+) in both labs, it was noticed that the difference between them is statistically insignificant. Nevertheless, the data is different that we previously expected because the new facilities completely meet the criteria established by the RDC n. 23 resolution, from May 27th, 2011. Because of that, we expected that the results were more promising when compared to the old facilities. This greatly surprising result requires a thorough investigation of all aspects, clinical, structural, medical, and infectious as well as the partner involved in the process (28).

A research developed during 12 months found no increase in documentary pregnancy rates after the implementation of a modern filtration system. According to the researchers, even with the filtering system, the air quality was still poor. In addition, the hot and humidweather in Cantão (China) could have influenced the filters saturation before the expected time, which prevented volatile organic compounds to be removed and decreased the installed air system effectiveness (29).

Cohen et al., (1997) observed that pregnancy rates in his lab decreased when one of his neighbors renovated his apartment. The neighbor replaced the floor using a large amount of adhesive, which produced a considerable volume of volatile organic compounds. It contaminated his laboratory and decreased pregnancy rates (30).

Boone et al. (1994) found a similar result. His assisted human reproduction lab at the Greenville Hospital, located in South Carolina, US, went through an expansion process. During the renovation, he noticed that it triggered the production of detectable odors in his lab. It was observed an increase in the levels of dust and other particles associated with equipment installation as well as odors from paint and glue tiles. Meanwhile, the clinical pregnancy rate decreased and the in vitro fertilization processes success decreased 35% (25 of 71) in 1993 and to 16% (11 of 68) in 1994. Thus, it was demonstrated, for the first time, that bad air quality might cause low embryo development (31). Once the air was cleaned and the odors reduced, they observed that, in the following years, the pregnancy rate increased. The rates gradually increased in 1995 (20%) after they installed a clean room and, later, it drastically grew in 1996 and 1997 (32% and 59% respectively) (32).

Microbiological contamination in embryo culture medium after cultivation and after it was transferred to women's uterus was also evaluated. The contamination exam that analyzed the existence of microorganisms was negative in all the samples, what shows that there was no interference between the results and the success of the human reproduction treatment.

Knowing about the possible risk of contamination either from the gametes or from the internal air, shows that it is necessary to track the microbiological contamination in the human reproduction laboratory in order to investigate the association between microbiological contamination and success in human reproduction (4).

At the old LabRep-HC-UFG facilities, Ribeiro (2010) developed a post embryonic incubation microbiological analysis in the embryo culture mediums and found 6 contaminated plates in 125 samples (4,8%). The microorganisms found were *Escherichia coli* (50%), *Klebsiella* sp (16,6%), *Pseudomonas* sp (16,6%), Levedura (16,6%). *Escherichia coli* was the bacteria with higher incidence, found in three of the samples. Resistant gram-negative rods were found, although the culture mediums show the use of antibiotics such as Penicillin G (IVF) or Gentamicin (HTF) (14).

The fact that the current lab's culture mediums were not contaminated shows that nowadays there is a more rigorous embryo manipulation and the environment with clean and positive pressure air has played its role of maintaining the embryos free of microbiological interference.

CONCLUSION

The LabRep/HC/UFG adequation to the 2011 RDC n. 23 resolution was a great evolution to the treatment in the Center-west region of the country. However, in general, in regard to the embryo formation success as well as the embryo quality and fertilization success, the results found were similar in the two labs.

Concerning microbiological contamination, the culture mediums after collection were not contaminated, what shows that changes in the lab infrastructure reflected positively in preventing medium contamination. Notwithstanding, it did not reflect in the treatment rate success.

This study did not deplete the discussion about how the environment can interfere on AHR success at the LapRep-HC-UFG. We suggest a follow up study for a longer period of time, once the success rate of the assisted reproduction techniques may gradually improve.

The authors declare that there is no conflict of interests.

REFERENCES

1. WHO. Global status report on non communicable diseases 2010 [Internet]. Geneva:World Health Organization; 2010.Available from: http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report_full_en.pdf

2. ESHRE. 23 rd Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embriology [Internet]. 2007. Available from: https://www.eshg.org/94.0.html

3. MORAES PF, GIGANTE LP, FERRARI AN, MATTOS ALG. Evolução de casais inférteis por um período de até 10 anos. Revista AMRIGS [Internet]. 2015;48(4):230–4. Available from: http://www.amrigs.org.br/revista/48-04/1599.pdf

4. Gontijo ÉEL, Approbato MS. Relationship between biochemical , environmental , and microbiological changes with the success rate of fertilization techniques. JBRA Assisted Reproduction [Internet]. 2013;17(6):357–8. Available from: http://www.jbra.com.br/media/html/Erica.html

5. FOIZER BRR. Investigação bacteriológica e Micológica em placas de cultivo de embriões em laboratórios de reprodução humana Goiânia. Universidade Federal de Goiás; 2010.

6. Mendes AIG, Silva MSE, Amaral WN Do, Castro EC De. Confiabilidade da

contagem de folículos antrais com o uso de ultrassom bidimensional e tridimensional: uma revisão sistemática. Reprodução & Climatério [Internet]. Sociedade Brasileira de Reprodução Humana; 2014;29(2):48–53. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1413208714000399

7. Bento F, Esteves S, Agarwal a. Quality Management in ART Clinics [Internet]. 2013. Available from: http://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-1-4419-7139-5.pdf

8. Klipstein S, Regan M, Ryley D, Goldman M, Alper M, Reindollar R. One last chance for pregnancy: a review of 2,705 in vitro fertilization cycles initiated in women age 40 years and above. Fertil Steril [Internet]. 2005;84(2):435–45. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16084887

9. Anvisa. 8º Relatório do Sistema Nacional de Produção de Embriões Agência [Internet]. 2015. p. 1–27. Available from: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/9cddb8004840da35a438a5bdc15bfe28/sisembrio8.pdf?MOD=AJPERES

10. FREITAS M De, SIQUEIRA AA, SEGRE CA. Avanços em reprodução assistida. REVISTA bRASILEIRA DE dESENVOLV HUM [Internet]. 2008;18(1):93–7. Available from: http://pepsic.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-12822008000100012

11. ANVISA. RDC 23 [Internet]. Brasilia: Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 30 de maio de 2011; 2011. p. 1–19. Available from: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d3f7c4804986e29a8e51ff4ed75891ae/RDC_23_2011.pdf?MOD=AJPERES

12. Freitas M de, Siqueira AA, Segre CAM. AVANÇOS EM REPRODUÇÃO ASSISTIDA ADVANCES. Revista Brasileira de Crescimento e Desenvolvimento Humano [Internet]. 2015;7(11):956–63. Available from: http://pepsic.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-12822008000100012

13. Esteves S c. Sala limpa Classe 100 / ISO 5: Condição sine qua non nos laboratórios de reprodução assistida ? Arquivos H ELLIS [Internet]. 2007;3(4):1–15. Available from: www.researchgate.net/publication/232408951_Sala_limpa_Classe_100ISO_5_Condicao_sine_qua_non_nos_laboratorios_de_reproducao_assistida

14. Foizer BRR, Amaral WN do, Sadoyama G. Investigação bacteriológica e micológica de placas de cultivo de embriões em laboratório de reprodução humana. Reprodução & Climatério [Internet]. 2010;26(1):12–8. Available from: http://www.sbrh.org.br/sbrh_novo/restrito/revista/2011_jan_mar_12-18.pdf

15. Kastrop et al. Microbial contamination of embrio cultures in an ART laboratory: sourses and management. Hum Reprod [Internet]. 2007;22(1):2243–8. Available from:

http://humrep.oxfordjournals.org/content/22/8/2243.short

16. Foizer BRR, da Silva KR, Vieira JDG, do Amaral WN. Contaminação microbiológica em laboratório de reprodução humana e suas implicações no sucesso da reprodução assistida. Reprodução & Climatério [Internet]. 2014;29(2):66–70. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1413208714000430

17. Koneman E. Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

18. Amaral W, Dzik A, Pereira D, Cavagna M. Tratado de Reprodução Assistida. São Paulo: , 2010. p. . SBRH. 2010. p. 295–316.

19. Esteves SC, Bento FC. Air quality control in the ART laboratory is a major determinant of IVF success. Asian Journal of Andrology [Internet]. 2015;18:1–4. Available from: http://www.ajandrology.com/preprintarticle.asp?id=166433

20. Munch E, Sparks A, Duran H, Van Voorhis B. Lack of carbon air filtration impacts early embryo development. Journal of Assisted Reproduction and Genetics [Internet]. 2015;32:1009–17. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26003657

21. Legro RS, Sauer MV, Mottla GL, Richter KS, Li X, Dodson WC. Effect of air quality on assisted human reproduction. Hum Reprod. 2010;25(5):1317–27.

22. Mayer JF, Nehchiri F, Weedon VM, Jones EL, Kalin HL. Prospective randomized crossover analysis of the impact of an incubator air filtration on IVF outcomes. 1999; 72: . Fertil Steril. 1999;72(1):S42.

23. Khoudja R, Xu Y, Li T, Zhou C. Better IVF outcomes following improvements in laboratory air quality. Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2013;30:69–76.

24. Esteves SC, Bento FC. Implementation of air quality control in reproductive laboratories in full compliance with the brazilian cells and germinative tissue directive. Reproductive BioMedicine Online. 2013;26(1):9–21.

25. Khoudja RY, Xu Y, Li T, Zhou C. Better IVF outcomes following improvements in laboratory air quality. J Assist Reprod Genet. 2013;30(1):69–76.

26. Silveira CF, Coutinho LMDA, Amaral WN de, Castro EC de. A contagem dos folículos antrais na predição de resultados em ciclos de fertilização in vitro: uma revisão sistemática. Reproducao e Climaterio [Internet]. 2013;28(2):68–73. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S141320871300054X

27. Meyer A, Sarcinelli PN, Moreira JC. Estarão alguns grupos populacionais

brasileiros sujeitos à ação de disruptores endócrinos? Cadernos de Saúde Pública [Internet]. 1999;15(4):845–50. Available from: http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X1999000400018&lng=en&nrm=iso&tlng=pt

28. ANVISA. Resolução RDC nº 33, 17/02/2006. [Internet]. 2006. Available from: http://adcon.rn.gov.br/ACERVO/Suvisa/doc/DOC000000000025025.PDF

29. Worrilow KC, Huynh HT, Gwozdziewicz JB, Schillings W, Peters AJ. A retrospective analysis: the examination of a potential relationship between particulate (P) and volatile organic compound (VOC) levels in a class 100 IVF laboratory cleanroom (CR) and specific parameters of embryogenesis and rates of implantation. Fertil Steril. 2001;76(1):S15–6.

30. Cohen J, Gilligan A, Esposito W, Schimmel T, Dale B. Ambient air and its potential effects on conception in vitro. Hum Reprod. 1997;121(1):1742–9.

31. Giorgett I, Terriou P, Auquier P, Hans H, Spach J, Salzmann J. Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. Hum Reprod. 1995;10(9):2427–31.

32. Staessen C, Camus M, Bollen N, Devroey P, Van Steirteghem A. The relationship between embryo quality and the occurrence of multiple pregnancies. Fertil Steril. 1992;57(3):626–30.

33. Depa-Martynow, M. Jedrzejczak, P.; Pawelczyk, L. Pronuclear scoring as a predictor of embryo quality in in vitro fertilization program. Folia Histochem Cytobiol., v. 47, n. Suppl 1, p. S85–89, 2007. Disponível em: <www.researchgate.net/publication/5559094_Pronuclear_scoring_as_a_predictor_of_embryo_quality_in_in_vitro_fertilization_program>.

4.3 Manuscrito 3

FATORES RELACIONADOS AO SUCESSO DA FERTILIZAÇÃO ASSISTIDA EM PACIENTES ATENDIDOS EM UM LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO HUMANA

RESUMO

OBJETIVO: Avaliar a interferência de fatores no sucesso de reprodução atendidos no laboratório de reprodução humana do hospital das clínicas da Universidade Federal de Goiás (LabRep/HC/UFG) nos anos de 2013 e 2014.

METODOLOGIA: Trata-se de um estudo descritivo com pacientes atendidas com mulheres atendidas no Serviço de Reprodução Humana do Laboratório de Reprodução do Hospital das Clínicas/UFG,Goiânia, Goiás, Brasil. Foram pesquisadas informações em prontuários de 278 que submeteram a qualquer técnica de Reprodução Humana Assistida no período do estudo. Avaliou-se a correlação dos fatores (idade, índice de massa corporal, exames sorológicos, duração da infertilidade, dosagens hormonais e características dos folículos ovarianos e oócitos, qualidade espermática e infecção no sêmen) e o sucesso da gravidez.

RESULTADOS: A correlação do insucesso de gravidez foi determinada pelos seguintes parâmetros femininos: ter mais de 40 anos (OR:6,04; IC:1,34-27,08; p:0,010), tempo de infertilidade superior a 97 meses (OR:4,49; IC:1,65-12,21; p:0,001) e possuir endométrio com espessura inferior a 10mm (OR:5,42; IC:2,44-12,05; p:0,001). Os fatores masculinos correlatos foram: oligozoospermia (OR:3,35; IC: 1,41-7,92; p:0,010) e teratozoospermia (OR:4,14; IC:1,89-9,07; p:0,001) . A contaminação microbiológica em espermas indicou 6,11% de amostras de espermas contaminados.

CONCLUSÃO: Os pacientes atendidos no no LabRep/HC/UFG, são extremamente heterogêneos quanto aos seus perfis clínicos e características reprodutivas diversas. Isso se mostra como um grande desafio que instiga o investimento permanente em tecnologia e processos de ponta, além de aperfeiçoamento constante da equipe multidisciplinar que compõem o laboratório.

Unitermos: FIV, contaminção do sêmen, qualidade espermática e idade da mulher.

1. INTRODUÇÃO

A área do conhecimento ligada a Reprodução Humana Assistida (RHA) está em grande evolução e vem passando por significativas mudanças na qual os avanços oferecem inúmeros recursos para o tratamento da infertilidade humana e tem trazido novas possibilidades de planejamento familiar (1–4).

Estudos reportam que em torno de 15% a 30% dos casais brasileiros necessitam de tratamento médico para se reproduzir e as sucessivas tentativas, acompanhadas de ausência gestacional causam frustrações e depressão, demonstrando a importância do rastreamento do problema conjugal (5).

A infertilidade feminina pode estar associada a patologias, incluindo a anovulação, endometriose, as oscilações hormonais, alterações morfológicas do aparelho reprodutivo, massa corporal, idade, infecções, problemas masculinos, dentre outros (5–11). O que podem levar a um grande impacto psicológico em mulheres, pela incapacidade de realizar seu "papel" de ser mãe (12).

Cerca de 50% dos casos de infertilidade humana, o fator responsável é o masculino. As principais causas são fatores intrínsecos, como: espermograma fora dos padrões da normalidade, alterações endócrinas, anomalias do cariótipo, azoospermia obstrutiva e secretora, câncer, anejaculação, lesões do escroto, criptorquia, ejaculação retrógrada, anomalias anatômicas e causas desconhecidas (13).

Atualmente existem muitos métodos que auxiliam o processo de reprodução humana, conhecidos como técnicas de reprodução assistida. São classificadas em procedimentos de baixa e alta complexidade. Os métodos de baixa complexidade incluem o coito programado e a inseminação intrauterina, que não precisam ser realizados em centros de reprodução assistida. Os métodos de alta complexidade são a fertilização *in vitro* convencional e a injeção intracitoplasmática de espermatozoide (14).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a interferência de fatores como idade, índice de massa corporal, exames sorológicos, duração da infertilidade, dosagens hormonais, características dos folículos ovarianos, oócitos nas mulheres. Bem como os fatores masculinos analisados de seus parceiros como: espermograma e contaminação espermática e a sua interferência no sucesso de reprodução em mulheres atendidas no laboratório de reprodução humana do hospital das clínicas da

Universidade Federal de Goiás (LabRep/HC/UFG) nos anos de 2013 e 2014.

2. METODOLOGIA

Trata-se de um estudo descritivo com pacientes atendidas no Serviço de Reprodução Humana do LabRep/HC/UFG (Sisfert-Sistema de Fertilização Assistida HC/UFG), Goiânia, Goiás, Brasil. As informações foram obtidas acessando banco de dados do LabRep/HC/UFG nos anos de 2013 e 2014.

2.1.CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos na pesquisa todas as pacientes que se submeteram a procedimento de reprodução assistida no LabRep contendo em seu prontuário o resultado do exame de β-hCG.

Foi considerado sucesso de gravidez as pacientes que possuíam resultados de βhCG positivo quinze dias após o procedimento.

2.2. FATORES ÉTICOS

A coleta de dados se deu após a aprovação pelo comitê de ética sob o número de protocolo 768619. De acordo com a Resolução 196 do Conselho Nacional de Saúde (15) e a aprovação da diretoria do Hospital das Clínicas. Foi mantido total sigilo quanto à identidade das participantes.

2.3. AMOSTRAS

Foram avaliados 278 ciclos completos. As variáveis foram agrupadas em: fatores femininos e fatores masculinos.

Os fatores femininos avaliados foram: idade, Índice de Massa Corporal (IMC), espessura endometrial, resultados de exames sorológicos das mulheres, duração da infertilidade e concentração dos hormônios estradiol, hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) e características dos folículos ovarianos e oócitos.

A idade dessas mulheres foi avaliada em anos e estratificada em quatro grupos: menores que 30 anos, de 31 a 35 anos, 36 a 40 anos e maiores de 40 anos.

Quanto ao IMC, seguiu-se os valores propostos por Must et al. (1991), onde as pacientes foram divididas em quatro estratos: pacientes magras (IMC<20 kg/m^2), peso corporal adequado; (IMC entre 20 e 24,9 kg/m^2), sobrepeso (IMC entre 25 e 29,9 kg/m^2) e obesas (IMC>30 kg/m^2).

Durante a fase folicular, foram realizadas as dosagens hormonais para avaliação da concentração dos hormônios. As mulheres foram divididas em dois grupos, as que possuíam suas dosagens hormonais dentro da normalidade e as que possuíam suas dosagens alteradas.

Em relação ao endométrio, as mulheres foram dividias em três grupos: as que possuíam endométrio com espessura menor que 10mm, entre 10 a 15mm e espessura endometrial acima de 15mm.

As sorologias pesquisadas nas mulheres foram: clamídia, citomegalovírus e HPV.

Quanto à duração da infertilidade, elas foram divididas em três períodos: 12-36 meses; 48-96 meses e >97 meses.

Quanto ao tamanho dos oócitos, dividiu-se em: <16mm, 16-25mm e >25mm. Quanto às características dos folículos e oócitos analisados, foram observados: o tamanho dos folículos no dia da administração do hCG, a quantidade de oócitos aspirados, oócitos captados e injetados.

Os fatores masculinos analisados foram: espermograma e contaminação espermática.

Os espermogramas foram avaliados quanto às características morfológicas, quantidade e movimentação dos espermatozoides. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o sêmen para ter os parâmetros dentro da normalidade (normozoospermia) deve possuir: a concentração de espermatozóides acima de 15 milhões por ml; a quantidade total de espermatozoides acima de 39 milhões e quanto à motilidade total, pelo menos a metade dos espermatozoides deve possuir uma progressão linear, com motilidade acima de 40%; hipospermia (volume de sêmen ejaculado inferior a 1.5 mililitros); astenozoospermia (redução ou ausência da mobilidade dos espermatozoides); teratozoospermia (menos de 4% de espermatozoides com morfologia normal); azoospermia (ausência de espermatozoides no sêmen) e necrozoospermia (ejaculado com pelo menos 75% dos espermatozoides mortos) (16).

A contaminação espermática foi verificada através do estudo da

espermocultura, verificando a presença ou a ausência de contaminação. Segundo a RDC 33 de 17/02/2006 deve-se realizar uma coleta seminal como triagem microbiológica para detectar a existência de contaminação de *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Neisseria gonorrhoeae* e bactérias aeróbias. As amostras de sêmen devem possuir resultados negativos para estes microorganismos (16,17).

2.4. ANÁLISES ESTATÍSTICOS

Os dados foram avaliados pelo programa Epi-Info 3.3.2 ® e BioEstat 5.3®. Foram montadas tabelas de contingência, e aplicado o teste qui-quadrado (χ^2) e odds ratio para determinação da associação entre os fatores e o sucesso de gravidez, confirmado pelo surgimento do hormônio β-hCG no sangue. Foi adotado o nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS

Foram pesquisados as informações de 278 ciclos completos. Em relação as variáveis pesquisadas idade e IMC, encontrou-se interferência na chance de gravidez o fato da mulher possuir idade superior a 40 anos. Não foi encontrada relação entre IMC e risco de negatividade de βhCG (Tabela 1).

TABELA 1 - Análise de risco de negatividade de βhCG para idade e IMC, no tratamento de reprodução assistida em mulheres atendidas no Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás nos anos de 2013 e 2014.

Variável		n/%	βHCG+ (63 ciclos)	βHCG- (215 ciclos)	OR	IC	*p*
Idade	< 30 anos	49 (17,6%)	9 (18,3%)	40 (81,7%)	1,99	0,86-4,62	0,15
	31 - 35 anos	97 (34,9%)	30 (30,9%)	67 (69,1%)	1		
	36 - 40 anos	103 (37,1%)	22 (21,3%)	81 (78,7%)	1,64	0,87-3.12	0,17
	> 40 anos	**29 (10,4%)**	**2 (6,9%)**	**27 (93,1%)**	**6,04**	**1,34-27.08**	**0,01**
IMC	<20 kg/m2	40 (14,4%)	10 (25,0%)	30 (75,0%)	1		
	20-24,9 kg/m^2	133 (47.8%)	33 (24,8%)	100 (75,2%)	1,01	0,44-2,29	0,86
	25-29,9 kg/m^2	75 (27.0%)	15 (20,0%)	60 (80,0%)	1,33	0,53-3,32	0.70
	>30 kg/m^2	30 (10,8%)	5 (16,7%)	25 (83,3%)	1,66	0,50-5,52	0,58

OR: Odds Ratio, **IC:** Intervalo de confiança, ***p*:** valor de P, **n.:** Número, **bHCG+:** Hormônio Gonadotrofina Coriônica Humana Positiva, **βhCG-:** Hormônio Gonadotrofina Coriônica Humana Negativa, **<:** Menor,**>:** Maior, **CMV**: Citomegalovírus, **HPV:** Papiloma vírus humano, **FSH:** Hormônio Folículo Estimulante, **LH:** Hormônio Luteinizante, **IgG:** Imunoglobulina G, **IMC:** Índice de Massa Corporal, **Alter.:** Alterado.

Quanto à avaliação dos outros fatores femininos relacionados à infertilidade, os principais fatores foram: apresentar problema de infertilidade a mais de 97 meses e apresentar endométrio com espessura inferior a 10mm. Não foi encontrada relação

entre esquema de estimulação ovariana, sorologias, tempo de infertilidade e concentração de estradiol, FHS e LH no sangue (TABELA 2).

TABELA 2 - Análise de risco de negatividade de βhCG, no tratamento de reprodução assistida em mulheres atendidas no Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás nos anos de 2013 e 2014.

Variável			n/%	βHCG+ (63 ciclos)	βHCG- (215 ciclos)	OR	IC	*p*
Infecções	Clamidia (IgG)		66 (23,7%)	13 (19,7%)	53 (80,3%)	2,91	0,79-10,66	0,20
	CMV (IgG)		198 (71,2%)	38 (19,2%)	160 (80,8%)	3,01	0,90-9,99	0,13
	HPV (IgG)		12 (4,3%)	5 (41,7%)	7 (58,3%)	1		
Tempo de infertilidade	12 -36 meses		116 (41,7%)	35 (30,2%)	81 (69,8%)	1		
	37-96 meses		105 (37,8%)	23 (21,9%)	82 (78,1%)	1.54	0,84-2,83	0,21
	>97 meses		**57 (20,5%)**	**5 (8,8%)**	**52 (91,2%)**	**4,49**	**1,65-12,21**	**0,01**
Dosagem de Hormônios séricos	Estradiol	Normal	272 (97,8%)	62 (22,8%)	210 (77,2%)	1		
		Alter.	6 (2,2%)	1 (16,7%)	5 (83,3%)	1,48	0,17-12,87	0,89
	FSH	Normal	145 (52,1%)	38 (26,2%)	107 (73,8%)	1		
		Alter.	133 (47,9%)	25 (18,8%)	108 (81,2%)	1,53	0,87-2,72	0,18
	LH	Normal	263 (94,6%)	60 (22,8%)	203 (77,2%)	1		
		Alter.	15 (5,4%)	3 (20,0%)	12 (80,0%)	1,18	0,32-4,33	0,95
Espessura do endométrio	**<10mm**		**152 (54,7%)**	**9 (6,2%)**	**143 (93,8%)**	**5,42**	**2,44-12,05**	**0,01**
	10 -15mm		110 (39,6%)	28 (25,6%)	82 (74,4%)	1		
	>15mm		16 (5,7%)	3 (20,9%)	13 (79,1%)	1,48	0,39-5,58	0,79

OR: Odds Ratio, **IC:** Intervalo de confiança, ***p*:** valor de P, **n.:** Número, **bHCG+:** Hormônio Gonadotrofina Coriônica Humana Positiva, **βhCG-:** Hormônio Gonadotrofina Coriônica Humana Negativa, **<:** Menor,**>:** Maior, **CMV**: Citomegalovírus, **HPV:** Papiloma vírus humano, **FSH:** Hormônio Folículo Estimulante, **LH:** Hormônio Luteinizante, **IgG:** Imunoglobulina G, **IMC:** Índice de Massa Corporal, **Alter.:** Alterado.

Quanto a relação da presença dos folículos de tamanhos diversos com a formação de embriões e sucesso na gravidez por meio da positividade do exame de βHCG foi obeservado que:

A média dos de folículos ovarianos encontrados nas mulheres foi de: 2,86 (em mulheres que possuíam folículos de tamanho <16mm), 4,55 folículos (em mulheres que possuíam folículos de tamanho 16<25mm), 0,17 folículos (em mulheres que possuíam folículos de tamanho >25mm).

Dos pacientes que apresentavam folículos de tamanho <16mm, 137 (62.84%) formaram embriões e 49 (22.47%) engravidaram.

TABELA 3 – Relação entre a quantidade de folículos e gravidez (βhCG+), de mulheres atendidas no Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás nos anos de 2013 e 2014.

	n. de casos	Média por paciente	Formou embrião		βHCG+	
			n.	%	n.	%
Tamanho dos folículos (<16mm)	218	2.86	137	62.84	49	22.47
Tamanho dos folículos (16 a 25mm)	269	4.55	171	63.56	62	23.04
Tamanho dos folículos (≥25mm)	10	0.17	0	0	0	0

mm: Milímetro, n: Número, **βHCG+:** Mulher grávida

Dos pacientes que apresentavam folículos de tamanho 16<25mm, 171 (63.56%) formaram embriões e 62 (23.04%) engravidaram.

Dos pacientes que apresentavam folículos de tamanho >25mm, não houve farmação de embriões e casos de gravidez (Tabela 3).

Quanto as características dos oócitos no dia em que foi administrado o hCG, a média da quantidade de oócitos aspirados foi de 9,87 por mulher, captados 4,91, inseminados 2,57 e injetados 3,12 oócitos (Tabela 4).

TABELA 4 - Quantidade de oócitos, aspirados, captados, inseminados e injetados de pacientes atendidas no Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás nos anos de 2013 e 2014.

	Média	Variância	Desvio padrão	IC
Oócitos Aspirados	9,87	58,84	7,67	0,00 – 34,00
Oócitos Captados	4,91	15,98	3,99	0,00 – 40,00
Oócitos Inseminados	2,57	13,12	3,62	0,00 – 23,00
Oócitos Injetados	3,12	16,73	4,09	0,00 – 18,00

As mulheres com parceiros que apresentavam espermograma normais apresentaram 3,35 vezes mais chance de engravidar que mulheres com parceiros que apresentavam oligozoospermia e 4,14 vezes mais que as que possuíam parceiros com teratozoospermia (Tabela 5).

TABELA 5 - Análise dos fatores de risco do espermograma para negatividade de βhCG do espermograma em parceiros de mulheres atendidas no Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás nos anos de 2013 e 2014.

	n/%	**βHCG+**	**βHCG-**	**OR**	**IC**	***p***
Normozoospermia	93 (33,5%)	37 (39,8%)	58 (60,2%)	1		
Hipospermia	4 (1,4%)	0 (%)	4 (100%)	-	-	-
Astenozoospermia	39 (14,0%)	8 (20,5%)	31 (79,5%)	2,47	1,02 – 5,95	0,06
Oligozoospermia	50 (18,0%)	8 (16,0%)	42 (84,0%)	3,35	1,41 – 7,92	0,01
Teratozoospermia	75 (27,0%)	10 (13,3%)	65 (86,7%)	4,14	1,89-9,07	0,00
Azoospermia (punção)	17 (6,1%)	2 (11,8%)	15 (88,2%)	4,78	1,03-22,14	0,06

OR: Odds Ratio, **IC:** Intervalo de confiança, ***p*:** valor de P, **n.:** Número, **bHCG+:** Hormônio Gonadotrofina Coriônica Humana Positiva, **bHCG-:** Hormônio Gonadotrofina Coriônica Humana Negativa.

Na cultura do sêmen dos parceiros das mulheres atendidas no LabRep foi encontrado 17 (6,11%) de amostras contaminadas em 278 amostras pesquisadas, sendo que o microrganismo mais encontrado foram o *Staphylococcus epidermidis e Staphyfilococcus* sp. Este fator tem potencial de interferir no sucesso do tratamento no laboratório ISO 5/7 (Tabela 6).

TABELA 6 - Avaliação da contaminação microbiológica em espermograma de parceiros de mulheres atendidas no laboratório de reprodução humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás nos anos de 2013 e 2014.

Microrganismo	Frequência n (%)
Enterobacter agglomerans	1
Enterobacter sp	1
Escherichia coli	1
Klebsiella oxytoca	1
Staphylococcus agalactiae	1
Staphylococcus aureus	1
Staphylococcus epidermidis	6
Staphylococcus haemolyticus	1
Staphylococcus lentus	1
Staphylococcus sp	3
	17 (6,11%)

4. DISCUSSÃO

O sucesso da RHA está intimamente relacionado a diversos fatores como as variações das características dos pacientes e fatores interferentes como contaminação microbiológica (7,18).

Neste estudo, as mulheres que possuíam idade superior a 40 anos apresentaram uma maior dificuldade para engravidar, quando comparadas com mulheres com idades inferiores.

Sharma et al., (19) pesquisaram 2.056 casais que procuraram tratamentos para a infertilidade. Foi observado que as pacientes que possuíam idade inferior a 35 anos tinham o dobro da chance de ficarem grávidas, quando comparados com um grupo de mulheres com idade superior a 35. Segundo Gradvohl et al.,(8) mulheres acima dos 40 anos iniciam um período em que ocorre o declínio na vida reprodutiva. Nos países em desenvolvimento, existe uma propensão das mulheres em adiar a realização da maternidade. Segundo esses pesquisadores, isso ocorre por causa das mudanças do hábito de vida e expectativas profissionais. Pode se afirmar que nessa pesquisa o resultado encontrado é semelhante a outras pesquisas realizadas, onde o fato de ter idade acima dos 40 anos, influência negativamente na chance de gravidez, provavelmente pelo fato das mulheres acima dos 40 anos iniciarem um declínio em sua vida reprodutiva.

Quanto ao IMC, metade das mulheres (47%) estavam com o IMC dentro dos valores da normalidade, porém não foi encontrado influência desse fator com a chance de engravidar nas mulheres que participaram da pesquisa. Um fator que tem o potencial de influenciar negativamente na infertilidade é a obesidade. Isso porque muitas delas apresentam queda na fertilização natural, maior índice de infertilidade, abortos espontâneos, má resposta aos tratamentos de reprodução humana e uma

tendência a complicações obstétricas (20). Porém, outros pesquisadores afirmam que um IMC alterado não influencia no sucesso do tratamento de reprodução humana (21,22).

Uma fundamentação para divergências de opinião dos diferentes autores a respeito da interferência ou não da obesidade nos resultados do tratamento de reprodução humana é a incontestável prevalência das pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP), interferindo nos resultados do tratamento (21,23). A associação entre obesidade e subfertilidade parece estar relacionada, ao menos parcialmente, com a redução da frequência das ovulações (24).

Um estudo realizado por Robker e seus colaboradores, mostrou que em mulheres obesas o ambiente folicular também está alterado (25). Por outro lado, outros pesquisadores estudaram a qualidade dos embriões e o resultado reprodutivo no programa de Fertilização *in vitro* (FIV) de acordo com o IMC. Eles avaliaram um total de 6.500 ciclos de FIV e ICSI (injeção intracitoplasmática de espermatozoides) e dividiram as pacientes em quatro grupos de acordo com o IMC: pacientes magras (IMC<20 kg/m^2), peso corporal adequado (IMC entre 20 e 24,9 kg/m^2), sobrepeso (IMC entre 25 e 29,9 kg/m^2) e obesas (IMC>30 kg/m^2), e concluíram que a obesidade interfere negativamente nos resultados do tratamento de RHA, porém esses autores observaram que a qualidade do embrião não está comprometida (26). Neste estudo o IMC não interferiu nos tratamentos das mulheres realizadas no LabRep.

Quanto à duração da infertilidade, foi encontrada correlação entre o fator, duração da infertilidade superior a 97 meses e gravidez. Gradvohl et al. (2010) realizaram uma pesquisa com 101 mulheres onde foi avaliado, dentre outras variáveis o tempo de infertilidade no ambulatório de reprodução humana da UNICAMP, ele constatou que a maioria das mulheres pesquisadas, que não tiveram sucesso com as técnicas de RHA possuíam entre 24 a 59 meses de tempo de infertilidade (5). Resultados semelhantes foram encontrados por outros pesquisadores, onde os casais inférteis, sem sucesso no tratamento, possuíam um tempo de infertilidade de 44 à 72 meses de tempo de infertilidade (5,27,28). Provavelmente esse fator influencia na chance de gravidez de forma mais significativa, devido a cronicidade dos casos.

Em relação ao endométrio, foi realizada uma análise da sua espessura. Pode-se observar que esse fator interferiu no sucesso da gravidez. As mulheres atendidas

no LabRep que possuíam uma espessura endometrial inferior a 10mm tiveram uma menor chance de gravidez.

De acordo com Tsai et al., (29), Ozçakir et al., (30), e Nuojua-Huttunen et al., (31) este fator não influencia na chance de gravidez. No estudo de Tsai a espessura endometrial no grupo das mulheres que engravidaram e nas que não engravidaram foi, respectivamente, 12,1±2,6 mm e 11,0±2,9 mm ($p>0,05$), não sendo, um fator que influencia para o sucesso do tratamento (29–31). Porém, Tomlinson et al., (32), encontraram em sua pesquisa a influência da espessura do endométrio na chance de engravidar. Esses pesquisadores avaliaram 260 ciclos de IAIU. Eles observaram que algumas variáveis interferiram na chance de engravidar em sua pesquisa, como: espessura do endométrio, quantidade de folículos, tempo de infertilidade e porcentagem de espermatozoides com motilidade foram os principais fatores capazes de interferirem no sucesso do tratamento de reprodução humana. Nesse estudo observa-se que a baixa espessura endometrial influenciou no sucesso do tratamento, isso ocorre porque embriões conseguem um maior sucesso na implantação quando o endométrio possui uma maior espessura.

Quanto as características dos folículos e oócitos no dia em que foi administrado o hCG, a média de folículos ovarianos capturados foi de 4.55 folículos com tamanho (16 a 25mm). A seleção e o desenvolvimento de vários folículos ovarianos são utilizadas no tratamento da fertilização *in vitro* (33–36).

Jayarakasan et al., (39) afirmam que a quantidade de folículos maduros é um fator de grande significância do sucesso de gravidez. Um estudo retrospectivo realizado em 2010 a 2012 em uma clínica de reprodução assistida na cidade de Uberlândia dividiu as pacientes do estudo em três grupos de acordo com a quantidade de folículos: até 10, de 11 a 22, e maior ou igual a 23. Foi obtida uma taxa de gravidez de 24,4% no grupo que possuía até 10 folículos maduros, 38,3% no grupo das mulheres que possuíam de 11 a 22 folículos e 43,2% no grupo onde possuíam uma quantidade igual a 23 folículos (36). Em outro estudo, Muttukrishna et al (2005) separou mulheres em três grupos para análise: as que possuíam entre 1- 4 folículos maduros (grupo 1); de 5- 9 folículos maduros (grupo 2) e maior ou igual a 10 folículos (grupo 3). As taxas de gestação foram de 18,2%, 32% e 48%, respectivamente. Em uma pesquisa retrospectiva analisando 1.156 mulheres que submeteram ao tratamento de fertilização *in vitro*, teve como resultados um aumento no sucesso do tratamento de fertilização assistida com maiores quantidades de

folículos (34). Em relação à quantidade de oócitos, Bungum et al., (41), afirmam que uma quantidade reduzida de oócitos pode ser um fator prejudicial para o desenvolvimento embrionário. Em uma pesquisa retrospectiva, concluíram que as chances de sucesso no tratamento de fertilização *in vitro* diminuem com uma quantidade reduzida de oócitos captados (33). Assim, esse fator tem potencial para interferir nos resultados do LabRep/HC/UFG.

A respeito da sorologia realizada nas mulheres, foram encontradas principalmente positivas para Clamídia, citomegalovírus e HPV (papiloma vírus humano).

As infecções causadas pelas DST são uma ameaça para a fertilidade das mulheres, pois pode ocorrer a disseminação dos agentes patogênicos da parte inferior do aparelho reprodutor feminino para a superior podendo ocasionar diversos males como: dor pélvica crônica e esterilidade, levando a um grave problema de saúde pública (40)).

Em um estudo realizado com 120 pacientes em uma Clínica de fertilização na cidade de Goiânia, com pacientes com idade acima de 18 anos, encontrou-se que das mulheres que procuraram atendimento com problemas de infertilidades, 39% (47 pacientes) mulheres tiveram sorologia positiva para *C. trachomatis,* ou seja, tinham tido contato com o patógeno, atual ou prévio. Sendo que a maior prevalência encontrada foi nas mulheres na faixa etária entre 36 e 39, com 17 casos (14,2%) (42).

De todos os agentes causadores de DST, a *C. trachomatis* é a doença com maior prevalência em todo mundo, não tendo diferença entre países desenvolvidos e subdesenvolvidos (43). A incidência da infecção por Clamydia é alta entre os jovens com menos de 25 anos, sexualmente ativas (44). Mulheres infectadas por *C. trachomatis* pode ter deformações no seu trato reprodutivo. Algumas dessas alterações são: uretrite, cervicite e ainda a infecção pode alcançar o sistema reprodutor superior levando a mulher a desenvolver doença inflamatória pélvica (45). A infecção por essa bactéria é um dos principais problemas que influenciam a gestação. Entre as principais problemas decorrentes dessa infecção estão: gravidez ectópica, obstrução tubária, peritonite, salpingite (45).

Em um estudo com 1303 casais na Alemanha que buscavam tratamento para a infertilidade. Foi observado que as infecções por Clamídia não estão diretamente relacionados a causa de infertilidade, porém essa infecção agrava o quadro de infertilidade por causar modificações no aparelho reprodutor feminino e masculino.

Essas modificações foram encontradas em mais de 50% das pacientes infectadas com a Clamídia (46).

Approbato, 2010 realizou uma pesquisa com realizando examens de PCR, onde foi encontrado uma grande diminuição do índice de *C. trachomatis* na faixa etária das pacientes com infertilidade, sendo que, menos de 1% dos pacientes tiveram a presença desta bactéria. Estas pacientes apresentaram alta prevalência de sequelas tardias graves, como obstrução das tubas uterinas, aderências pélvicas e gravidez ectópica (47).

O citomegalovírus humano é um herpes vírus que pode ser transmitido pelo contato sexual e pelo contato direto com fluidos corporais dos indivíduos contaminados pelo vírus. Após, a contaminação inicial o herpes vírus é eliminado em grandes concentrações na urina, saliva, lágrima, sêmen, leite materno e secreções cervicais por meses ou anos (48,49).

No nosso estudo, encontramos 76% (n: 211) das mulheres pesquisadas com CMV, porém não foram encontrados dados na literatura que indique a interferência do CMV na infertilidade.

O Papiloma vírus Humano (HPV) é um agente infeccioso inserido no grupo de doenças sexualmente transmissível (DST) relacionadas ao aparecimento de neoplasias benignas e malignas no colo de útero e região vulvovaginal e anal (50,51).

Vários estudos demonstram que não há diferença de prevalência da contaminação pelo HPV nas mulheres inférteis quando comparadas com mulheres férteis (50–53).

Uma pesquisa feita por Lundqvist et al. (2002) (54), que realizaram uma pesquisa com 214 mulheres inférteis e fizeram uma comparação de seus resultados para HPV com mulheres que não tinham problemas de fertilidade. Os autores observaram que o resultado positivo para o HPV nas mulheres com problemas para engravidar foi de 7,0% e no grupo de mulheres saudáveis, que não tinham problemas de infertilidade foi de 9,1%, não verificando diferença entre os grupos (52). No que diz respeito à sorologia positiva pesquisada nas mulheres, a prevalência destas mostrou-se semelhante a outros estudos realizados no Brasil.

O exame de sêmen é de extrema relevância para avaliar a infertilidade masculina. Quanto a avaliação do espermograma dos parceiros sexuais das mulheres atendidas no LabRep. Foram observados maiores frequências de casos de normozoospemia e teratozoospemia nos dois laboratórios, as alterações encontradas

que interferiram na chance de sucesso da técnica no LabRep foram oligozoospermia e teratozoospermia (54,55).

Uma pesquisa realizada por López-Villaverde et al., (58) analisaram 567 ciclos de FIV consecutivos, foi realizado diagnóstico em amostra seminal utilizada e os resultados encontrados foram semelhantes a esta pesquisa, onde os principais resultados encontrados nos espermograma foram a normozoospermia (31,7%), seguido de teratozoospermia (21,9%) (56).

O fato das alterações nos espermograma que interferiram na chance de sucesso da técnica no LabRep serem oligozoospermia e teratozoospermia se deve a estes tipos de alterações apresentarem uma redução na qualidade do sêmen, independente da etiologia do distúrbio, influenciando diretamente na chance de gravidez.

Quanto à cultura do sêmen, foi encontrado 6,11% das amostras contaminadas por microrganismos, sendo que os mais encontrado foram o *S. epidermidis* e *Staphylococcus* sp. Este fator tem potencial de interferir no sucesso do tratamento no LabRep.

É comum encontrar microrganismos no aparelho reprodutor humano, por essa razão, as técnicas de Fertilização *in vitro* utilizam antibióticos no sêmen e na cultura de embriões (57). Foi demonstrado a importância de realizar a cultura em material seminal ainda na etapa da triagem, para realização de tratamento prévio, evitando assim a contaminação de embriões por fungos ou bactérias e aumentando a chance de sucesso no tratamento.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os fatores relacionados ao insucesso do tratamento de reprodução assistida encontrados foram: idade superior a 40 anos, tempo de infertilidade superior a 96 meses e espessura do endométrio inferior a 10mm. Esses fatores são classicamente relacionados a infertilidade e redução da chance de gravidez.

Quanto aos fatores masculinos envolvidos, observou-se grande frequência de sêmen de baixa qualidade, nos parceiros das mulheres que formaram o grupo de estudo. Este fator é extremamente relevante na redução da chance de gestação.

Foi possível concluir que os pacientes atendidos no LabRep/HC/UFG, são extremamente heterogêneos quanto aos seus perfis clínicos e características

reprodutivas diversas. Isso se mostra como um grande desafio que instiga o investimento permanente em tecnologias e processos de ponta, além de aperfeiçoamento constante da equipe multidisciplinar que compõem o laboratório.

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pavan JN, Aarestrup JR, Bertoldi C. Reprodução assistida: Uma pesquisa junto aos profissionais da área. REVISTA BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO E SAÚDE [Internet]. 2013;3(3):31–6. Available from: http://www.gvaa.com.br/revista/index.php/REBES/article/view/2342

2. Esteves SC. Efficacy, efficiency and effectiveness of gonadotropin therapy for infertility treatment. Medical Express [Internet]. 2015;2(3):1–11. Available from: http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/MedicalExpress.2015.03.02

3. Mendes AIG, Silva MSE, Amaral WN Do, Castro EC De. Confiabilidade da contagem de folículos antrais com o uso de ultrassom bidimensional e tridimensional: uma revisão sistemática. Reprodução & Climatério [Internet]. Sociedade Brasileira de Reprodução Humana; 2014;29(2):48–53. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1413208714000399

4. Macedo LC, Fonseca RP. Varicocele: A Principal Causa da Infertilidade Masculina. Saúde e Pesquisa [Internet]. 2015 Jun 22;8(1):167. Available from: http://periodicos.unicesumar.edu.br/index.php/saudpesq/article/view/2985

5. Gradvohl SMO, Osis MJD, Makuch MY. Características de homens e mulheres que buscam tratamento para infertilidade em serviço público de saúde. Reprodução & Climatério [Internet]. Sociedade Brasileira de Reprodução Humana; 2013;28(1):18–23. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1413208713000186

6. Esteves SC, Bento FC. Implementation of air quality control in reproductive laboratories in full compliance with the brazilian cells and germinative tissue directive. Reproductive BioMedicine Online. 2013;26(1):9–21.

7. Esteves SC, Bento FC. Air quality control in the ART laboratory is a major determinant of IVF success. Asian Journal of Andrology [Internet]. 2015;18:1–4. Available from: http://www.ajandrology.com/preprintarticle.asp?id=166433

8. Fernandes LB, Arruda JT, Approbato MS, García-Zapata MTA. Infecção por Chlamydia trachomatis e Neisseria gonorrhoeae: fatores associados à infertilidade em mulheres atendidas em um serviço público de reprodução humana. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia [Internet]. 2014;36(8):353–8. Available from:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032014000800353&lng=pt&nrm=iso&tlng=en

9. Heitmann R, Hill M, James A, Schimmel T, Segars J. Live births achieved via IVF are increased by improvements in air quality and laboratory environment. Reproductive BioMedicine Online [Internet]. 2015;31:364–71. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26194882

10. Khoudja R, Xu Y, Li T, Zhou C. Better IVF outcomes following improvements in laboratory air quality. Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2013;30:69–76.

11. Munch E, Sparks A, Duran H, Van Voorhis B. Lack of carbon air filtration impacts early embryo development. Journal of Assisted Reproduction and Genetics [Internet]. 2015;32:1009–17. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26003657

12. Miranda FE. A infertilidade feminina na pós-modernidade: entre o narcisismo e a tradição. Revista de Ciências Humanas. 2006;39(1):183–97.

13. Nunes SRT. O aconselhamento genético no âmbito da procriação Medicamente assistiva da bioética [Internet]. Universidade do Porto; 2007. Available from: https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/22156/3/Microsoft Word O aconselhamento gentico em procriao medicamente assistida perspectiva da biotica.pdf

14. Moraes PF, Gigante LP, Ferrari AN, Mattos ALG. Evolução de casais inférteis por um período de até 10 anos. Revista AMRIGS [Internet]. 2015;48(4):230–4. Available from: http://www.amrigs.org.br/revista/48-04/1599.pdf

15. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Brasília. 2006.

16. WHO. Global status report on non communicable diseases 2010 [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2010. Available from: http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report_full_en.pdf

17. ANVISA. Resolução RDC nº 33, 17/02/2006. [Internet]. 2006. Available from: http://adcon.rn.gov.br/ACERVO/Suvisa/doc/DOC000000000025025.PDF

18. Foizer BRR, da Silva KR, Vieira JDG, do Amaral WN. Contaminação microbiológica em laboratório de reprodução humana e suas implicações no sucesso da reprodução assistida. Reprodução & Climatério [Internet]. 2014;29(2):66–70. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1413208714000430

19. Sharma V, Allgar V, Rajkhowa M. Factors influencing the cumulative conception rate and discontinuation of in vitro fertilization treatment for infertility. Fertil Steril. 2011;78(1):40–6.

20. Pasquali R, Patton L, Gambineri A. Obesity and infertility. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes [Internet]. 2007;14(6):482–7. Available from: http://journals.lww.com/co-endocrinology/Abstract/2007/12000/Obesity_and_infertility.11.aspx

21. Martinuzzi K, Ryan S, Luna M, Copperman A. Elevated body mass index (BMI) does not adversely affect in vitro fertilization outcomes in young women. J Assist Reprod Genet [Internet]. 2008;25(5):169–75. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s10815-008-9213-6

22. Thum M, El-Sheikhah A, Faris R, Parikh J, Wren M, Ogunyemi T. The influence of body mass index to in-vitro fertilisation treatment outcomes, risk of miscarriage and pregnancy outcomes. J Obstet Gynaecol [Internet]. 2007;27(7):699–702. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17999296

23. Orvieto R, Nahum R, Meltcer S, Homburg R, Rabinson J, Anteby E. Ovarian stimulation in polycystic ovary syndrome patients: the role of body mass index. Reprod Biomed Online [Internet]. 2009;18(3):333–6. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472648310600909

24. Pasquali R. Obesity, fat distribution and infertility. Maturitas [Internet]. 2006;54(4):363–71. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16725287

25. Robker R, Akison L, Bennett B, Thrupp P, Chura L, Russell D. Obese women exhibit differences in ovarian metabolites, hormones, and gene expression compared to moderate weight women. J Clin Endocrinol Metab [Internet]. 2009;94(5):1533–40. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19223519

26. Bellver J, Ayllón Y, Ferrando M, Melo M, Goyri E, Pellicer A. Female obesity impairs in vitro fertilization outcome without affecting embryo quality. Fertil Steril [Internet]. 2010;93(2):447–54. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19171335

27. Montagnin H, Blay N, Freitas V, Cedenho A. Estados emocionais de casais submetidos à fertilizac¸ão in vitro. Estud Psicol. 2009;4(1):475–81.

28. Gorayeb R, Borsari A, Gomes A, Romão A, Shuhama R. Caracterizac¸ão clínica e psicossocial da clientela de um ambulatório de esterilidade. Estud Psicol. 2009;26(1):287–96.

29. Tsai H, Chang C, Hsieh Y, Lee C, HY L. Artificial insemination. Role of endometrial thickness and pattern, of vascular impedance of the spiral and uterine arteries, and of the dominant follicle. J Reprod Med. 2000;45(1):195–200.

30. Ozçakir H, Göker E, Terek M. Relation- ship of follicle number, serum estradiol level, and other factors to clinical pregnancy rate in gonadot- ropin-induced intrauterine insemination cycles. Arch Gynecol Obstet. 2002;266(1):18–20.

31. Nuojua-Huttunen S, Tomas C, Bloigu R, Tuomivaara L, Martikainen H. Intrauterine insemination treat- ment in subfertility: an analysis of factors affecting outcome. Hum Reprod. 1999;14(1):698–703.

32. Tomlinson M, Amissah-Arthur J, Thompson K, Kasraie J, Bentick B. Prognostic indicators for in- trauterine insemination (IUI): statistical model of IUI success. Hum Reprod. 1996;11(1):1892–6.

33. Lukaszuk K, Kunicki M, Lis s J, Lukaszuk M, Jakiel G. Use of ovarian reserve parameters for predicting live births in women undergoing in vitro fertilization. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2013;168(2):173–7.

34. Li HW, Lee VC, Lau EY, Yeung WS, Ho PC, Ng EH. Role of baseline antral follicle count and anti-mullerian hormone in prediction of cumulative live birth in the first in vitro fertilization cycle: a retrospective cohort analysis. Plos One. 2013;8(4):8:e61095.

35. Hsu A, Arny M, Knee AB, Bell C, Cook E, Novak AL. Antral follicle count in clinical practice: analyzing clinical relevance. 2011;95(2):474-9. Fertil Steril. 2011;95(2):474–9.

36. Silva G, Dini A, Morun B, Marcolini T, Perillo L, Pires W, et al. Número de folículos antrais e o sucesso da fertilização in vitro : uma análise multivariada. Rev Bras Ginecol Obstet. 2014;36(10):473–9.

37. Jayarakasan K, Chan Y, Islam R, Haoula Z, Hopkisson J, Coomarasamy A. Prediction of in vitro fertilization outcome at different antral follicle count thresholds in a prospective cohort of 1,012 women. Fertil Steril. 2012;98(3):657–63.

38. Muttukrishna S, McGarrigle H, Wakim R, Khadum I, Ranieri DM, Serhal P. Antral follicle count anti-mullerian hormone inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology? BJOG. 2005;113(1):1384–90,.

39. Bungum M, Bungum L, Humaidan P, Yding Andersen C. Day 3 versus day 5 embryo transfer : a prospective randomized study. Reproductive BioMedicine Online; 2003;7(1):98–104.

40. Wesenfeld H. Lower genital tract infection may indicate subclinical PID. Obstetrics and Gynecology. 2002;100(1):456–63.

41. Approbato FC, Approbat MS, Florêncio R, Maia MCS, Silva TM Da, Amaral WN do. Chlamydia trachomatis em reprodução humana - aspectos clínicos e laboratoriais. Reprod clim. 2011;26(3):77–84.

42. Proto IAC, Carneiro JDM, Passos XS, Ataídes FS, do Amaral WN. Prevalência de Chlamydia trachomatis em mulheres submetidas à fertilização assistida em Goiânia. Reprodução & Climatério [Internet]. Sociedade Brasileira de Reprodução Humana; 2013;28(3):108–11. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1413208714000053

43. Ovalle A, Martínez M, de la Fuente F, Falcon N, Feliú F, Fuentealba F.

Prevalencia de infecciones de transmisión sexual en mujeres embarazadas atendidas en un hospital público de Chile. Rev Chilena Infectol. 2012;29(1):517–20.

44. Dehne K, Riedner G. Sexually transmitted infections among adolescents. The need for adequate health services. World Health Organization and Deutsche Gesellsschaft fuer Technische Zusammenarbeit (GTZ). 2005.

45. Paavonen J, Eggert-Kruse W. Chlamydia trachomatis: impact on human reproduction. Hum Reprod Update. 1999;5(5):433–47.

46. Eggert-Kruse W, Rohr G, Demirakca T, Rusu R, Näher H, Petzoldt D. et al. Chlamydial serology in 1303 asymptomatic subfertile couples. Hum Reprod. 1997;12(7):1464–75.

47. Approbato M. Gravidez ectópic. Vademecum de Clínica Médica, Porto C & PortoRio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2010. p. 472.

48. Bayram A, Özkur A, Erkilic S. Prevalence of human cytomegalovirus co-infection in patients with chronic viral hepatitis B and C: a comparison of clinical and histological aspects. Journal of Clinical Virology. 2009;43(1):212–7.

49. Spano L., Ferreira MS., Almeida M., Nascimento J., Leite JP. HCMV gB genotypes in cervical secretion and placenta tissues in the state of Espírito Santo, southeastearn Brazil. Brazil J Microbiol. 2007;38(1):424–9.

50. Pinto A., Baggio HC., Guedes G. Sexually-transmitted viral disease in women: clinical an epidemiological aspects and advances in laboratory diagnosis. Pinto, AP; Baggio, HCC; Guedes, GB. 2005;9(3):241–50.

51. Doobar J. The papillomavirus life cycle. Journal of Clinical Virology. 2005;32(1):7–15.

52. Lundqvist M, Westin C, Lundqvist O, Simberg N, Strand A, Adersson S. Cytologic screening and human papilloma virus test in women undergoing artificial fertilization. Acta Obstet Gynecol Scand. 2002;81(1):949–53.

53. Olatunbosun O, Deneer H, Pierson R. Human papillomavirus DNA detection in sperm using polymerase chain reaction. Obstet Gynecol. 2001;97(1):357–60.

54. Rosenblatt C, Delgado Filho, Delgado D, Delgado F. Infertilidade Masculina - Novos Conceitos. Prática hospitalar. 2010;1(71):85–92.

55. Kussler AP, Coitinho AS. Técnicas de reprodução assistida no tratamento da infertilidade. Revista Brasileira de Análises Clínicas. 2008;40(4):313–5.

56. López-villaverde V, Pinto G, Correia S, Pinto S, Simões T, Alves S, et al. Influência de alguns fatores de prognóstico nos resultados obtidos após 567 ciclos de Fecundação In Vitro consecutivos. Revista Iberoamericana de Fertilidad. 2010;27(6):499–510.

57. Cottell E, Lennon B, McMorrow J, Barry-Kinsella C, Harrison R. Processing of semen in an antibiotic-rich culture medium to minimize microbial presence during in vitro fertilization. Fertil Steril. 1997;1(67):98–103.

CONSIDERAÇÕES FINAIS DA TESE

Após a avaliação de 278 ciclos de reprodução assistida no LabRep/HC/UFG, foi possível observar que não houve diferenças siginificativas quanto a sucesso na produção e qualidade de embriões e taxa de sucesso de gravidez, antes das adequações estrututurais, quando era classificado como laboratório de reprodução humana convencional e após as adequaçãos, quando passou a ser classificado como um laboratório de reprodução humana ISO 5/7.

Quanto a contaminação das placas pós cultivo de embriões, não foi encontrada nenhuma placa contaminada no Laboratório ISO 5/7. Isso mostra que o Laboratório ISO 5/7 é livre de contaminação e que a aplicação do controle de qualidade tem tido sucesso.

Quanto aos fatores de risco com capacidade de interferir no sucesso de gravidez, foi encontrado relação com a idade avançada (mais de 40 anos), tempo de infertilidade, espessura do endométrio inferior a 10 mm. Essa informações mostram que a população atendida no LabRep/HC/UFG é heterogênea e exige que o laboratório promova uma evolução contínua e permanente.

Embora os resultados do Laboratório ISO 5/7 analizados no período, não demonstrem grande evolução em relação ao laboratório convencional, é possível inferir, após avaliação de resultados semelhantes em outras partes do mundo, por outros pesquisadores, haver uma necessidade de uma avaliação temporal maior. Acredita-se que haverá uma melhora gradual das taxas de produção de embriões, qualidade embrionária e sucesso de gravidez mesmo com os fatores que contribuem constantemente para o insucesso das técnicas de reprodução humana assistida.

REFERÊNCIAS

ABREU, L. G. DE; SANTANA, L. F.; NAVARRO, P. A. DE A. S. A taxa de gestação em mulheres submetidas a técnicas de reprodução assistida é menor a partir dos 30 anos. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 28, n. 1, p. 32–37, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032006000100006&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

AGGELIS, A.; FAÚNDES, D.; MATTOS, A. Associação entre morfologia do ovócito e taxa de fertilização após ICSI. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 28, n. 4, p. 2–8, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-72032006000400003&script=sci_abstract&tlng=pt>.

ALDRIGHI, J. M. Endocrinologia Ginecológica: Aspéctos Contemporâneos. 1st ed. São Paulo, 2006.

ANTUNES, R. N. A. A imagem corporal na infertilidade: a infertilidade feminina, 2013. Universidade do Porto. Disponível em: <https://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/72929>.

ANVISA. Resolução RDC nº 33, 17/02/2006. , 2006. Disponível em: <http://adcon.rn.gov.br/ACERVO/Suvisa/doc/DOC000000000025025.PDF>.

ANVISA. RDC 23. , 2011. Brasilia: Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 30 de maio de 2011. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d3f7c4804986e29a8e51ff4ed75891ae/RDC_23_2011.pdf?MOD=AJPERES>.

ANVISA. 8º Relatório do Sistema Nacional de Produção de Embriões Agência., 2015. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/9cddb8004840da35a438a5bdc15bfe28/sisembrio8.pdf?MOD=AJPERES>.

APROBATO, M. S. SOFTWARE SISFERT versão 2.0. , 2013.

BELLVE, J.; AYLLÓN, Y.; FERRANDO, M.; et al. Female obesity impairs in vitro fertilization outcome without affecting embryo quality. **Fertil SterilSteril.**, v. 93, n. 2, p. 447–454, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19171335>.

BENTO, F.; ESTEVES, S.; AGARWAL, A. Quality Management in ART **Clinics**. 2013.

BOONE, W.; JOHNSON, J.; LOCKE, A.; CRANE IV, M.; PRICE, T. Control of air quality in an assisted reproductiv e technology laboratory. **Fertil Steril**, v. 71, n. 1, p. 150–154, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9935133>.

BOONE, W.; JOHNSON, J.; LOCKE, A.; CRANE, M.; PRICE, T. Control of air quality in an assisted reproductive technology laboratory. **Fertility and Sterility**, v. 71, n. 1, p. 1–12, 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9935133>.

BRASIL. Coordenação de Controle de Infecção Hospitalar. Manual de Controle de Infecção Hospitalar. , 1985. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/aula_SINAIS.pdf>.

BUSHNIK, T.; COOK, J.; YUZPE, A.; TOUGH, S.; COLLINS, J. Estimating the prevalence of infertility in Canada. **Hum Reprod**, v. 27, n. 3, p. 738–746, 2011. Disponível em: <http://humrep.oxfordjournals.org/content/early/2012/01/17/humrep.der465.full>.

BUSSO, N.; BUSSO, C.; TSO, L. Fertilização in vitro com injeção intracitoplasmática de espermatozóide em ciclos naturais. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 29, n. 7, p. 340–346, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbgo/v29n7/a03v29n7.pdf>.

CAETANO, J. P. J.; COTA, A. M. D. M.; SOUSA, É. B. A. DE. Comparação entre três esquemas de indução da ovulação para inseminação intra-uterina com relação à espessura endometrial e taxa de gravidez. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 1, p. 7–11, 2005.

CANÇADO, M. L. Propedêutica do casal infértil. In: Ginecologia e obstetrícia – Manual para consursos/TEGO**.** 4th ed. Rio de Janeiro, 2007.

CHEN, A. .; TAN, L.; SURAJ, V.; PERA, R.RSHEN, S. Biomarkers identified with time-lapse imaging: discovery, validation, and practical application. **Fertility and sterility**, v. 99, p. 1035–1043, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23499001>.

CIOTTI, P.; NOTARANGELO, L.; MORSELLI-LABATE, A. First polar body morphology before ICSI is not related to embryo quality or pregnancy rate. **Hum Reprod.**, v. 19, n. 10, p. 2334–9, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15347596>.

COCUZZA, M. Avaliação do impacto da varicocele clínica no volume testicular , parâmetros seminais e níveis de radicais livres de oxigênio no sêmen de homens com fertilidade comprovada, 2011. Universidade de São Paulo. Disponível em: <file:///D:/Usuários/Marcos/Downloads/MarceloAntonioSignorelliCocuzza.pdf>.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA. RESOLUÇÃO CFM n^{o} 2.121/2015. , 2015. Disponível em: <http://www.portalmedico.org.br/resolucoes/CFM/2015/2121_2015.pdf>.

CORNEL, C. A. Guideline de Reprodução Assistida. , , n. 3. Disponível em: <http://www.sbrh.org.br/sbrh_novo/guidelines/guideline_pdf/guideline_reproducao_ assistida.pdf>.

COZMAN, C. Análise do uso do EPI máscara facial filtrante para proteção contra agentes biológicos transmitidos por bioaerossóis em relação ao uso da máscara cirúrgica. [Monografia], 2011. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Disponível em: <https://www.yumpu.com/pt/document/view/7179819/analise-do-uso-do-epi-mascara-facial-filtrante-fundacentro>.

CUNHA, A. C. R. DA; WANDERLEY, M. D. S.; GARRAFA, V. Fatores associados ao futuro reprodutivo de mulheres desejosas de gestação após ligadura tubária. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 5, p. 230–234, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032007000500002>.

DEPA-MARTYNOW, M. JEDRZEJCZAK, P.; PAWELCZYK, L. Pronuclear scoring as a predictor of embryo quality in in vitro fertilization program. **Folia Histochem Cytobiol.**, v. 47, n. Suppl 1, p. S85–89, 2007. Disponível em: <www.researchgate.net/publication/5559094_Pronuclear_scoring_as_a_predictor_of_embryo_quality_in_in_vitro_fertilization_program>.

DOUGLAS, T. The genetics of males infertility. **New Jersey:Humana Press**, v. 1, n. 1, p. 99, 2007.

DZIK, A.; PEREIRA, D. H. M.; FREITAS, G. C.; CAVAGNA, M.; AMARAL, W. N. DO. **Tratado de Reprodução Assistida**. 3rd ed. São Paulo: Farma Editores Ltda, 2014.

EICKHOFF, T. C. Airborne Nosocomial Infection: a contemporary perspective. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 15, n. 10, p. 663– 672, 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7844338>.

ESFANDIARI, N.; RYAN, E. A.; GOTLIEB, L.; CASPER, R. F. Successful pregnancy following transfer of embryos from oocytes with abnormal zona pellucida and cytoplasm morphology. **Reproductive biomedicine online**, v. 11, n. 5, p. 620–623, 2005. Reproductive Healthcare Ltd, Duck End Farm, Dry Drayton, Cambridge CB23 8DB, UK. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61171-6>.

ESFANDIARI, N.; RYAN, E.; GOTLIEB, L.; CASPER, R. Case report Successful pregnancy following transfer of embryos from oocytes with abnormal zona pellucida and cytoplasm morphology. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 11, n. 5, p. 620–623, 2005. Reproductive Healthcare Ltd, Duck End Farm, Dry Drayton, Cambridge CB23 8DB, UK.

ESTEVES, S. Sala limpa Classe 100 / ISO 5 : Condição sine qua non nos laboratórios de reprodução assistida ? **Saúde sexual e reprodutiva**, v. 3, n. 4, p. 1–2, 2007.

ESTEVES, S. Air quality control in reproductive laboratories. **Academy of Clinical Embryologists**, v. 2, n. 1, p. 1–5, 2012.

ESTEVES, S. C. Male Infertility and Assisted Reproductive Technology: Lessons from the IVF. **The Open Reproductive Science Journal**, v. 3, n. 1, p. 138–153, 2011. Disponível em: <http://www.androfert.com.br/site/documento_213_0__male-infertility-and-assisted-reproductive-technology:-lessons-from-the-ivf.html>.

ESTEVES, S. C. Efficacy, efficiency and effectiveness of gonadotropin therapy for infertility treatment. **Medical Express**, v. 2, n. 3, p. 1–11, 2015. Disponível em: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/MedicalExpress.2015.03.02>.

ESTEVES, S. C.; BENTO, F. C. Implementation of air quality control in reproductive laboratories in full compliance with the brazilian cells and germinative tissue directive. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 26, n. 1, p. 9–21, 2013.

ESTEVES, S. C.; BENTO, F. C. Air quality control in the ART laboratory is a major determinant of IVF success. **Asian Journal of Andrology**, v. 18, p. 1–4, 2015. Disponível em: <http://www.ajandrology.com/preprintarticle.asp?id=166433>.

FERNANDES, L. B.; ARRUDA, J. T.; APPROBATO, M. S.; GARCÍA-ZAPATA, M. T. A. Infecção por Chlamydia trachomatis e Neisseria gonorrhoeae: fatores associados à infertilidade em mulheres atendidas em um serviço público de reprodução humana. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 36, n. 8, p. 353–358, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032014000800353&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>. .

FERNANDEZ, E.; ZEGERS, F.; HESS, R.; et al. Transferencia intratubaria de gametos (TITG, GIFT): comunicación del primer embarazo. ; 50(5): **Rev Chil Obstet Ginecol**, v. 50, n. 5, p. 356–3 62, 1985.

FOIZER, B. R. R.; AMARAL, W. N. D; SADOYAMA, G. Investigação bacteriológica e micológica de placas de cultivo de embriões em laboratório de reprodução humana. **Reprodução & Climatério**, v. 26, n. 1, p. 12–18, 2010. Disponível em: <http://www.sbrh.org.br/sbrh_novo/restrito/revista/2011_jan_mar_12-18.pdf>.

FOIZER, B. R. R.; SILVA, K. R. DA; VIEIRA, J. D. G.; AMARAL, W. N. DO. Contaminação microbiológica em laboratório de reprodução humana e suas implicações no sucesso da reprodução assistida. **Reprodução & Climatério**, v. 29, n. 2, p. 66–70, 2014. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1413208714000430>.

FREITAS, M. DE; SIQUEIRA, A. A.; SEGRE, C. A. Avanços em reprodução assistida. **REVISTA BRASILEIRA DE DESENVOLV HUM.**, v. 18, n. 1, p. 93–97, 2008. Disponível em: <http://pepsic.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-12822008000100012>.

GILCHRIST, R.; LANE, M.; THOMPSON, J. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. **Human Reprod Update.**, v. 14, n. 2, p. 159–77, 2008. Disponível em: <http://humupd.oxfordjournals.org/content/14/2/159.short>.

GOMES, L. M. O.; CANHA, A. D. S.; DZIK, A.; et al. A idade como fator prognóstico nos ciclos de fertilização in vitro. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 31, n. 5, p. 230–234, 2009. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Artur_Dzik/publication/26730602_The_age_as_a_predictive_factor_in_in_vitro_fertilization_cycles/links/541bfa3d0cf241a65a0ba6db.pdf>.

GONTIJO, É. E. L.; APPROBATO, M. S. Relationship between biochemical , environmental , and microbiological changes with the success rate of fertilization techniques. **JBRA Assisted Reproduction**, v. 17, n. 6, p. 357–358, 2013. Disponível em: <http://www.jbra.com.br/media/html/Erica.html>.

GOUVEIA, A. DA S. A esterilidade feminina, 1907. Escola Medico Cirurgica do Porto. Disponível em: <http://biblioteca.versila.com/2700227/breve-estudo-sobre-a-esterilidade-feminina>.

GRACIANO, J. L. Injeção Intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), 2014. Universidade de Brasília (UNB). Disponível em: <http://bdm.unb.br/bitstream/10483/8735/1/2014_JulianeLuizGraciano.pdf>.

GRADVOHL, S. M. O.; OSIS, M. J. D.; MAKUCH, M. Y. Características de homens e mulheres que buscam tratamento para infertilidade em serviço público de saúde. **Reprodução & Climatério**, v. 28, n. 1, p. 18–23, 2013. Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1413208713000186>.

HAMADA, A.; ESTEVES, S.; AGARWALL, A. Unexplaied male infertility: potential causes and management 1: 2-16, 2011. **Hum Androl**, v. 1, n. 1, p. 2–16, 2011. Disponível em: <http://www.androfert.com.br/img/File/Artigos/Unexplained male infertility potential causes and management.pdf>.

HEITMANN, R.; HILL, M.; JAMES, A.; SCHIMMEL, T.; SEGARS, J. Live births achieved via IVF are increased by improvements in air quality and laboratory environment. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 31, p. 364–371, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26194882>.

HSU, A.; ARNY, M.; KNEE, A. B.; et al. Antral follicle count in clinical practice: analyzing clinical relevance. 2011;95(2):474-9. **Fertil Steril.**, v. 95, n. 2, p. 474–479, 2011.

IGREJA, J. I. Influência da Idade da Mulher na Escolha da Técnica de Reprodução Medicamente Assistida. , 2011. Disponível em: <Influ?ncia da Idade da Mulher na Escolha da T?cnica de Reprodu??o Medicamente Assistida Influ?ncia da Idade da Mulher na Escolha da T?cnica de Reprodu??o Medicamente Assistida>.

IZZO, C. R. Infertilidade de causa hormonal para o ginecologista. **Boletim da SBRH**, v. 6, n. 2, p. 1–3, 2008. Disponível em: <http://docplayer.com.br/9191103-Infertilidade-de-causa-hormonal-para-o-ginecologista.html>.

JAYARAKASAN, K.; CHAN, Y.; ISLAM, R.; *et al*. Prediction of *in vitro* fertilization outcome at different antral follicle count thresholds in a prospective cohort of 1,012 women. **Fertil Steril**, v. 98, n. 3, p. 657–63, 2012.

JOHNSON, J.; BOONE, W.; BERNARD, R. The effects of volatile compounds (VC) on the outcome of in vitro mouse embryo culture. **Fertil Steril**, v. Suppl 1, n. 1, p. 98 –9., 1993.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12.ª ed. Rio de Janeiro, 2013.

KAHRAMAN, S.; YAKIN, K.; DONMEZ, E. Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. **Hum Reprod.**, v. 15, n. 11, 2000. Disponível em: <https://humrep.oxfordjournals.org/content/15/11/2390.full>.

KASTROP, P.M.M.; GRAAF-MILTENBURG L.A.M.; GUTKNECHT D.R.; SJERP M. Microbial contamination of embrio cultures in an ART laboratory: sourses and management. **Hum Reprod.**, v. 22, n. 1, p. 2243–2248, 2007. Disponível em: <http://humrep.oxfordjournals.org/content/22/8/2243.short>.

KIM, B.; ANOWER JABED, M.; KANG, S.; et al. Effects of spermatozoa during in vitro meiosis progression in the porcine germinal vesicle oocytes. **Anim Reprod Sci**, v. 104, n. 1, p. 83–92, 2008. Disponível em: <http://www.animalreproductionscience.com/article/S0378-4320(07)00026-7/abstract?cc=y=>.

KLIPSTEIN, S.; REGAN, M.; RYLEY, D.; et al. One last chance for pregnancy: a review of 2,705 in vitro fertilization cycles initiated in women age 40 years and above. **Fertil Steril**, v. 84, n. 2, p. 435–445, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16084887>.

KYROU, I.; TSIGOS, C. Chronic stress, visceral obesity and gonadal dysfunction. **Hormones (Athens)**, v. 7, n. 4, p. 287–293, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19121989>.

MACEDO, L. C.; FONSECA, R. P. Varicocele: A Principal Causa da Infertilidade Masculina. **Saúde e Pesquisa**, v. 8, n. 1, p. 167, 2015. Disponível em: <http://periodicos.unicesumar.edu.br/index.php/saudpesq/article/view/2985>.

MADRID, I. M.; XAVIER, M. O.; MATTEI, A. S.; et al. Role of melanin in the pathogenesis of cutaneous sporotrichosis. **Microbes and Infection.**, v. 12, n. 1, p. 162–165, 2010. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457909002378>.

MAHESHWARI, A.; STOFBERG, L.; BHATTACHARYA, S. Effect of overweight and obesity on assisted reproductive technology – a systematic review. **Hum Reprod Update**, v. 13, n. 5, p. 433–44, 2007. Disponível em: <https://humupd.oxfordjournals.org/content/13/5/433.full>.

MARTINUZZI, K.; RYAN, S.; LUNA, M.; COPPERMAN, A. Elevated body mass index (BMI) does not adversely affect in vitro fertilization outcomes in young women. **J Assist Reprod Genet**, v. 25, n. 5, p. 169–75, 2008. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10815-008-9213-6>.

MATOS, L. F. Produção *in vitro* de embriões bovinos por meio da injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI)the effects of brief mindfulness intervention on acute pain experience: an examination of individual difference, 2004. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Disponível em: <http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/PGANIMAL_3898_1170089719.pdf>.

MENDES, A. I. G.; SILVA, M. S. E.; AMARAL, W. N. DO; CASTRO, E. C. DE. Confiabilidade da contagem de folículos antrais com o uso de ultrassom bidimensional e tridimensional: uma revisão sistemática. **Reprodução & Climatério**, v. 29, n. 2, p. 48–53, 2014. Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1413208714000399>.

MORAES, P. F.; GIGANTE, L. P.; FERRARI, A. N.; MATTOS, A. L. G. Evolução de casais inférteis por um período de até 10 anos. **Revista AMRIGS**, v. 48, n. 4, p. 230–234, 2015. Disponível em: <http://www.amrigs.org.br/revista/48-04/1599.pdf>.

MORTIMER, D. A critical assessment of the impact of the European Union Tissues and Cells Directive (2004) on laboratory practices in assisted conception. **Reprod Biomed Online**, v. 11, n. 1, p. 162–176, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16168210>.

MOURA, M.; SOUZA, M.; SCHEFFER, B. Reprodução assistida . Um pouco de história. **Revista da Sociedade Brasileira de Psicologia Hospitalar**, v. 12, n. 2, p. 23–42, 2009. Disponível em: <http://pepsic.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-08582009000200004>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Planejamento Familiar (2011). , 2011. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2011/09/planejamento-familiar>.

MUNCH, E.; SPARKS, A.; DURAN, H.; VOORHIS, B. VAN. Lack of carbon air filtration impacts early embryo development. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 32, p. 1009–1017, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26003657>.

MUST, A.; DALLAL, G.; DIETZ, W. Reference data for obesity: 85th and 95th percentiles of body mass index (wt/ht2) and triceps skinfold thickness. **Am J**

Clin Nutr, v. 53, n. 1, p. 839–46, 1991. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2008861>.

NUNES, S. R. T. O aconselhamento genético no âmbito da procriação Medicamente assistiva da bioética, 2007. Universidade do Porto. Disponível em: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/22156/3/Microsoft Word O aconselhamento gentico em procriao medicamente assistida perspectiva da biotica.pdf>.

ORVIETO, R.; NAHUM, R.; MELTCER, S.; et al. Ovarian stimulation in polycystic ovary syndrome patients: the role of body mass index. **Reprod Biomed Online**, v. 18, n. 3, p. 333–6, 2009. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472648310600909>.

PALERMO, G.; JORIS, H.; DEVROEY, P.; VANSTEIRTEGEHM, A. Pregnancies after intracitoplasmatic injection of single spermatozoon into oocyte. **Lancet**, v. 340, n. 8810, p. 17–19, 1992. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1351601>.

PASQUALI, R. Obesity, fat distribution and infertility. **Maturitas**, v. 54, n. 4, p. 363–371, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16725287>.

PASQUALI, R.; PATTON, L.; GAMBINERI, A. Obesity and infertility. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.**, v. 14, n. 6, p. 482–7, 2007. Disponível em: <http://journals.lww.com/co-endocrinology/Abstract/2007/12000/Obesity_and_infertility.11.aspx>.

PASQUALOTTO, E.; PASQUALOTTO, F. Espermograma e testes de função espermática. **Femina**, v. 2, n. 34, p. 91–98, 2006. Disponível em: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=434313&i>.

PAVAN, J. N.; AARESTRUP, J. R.; BERTOLDI, C. Reprodução assistida: Uma pesquisa junto aos profissionais da área. **Revista brasileira de educação e saúde**, v. 3, n. 3, p. 31–36, 2013. Disponível em: <http://www.gvaa.com.br/revista/index.php/REBES/article/view/2342>.

PEREIRA, D. A história da reprodução humana no Brasil. **Femina**, v. 39, n. 2, p. 59–64, 2011. Disponível em: <http://files.bvs.br/upload/S/0100-7254/2011/v39n2/a2450.pdf>.

PETER, M.; GRAAF-MILTENBURG, L.; GUTKNECHT, D.; SJERP, M. Microbial contamination of embryo cultures in an ART laboratory: sources and management. **Hum Reprod**, v. 22, n. 8, p. 2243–8, 2007. Disponível em: <http://humrep.oxfordjournals.org/content/22/8/2243.short>.

PORTO, A. L. A. Novos aspectos do hipogonadismo gonadotrófico seletivo: Avaliação da esteroidogênese gonodal na deficiência de FSH e análise do gene LHB na deficiência, 2007. Universidade de Brasília – UnB. Disponível em: <http://repositorio.unb.br/handle/10482/1062>.

PROTO, I. A. C.; CARNEIRO, J. D. M.; PASSOS, X. S.; ATAÍDES, F. S.; AMARAL, W. N. DO. Prevalência de Chlamydia trachomatis em mulheres submetidas à fertilização assistida em Goiânia. **Reprodução & Climatério**, v. 28, n. 3, p. 108–111, 2013. Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1413208714000053>.

RAMIREZ-GALVEZ, M. Reprodução assistida, consumo de tecnologia, deslocamento e exclusões. **Cienc. Cult**, v. 60, n. 1, p. 39–41, 2008. Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?pid=S0009-67252008000100016&script=sci_arttext>.

ROBKER, R.; AKISON, L.; BENNETT, B.; et al. Obese women exhibit differences in ovarian metabolites, hormones, and gene expression compared to moderate weight women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, n. 5, p. 1533–1540, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19223519>.

SILVA, J. M. R. D. S. E. **Reprodução assistida entre mulheres homossexuais**, 2011. Universidade Federal da Bahia. Disponível em: <repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/9301>.

SILVEIRA, C. F.; COUTINHO, L. M. D. A.; AMARAL, W. N. DE; CASTRO, E. C. DE. A contagem dos folículos antrais na predição de resultados em ciclos de fertilização in vitro: uma revisão sistemática. **Reproducao e Climaterio**, v. 28, n. 2, p. 68–73, 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S141320871300054X>.

SINGH, K.; JAISWAL, D. Human male infertility: a complex multifactorial phenotype. **Reprod Sci**, v. 18, n. 1, p. 418–425, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21421900>.

SOUZA, K.; FORTUNA, J. Microrganismos em ambientes climatizados de consultórios odontológicos em uma cidade do extremo sul da Bahia. **Rev. Baiana de Saúde Pública**, v. 35, n. 2, p. 250–263, 2011. Disponível em: <http://inseer.ibict.br/rbsp/index.php/rbsp/article/view/301>.

SOUZA, M. DO C. B. DE; MANCEBO, A. C. A.; SANTOS, H. C. N.; et al. Fatores Ambientais e Reprodução: Metais (chumbo e cádmio). Fundamentação da pesquisa. **JBRA Assist. Reprod.**, v. 14, n. 4, p. 38–42, 2010.

SPEROFF, L.; FRITZ, M. A. Female infertility. In: Clinical gynecologic endocrinology and infertility. 9th ed. Philadelphia: Lippincott, 2013.

STEPTOE, P.; EDWARDS, R. Birth after reimplantation of human embryo. **Lancet**, v. 2, n. 8085, p. 366, 1978a.

STEPTOE, P.; EDWARDS, R. Birth after the implantation of human embryo. **Lancet**, v. 12, n. 8085, p. 366, 1978b.

TEIXEIRA, D.; BRIONIZIO, J.; PEREIRA, L. Síndrome dos edifícios doentes

em recintos com ventilação e climatização artificiais: revisão de literatura. **Ver. Analytica.**, v. 6, n. VII, p. 07–08, 2010. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10926/347>.

TEN, J.; MENDIOLA, J.; VIOQUE, J.; JUAN, J.; BERNABEU, R. Donor oocyte dysmorphisms and their influence on fertilization and embryo quality. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 14, n. 1, p. 38–46, 2007.

THUM, M.; EL-SHEIKHAH, A.; FARIS, R. The influence of body mass index to in-vitro fertilisation treatment outcomes, risk of miscarriage and pregnancy outcomes. **J Obstet Gynaecol**, v. 27, n. 7, p. 699–702, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17999296>.

VILARINO, F. L.; BIANCO, B.; CHRISTOFOLINI, D. M.; BARBOSA, C. P. O impacto do índice de massa corpórea nos resultados de fertilização in vitro. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 32, n. 11, p. 536–540, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbgo/v32n11/v32n11a04.pdf>.

WHO. Global status report on non communicable diseases 2010. , 2010. Geneva: World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report_full_en.pdf>.

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A.; MCWHIR, J.; KIND, A.; CAMPBELL, K. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v. 385, n. 1, p. 810– 813, 1997. Disponível em: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/clo.2006.0002?journalCode=clo>.

YU, L. P.; YUNG-MING, L. Y. Genetic diagnosis in male infertility. **Urol Sci**, v. 21, n. 2, p. 75–80, 2010. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1879522610600164>.

ANEXOS

ANEXO 1 – Protocolos e Procedimentos realizados no LabRep

Após as mulheres serem encaminhadas e triadas quanto ao seu histórico de saúde e reprodutivo, é definido se serão submetidas a técnicas de alta ou baixa complexidade de reprodução. As que são submetidas as técnicas de ICSI, FIV ou IIU, são submetidas a estimulação ovariana, por esquemas hormonais apropriados. As mulheres submetidas a ICSI e FIV, possuem seus oócitos coletados, preparados e classificados, em seguida é feita a coleta espermática dos parceiros que é preparado na sequência. Posteriormente é realizado a fertilização, quando ocorre a formação embrião, este é classificado no 3º dia e é feito a transferência embrionária até o 5º dia, após é feito o teste de gravidez no 14º dia.

Estimulação ovariana

Em todos os ciclos iniciados a estimulação realizada para o amadurecimento folicular é implementada com gonadotrofinas e sempre sob bloqueio gonadotrófico hipofisário. O bloqueio gonadotrófico faz-se mediante a administração de agonistas ou antagonistas. Para o esquemas com agonistas utiliza-se Lupron® iniciada no primeiro dia do ciclo e estimulação ovariana com 150UI/dia de r-FSH (Gonal-F® alfa-folitropina, Serono) e r-hCG (250 µgOvidrel®alfacoriogonadotropina) para maturação folicular, e para o esquemas com antagonistas (estimulação ovariana com citrato de clomifeno, antagonista do GnRH (0,25 mg/dia Cetrotide® acetato de cetrorelix; Serono) iniciado no final da fase folicular e r-hCG (250µg Ovidrel® alfacoriogonadotropina, Serono) para maturação folicular .

Punção folicular

A punção dos folículos é realizada dentro do centro cirúrgico, de 35 a 36 horas após a administração do hormônio gonadotrofina coriônica. A punção dos ovários é feita pelo médico, guiado por um ultrasson. Ele consiste na introdução através vagina, de uma agulha muito fina, permitindo assim, a coletar óvulos de cada um dos ovários. Esta operação é realizada sob sedação e dura cerca de 15 minutos. Os oócitos são colocados dentro dos tubos falcon contendo meio buffer Dulbeco suplementado com antibióticos ou meio HTF modificado. Após o término do procedimento, a paciente é colocada na sala de recuperação, onde permanece sob monitoração constante, cerca de 1 hora para recuperação. O líquido contendo os folículos coletados é transferido para o laboratório para a identificação. Depois que recebem o tubo falcon contendo o líquido folicular aspirado, é depositado em uma ou duas placas de 60x15mm. O líquido folicular é analisado, com microscópio quanto à presença de complexos cúmulo-oócitos. Estes são lavados de 2 a 3 vezes no compartimento marginal e transferido o complexos cúmulo-oócitos ao compartimento central da placa. Em cada uma das placas é armazenado até 5 complexos cúmulo-oócitos. Essas placas são mantidas nas incubadoras, com temperaturas de 37ºC. Antes da inseminação eles são avaliados e classificados de acordo com o aspecto morfológico do cúmulo e corona radiata.

Preparação seminal

A amostra de sêmen é coletada por masturbação ou por punção, após obtida a amostra, espera-se a sua liquefacção. A técnica utilizada na preparação seminal é o swim-up, que tem por finalidade retirar todo o material amorfo, células esfoliativas, espermatozoides mortos, imóveis e aqueles sem velocidade de progressão direcional. Ao final, obtém-se uma amostra limpa contendo espermatozoides que exibem excelente motilidade.

Fertilização *in vitro*

Os complexos cúmulo-oócitos são inseminados com uma concentração calculada de espermatozoides móveis, com o intuito de obter uma concentração entre 50-100.000/ml. Porém concentrações de 25-1.000.000/ml também são utilizadas sem grandes diferenças nas taxas de fertilização.

Antes de iniciar o procedimento, deve-se preparar as placas de poço duplo, depositando 2ml de meio de cultura no compartimento marginal e 1 ml no compartimento central. Essas placas são preparadas pelo menos 3 horas antes da inseminação, ou preparadas no dia anterior, com a finalidade de permitir que o meio de cultura se equilibre à temperatura e tensão de CO_2 da incubadora. São colocados 1 ou 2 oócitos por placa para serem inseminados. Com um auxílio de uma pipeta automática, são inseminados 50 a 10 mil espermatozoides por ml de meio de cultura. É conveniente que o volume do meio de cultura contendo os espermatozoides não seja superior a 10µl. As placas de inseminação devem ser incubadas 15 a 18 horas, a 37ºC e CO_2 a 5%. Após este período observar a presença de 2 pronúcleos e 2 corpúsculos polares, para verificar a fertilização.

Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides

Duas a quatro horas após a punção, é realizada a retirada da corona radiata e do cúmulus oóforo, prepara-se uma placa com uma gota central de hialuronidase com várias gotas periféricas de H-HTF+15%SSS para realizar as lavagens. Os oócitos são transferidos, com pipeta de Pasteur estéril, desde a gota de meio de cultura até a hialuronidase, tranferindo a menor quantidade possível de meio de cultura para não diluir a enzima. Com a mesma pipeta Pasteur, aspirar e soltar os oócitos com certa pressão para a liberação das células do cúmulos e da granulosa. Evitando a formação de bolhas. Logo após 10 segundos aproximadamente, retiram-se os oócitos transferindo-os para uma gota de H-HTF+15%SSS. Uma vez que os oócitos foram desnudados corretamente, são guardados em incubadoras por alguns minutos para a sua recuperação antes de injetá-los. Coloca-se os oócitos na incubadora até o momento da injeção. Os oócitos são colocados dentro das microgotas da placa de injeção, adiciona-se os espermatozoides já processados e com a ajuda de um micomanipulador, introduz o espermatozoide dentro do óocito. Após 15-18 horas da ICSI, verifica-se a fertilização utilizando microscópio invertido (40X). Após isto, os zigotos sãotransferidos para um novo meio de cultura, posteriormente, eles são transferidos para incubadora de CO_2.

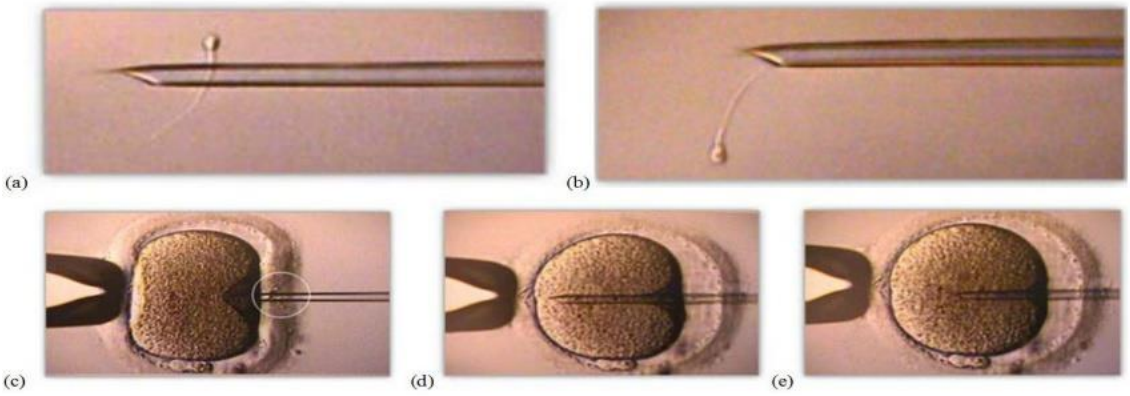


Figura 1: Fases da injeção intracitoplasmática de espermatozóides: (a) Imobilização do espermatozóide; (b) Introdução do espermatozóide pela cauda na micropipeta; (c) Penetração da micropipeta no óvulo; (d) Micropipeta com espermatozóide totalmente dentro do ovócito; (e) Injeção do espermatozóide e retirada da micropipeta. Disponível em: http://www.revistacontemporaneos.com.br/n9/dossie/reproducao-humana.pdf.

Desenvolvimento Embrionário

A avaliação da fertilização é realizada 15-19h após inseminação. Os oócitos corretamente fertilizados são transferidos individualmente para gotas com óleo mineral, de 0.025ml de meio de clivagem. Como critério utilizado para avaliar a qualidade embrionária, são considerados os seguintes parâmetros: presença de fragmentos citoplasmáticos anucleados e o tamanho relativo dos blastômeros.

Transferência embrionária

A transferência de embriões pode ser realizada ao útero ou às trompas. A transferência é realizada entre o terceiro e o quinto dia após inseminação. A decisão do número de embriões a transferir é tomada em equipe e está depende da: qualidade embrionária, idade da mulher, condição geral da mulher. Os melhores embriões são selecionados para transferência. Os embriões selecionados são colocados em uma placa de transferência de embriões (placa de poço duplo com meio de cultura de transferência), posteriormente, acopla-se uma seringa ao catéter de transferência. Os embriões são transferidos ao cateter. E por último realiza a transferência embrionária ao útero ou as trompas, essa transferência é realizada no centro cirúrgico, do próprio LabRep, guiado pelo ultrasson. Após a transferência a paciente fica na sala de recuperação, deitada por cerca de uma hora.

Diagnóstico de gravidez

Quatorze dias depois da transferência embrionária é realizado uma determinação de ßhCG no sangue periférico para verificar se obteve sucesso no tratamento (gravidez positiva- ßhCG +).

ANEXO 2 – Parecer Consubstanciado do comitê de ética

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - GO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: RELAÇÃO ENTRE ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS, AMBIENTAIS E MICROBIOLÓGICAS PÓS-CULTIVO DE EMBRIÕES SUBMETIDOS A FERTILIZAÇÃO IN VITRO EM UM LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA

Pesquisador: Érica Eugênio Lourenço Gontijo

Área Temática: Reprodução Humana (pesquisas que se ocupam com o funcionamento do aparelho reprodutor, procriação e fatores que afetam a saúde reprodutiva de humanos, sendo que nessas pesquisas serão considerados "participantes da pesquisa" todos os que forem afetados pelos procedimentos delas):
(Reprodução Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 31047413.0.0000.5078

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 768.619

Data da Relatoria: 28/08/2014

Apresentação do Projeto:

É um estudo do tipo caso controle. A primeira parte deste trabalho será do tipo retrospectivo, com abordagem descritiva de dados retirados de banco de dados de pacientes que se submeteram a algum procedimento no Laboratório de Reprodução Humana do hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, no período de janeiro de 2013 a dezembro de 2013, quando o atendimento era realizado nas antigas instalações do laboratório de

reprodução humana do Hospital das Clínicas de Goiânia.

A segunda parte desse trabalho será do tipo prospectivo, com abordagem descritiva de dados dos pacientes que procurarem o Laboratório de Reprodução Humana do hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, com o objetivo de se submeter a tratamento que facilitem a sua reprodução durante o período de maio de 2014 a abril de 2015, quando o tratamento será realizado nas novas instalações do laboratório do Hospital das Clínicas de Goiânia.

Projeto de pesquisa, onde a pesquisadora pretende avaliar os efeitos das alterações

microbiológicas, bioquímicas e ambientais nos métodos de reprodução assistida, desenvolvidos em um laboratório de reprodução humana. O projeto está bem definido e com embasamento teórico.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar os parâmetros reprodutivos e microbiológicos nas instalações antigas e novas do laboratório de reprodução humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (LABREP-HC-UFG) no período entre janeiro a dezembro de 2013 nas antigas instalações e no período entre maio de 2014 a abril de 2014 nas novas instalações, comparando os resultados obtidos nos dois períodos.

Objetivo Secundário:

• Descrever as taxas de sucesso da técnica de fertilização assistida, número de transferência de embriões e as taxas de gravidez para todos os FIV e ICSI atendidos durante o período de janeiro de 2013 a dezembro de 2013 (período em que o laboratório se encontrava nas instalações antigas) e entre maio de 2014 a abril de 2015 (período em que o laboratório se encontra nas novas instalações). • Descrever os dados clínicos dos pacientes atendidos no laboratório de reprodução humana. • Investigar a prevalência de contaminação microbiológica por bactérias e fungos, em placas de cultivo de embriões no laboratório de reprodução humana do hospital das clínicas no período no período entre maio de 2014 a abril de 2014 (período em que o laboratório se encontra nas novas instalações) e comparar com a contaminação das placas de cultivo das instalações antigas (avaliação realizada em pesquisa prévia e já publicada). • Identificar os organismos microbiológicos contaminantes, no nível de gênero e espécie, encontrados, encontrados nas placas de cultivo de embriões, em laboratório de reprodução humana.

Os objetivos estão claros. Porém os períodos e datas devem ser corrigidos para melhor entendimento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Esta pesquisa trará risco mínimo para os pacientes envolvidos. O risco em questão trata-se da possibilidade de quebra de sigilo de dados contidos nos documentos, porem devido ao compromisso firmado pelos pesquisadores envolvidos, esses documentos serão manuseados de forma cuidadosa e ética obedecendo a resolução 1638/2002 do Conselho Federal de Medicina que define o prontuário médico do paciente como instrumento sigiloso, legal e científico e assegura a responsabilidade do preenchimento, guarda e manuseio dos prontuários.

Os benefícios deste estudo consistem em fornecer dados que corroborem com o sucesso das técnicas de reprodução assistida.
Os riscos e benefícios descritos estão claros e atendem a Resolução 466/Conep.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
A pesquisa é relevante por abordar aspectos envolvendo reprodução assistida em humanos, tema de grande repercussão nos dias atuais.
Orçamento e cronograma adequados ao desenvolvimento do estudi.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
Todos os termos foram apresentados adequadamente. As alterações propostas em relação a primeira versão do TCLE foram acatadas e o cronograma atualizado.

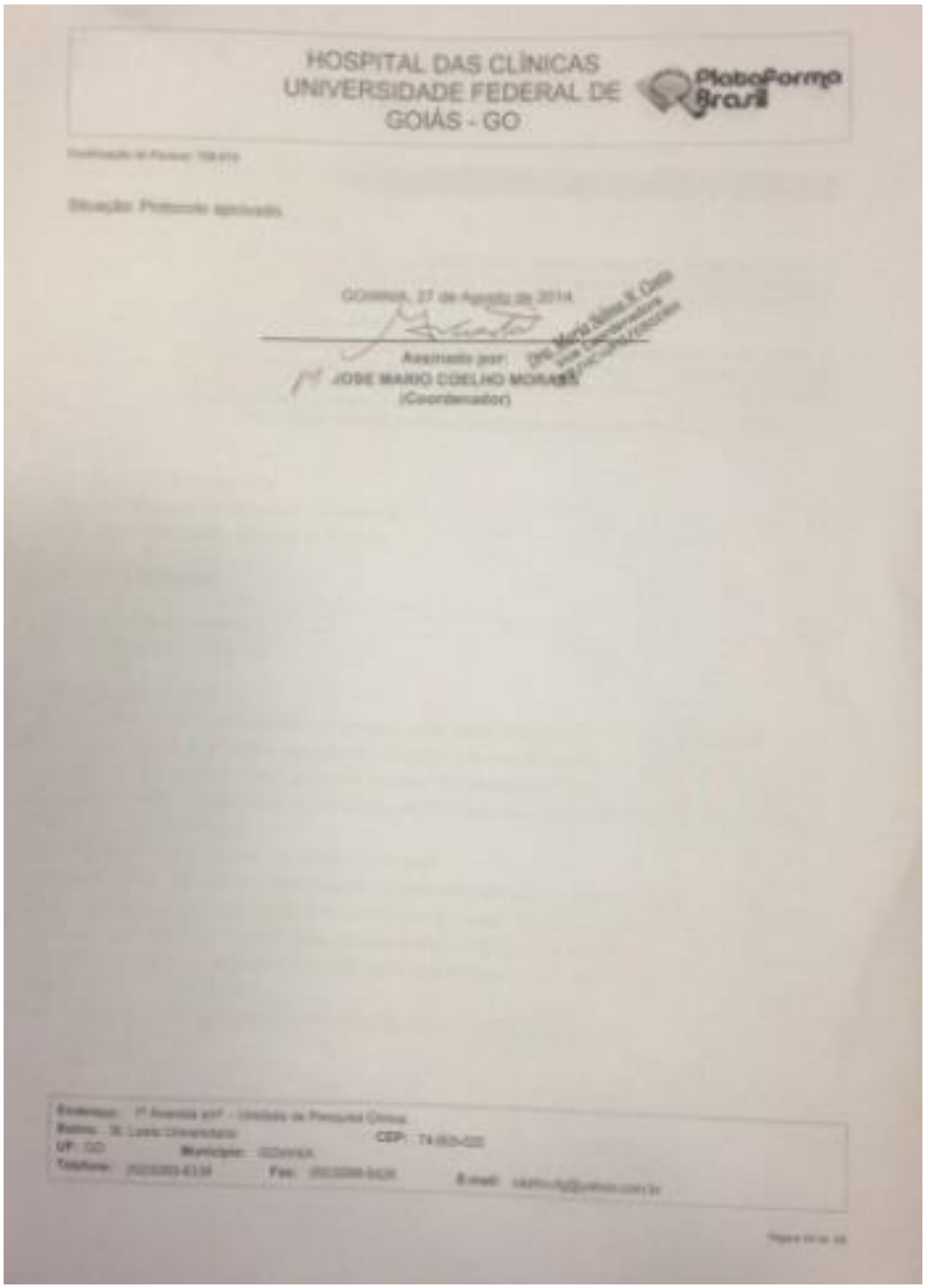
Recomendações:
Verificar e corrigir período descrito em objetivo secundário que diz: Investigar a prevalência de contaminação microbiológica por bactérias e fungos, em placas de cultivo de embriões no laboratório de reprodução humana do hospital das clínicas no período entre maio de 2014 a abril de 2014 (período em que o laboratório se encontra nas novas instalações). Ou seria: maio de 2014 e abril de 2015.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
Apenas a recomendação acima.

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

Considerações Finais a critério do CEP:
Diante do exposto, a Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas/UFG - CEP/HC/UFG, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.
Após início, o pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEP/HC/UFG, via Plataforma Brasil, relatórios trimestrais/semestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusões e publicações.
O CEP/HC/UFG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 466/12 e suas complementares.



HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - GO

PlataForma Brasil

Situação: Protocolo aprovado.

GOIÂNIA, 27 de Agosto de 2014

Assinado por:
JOSE MARIO COELHO MORAES
(Coordenador)

ANEXO 3 – Formulário para coleta de dados

Nome:				**N. prontuário**	
Idade		**Sexo**	**M**		**F**

Tipo de infertilidade						
Primária	Secundária	Masculina	Ovulatória	Tubária	Imunológica	Uterina

Pré-indução					
FSH	LH	Prolactina	Estradiol	TSH	Clamídia

Número de folículo aspirado		Número de oócito captado	
Número de oócito inseminado		Numero de oócito injetado	
Numero de oócito fertilizado		Características dos óvulos	
Número de embriões classificados e transferidos.			

N. folículos previsto no dia do HCG	Menor que 16mm	16-25mm	Maior 25mm

Tipo de tratamento	

Transferência		
N. embriões classificados	Congelação	Embriões transferidos

Pós-Transferência				
Manutenção da fase lútea	Dosagem de BHCG	USG-5 semanas	USG-7 semanas	USG-12 semanas

Sucesso no tratamento	
SIM	NÃO

HISTÓRIA DA INFERTILIDADE

Tipo de infertilidade:

☐ Primária ☐ Secundária

	UNIÃO ATUAL	UNIÃO ANTERIOR
Número e resultados de gravidez prévias	-	-
NASCIDOS VIVOS	-	-
NASCIDOS VIÁVEIS	-	-
ABORTOS INDUZIDOS	-	-
ECTÓPICO	-	-
MOLAR	-	-
Nº DE FILHOS VIVOS	-	-

Complicação no pós partos ou abortos na última gravidez: ☐ sim ☐ não

Duração da infertilidade:----------meses
Métodos contraceptivos usados desde a última gravidez ou alguma vez se infertilidade primária:

☐ NENHUM

☐ DIU

☐ ANTICONCEPCIONAL ORAL

☐ OUTRO

Investigação e\ou tratamentos prévios para infertilidade ☐ sim ☐ não

HISTÓRIA DE DOENÇA COM POSSÍVEL EFEITOS NA INFERTILIDADE

História de doença sistêmica: ☐ não ☐ sim

☐ diabetes
☐ tuberculose
☐ tireóide
☐ outra

História de tratamento médico:

☐ Sim ☐ não

História de cirurgia

☐ Não ☐ sim

☐ Apendicectomia não complicada
☐ Apendicectomia complicada
☐ Ginecológica
☐ Outras

História de doença inflamatória pélvica desde a última gravidez ou alguma vez se infertilidade primária: ☐ Não ☐ sim- número de episódio:----------

História de DST:

☐ NÃO ☐ SIM

☐ GONORRÉIA
☐ CLAMÍDIA
☐ OUTRA

História de corrimento vaginal intenso desde a última gravidez:

☐ Não\normal ☐ sim excessivo ou anormal

História de descarga mamilar: ☐ não ☐ sim

OUTROS FATORES COM POSSÍVEIS EFEITOS ADVERSOS NA FERTILIDADE

Fatores ambientais ou ocupacionais: ☐ não ☐ sim

HISTÓRIA MENTRUAL OU OVULATÓRIA ☐ Não ☐ sim

Idade da menarca:----------
Amenorréia secundária ☐ não ☐ sim
Regularidade menstrual ☐ normal 25-35 dias ☐ anormal
Duração do ciclo intermenstrual ----------média
Sangramento menstrual ☐ normal ☐ anormal

Categoria menstrual ☐ REGULAR
☐ OLIGOMENORRÉIA
☐ AMENORRÉIA SECUNDÁRIA
☐ POLIMENORRÉIA
☐ IRREGULAR

Número dia do último período menstrual espontâneo:----------
Dismenorréia ☐ não ☐ intensa ☐ progressiva

HISTÓRIA COITAL
Conhecimento e uso do período fértil ☐ sim ☐ não
Frequência de relações vaginais por mês ☐ adequada ☐ inadequada
Dispareunia ☐ não ☐ superficial ☐ profunda

EXAME FÍSICO
Altura:---------- Peso:---------- IMC:----------
Peso normal para altura ☐ sim ☐ não
Alteração de peso mais que 10% no último ano ☐ sim ☐ não
Pressão sanguínea: Sistólica:---------- Diastólica

EXAME PÉLVICO
Genitália externa ☐ normal ☐ anormal
Hímen ☐ rompido ☐ intacto
Genitália interna ☐ normal ☐ anormalidade adquirida
Anormalidade congênita ☐

INVESTIGAÇÃO ÚTERO-TUBO-PERITONIAL
Cavidade uterina pela USG
☐ NORMA ☐ ANORMALIDADE ADQUIRIDA ☐ ANORMALIDADE CONGÊNITA

☐ NÃO FEITO

Teste de permeabilidade tubária
lado direito ☐ normal ☐ ocluído ☐ outras anormalidades
lado esquerdo ☐ Normal ☐ ocluído ☐ outras anormalidades

DIAGNÓSTICOS
☐ DISFUNÇÃO SEXUAL
☐ HIPERPROLACINEMIA
☐ LESÃO ORGÂNICA DA REGIÃO HIPOTÁLAMO-HIPOFISÁRIA
☐ AMENORRÉIA COM FSH ELEVADO
☐ AMENORRÉIA COM ESTRÓGENO ENDÓGENO
☐ AMENORRÉIA COM ESTRÓGENO BAIXO
☐ OLIGOMENORRÉIA

- [ ] MENSTRUAÇÃO COM OVULAÇÃO IRREGULAR
- [ ] ANORMALIDADES CONGÊNITAS
- [ ] OCLUSÃO TUBÁRIA BILATERAL
- [ ] ADERÊNCIAS PÉLVICAS
- [ ] ENDOMETRIOSE
- [ ] LESÃO UTERINA OU CERVICAL ADQUIRIDA
- [ ] CICLO REGULAR CO ANOVULAÇÃO
- [ ] TUBERCULOSE GENITAL
- [ ] CAUSAS IATROGÊNICAS
- [ ] CAUSAS SISTÊMICAS
- [ ] DIAGNÓSTICO NÃO ESTABELECIDO
- [ ] TESTE PÓS- COITO ANORMAL
- [ ] CAUSA NÃO DEMONSTRÁVEL
- [ ] CAUSA MASCULINA

RESULTADOS DE EXAMES
MASCULINO

- [ ] CULTURA DE ESPERMA:
- [ ] ESPERMOGRAMA:
- [ ] FEMININO
- [ ] ESTRADIOL:
- [ ] FSH:
- [ ] LH:
- [ ] PROLACTINA:
- [ ] PROGESTERONA:
- [ ] TSH:
- [ ] T3:
- [ ] T4:

- [ ] HIV:
- [ ] HTLV:
- [ ] VDRL:
- [ ] CLAMYDIA IGG:
- [ ] IGM:
- [ ] HBSAg:
- [ ] ANTI HCV-
- [ ] ANTIHBC IGM-
- [ ] ANTIHBC IGG-
- [ ] ANTIHBC TOTAL-
- [ ]

ANEXO 4 - Normas da revista de Saúde Pública (RSP)

Instruções aos autores

Resumo

São publicados resumos em português, espanhol e inglês. Para fins de cadastro do manuscrito, deve-se apresentar dois resumos, um na língua original do manuscrito e outro em inglês (ou em português, em caso de manuscrito apresentado em inglês). Como regra geral, o resumo deve incluir: objetivos do estudo, principais procedimentos metodológicos (população em estudo, local e ano de realização, métodos observacionais e analíticos), principais resultados e conclusões.

Estrutura do texto

Introdução – Deve ser curta, relatando o contexto e a justificativa do estudo, apoiados em referências pertinentes ao objetivo do manuscrito, que deve estar explícito no final desta parte. Não devem ser mencionados resultados ou conclusões do estudo que está sendo apresentado.

Métodos– Os procedimentos adotados devem ser descritos claramente; bem como as variáveis analisadas, com a respectiva definição quando necessária e a hipótese a ser testada. Devem ser descritas a população e a amostra, instrumentos de medida, com a apresentação, se possível, de medidas de validade; e conter informações sobre a coleta e processamento de dados. Deve ser incluída a devida referência para os métodos e técnicas empregados, inclusive os métodos estatísticos; métodos novos ou substancialmente modificados devem ser descritos, justificando as razões para seu uso e mencionando suas limitações. Os critérios éticos da pesquisa devem ser respeitados. Os autores devem explicitar que a pesquisa foi conduzida dentro dos padrões éticos e aprovada por comitê de ética.

Resultados – Devem ser apresentados em uma seqüência lógica, iniciando-se com a descrição dos dados mais importantes. Tabelas e figuras devem ser restritas àquelas necessárias para argumentação e a descrição dos dados no texto deve ser restrita aos mais importantes. Os gráficos devem ser utilizados para destacar os resultados mais relevantes e resumir relações complexas. Dados em gráficos e tabelas não devem ser duplicados, nem repetidos no texto. Os resultados numéricos devem especificar os métodos estatísticos utilizados na análise. Material extra ou suplementar e detalhes técnicos podem ser divulgados na versão eletrônica do artigo.

Discussão – A partir dos dados obtidos e resultados alcançados, os novos e importantes aspectos observados devem ser interpretados à luz da literatura científica e das teorias existentes no campo. Argumentos e provas baseadas em comunicação de caráter pessoal ou divulgadas em documentos restritos não podem servir de apoio às argumentações do autor. Tanto as limitações do trabalho quanto suas implicações para futuras pesquisas devem ser

esclarecidas. Incluir somente hipóteses e generalizações baseadas nos dados do trabalho. As conclusões devem finalizar esta parte, retomando o objetivo do trabalho.

Referências

Listagem: As referências devem ser normalizadas de acordo com o estilo Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication, ordenadas alfabeticamente e numeradas. Os títulos de periódicos devem ser referidos de forma abreviada, de acordo com o Medline, e grafados no formato itálico. No caso de publicações com até seis autores, citam-se todos; acima de seis, citam-se os seis primeiros, seguidos da expressão latina “et al”. Referências de um mesmo autor devem ser organizadas em ordem cronológica crescente. Sempre que possível incluir o DOI do documentado citado, de acordo com os exemplos abaixo.

Exemplos:

Artigos de periódicos

Narvai PC. Cárie dentária e flúor:uma relação do século XX. *Cienc Saude Coletiva*. 2000;5(2):381-92. DOI:10.1590/S1413-81232000000200011

Zinn-Souza LC, Nagai R, Teixeira LR, Latorre MRDO, Roberts R, Cooper SP, et al. Fatores associados a sintomas depressivos em estudantes do ensino médio de São Paulo, Brasil. *Rev Saude Publica*. 2008;42(1):34-40. DOI:10.1590/S0034-89102008000100005.

Hennington EA. Acolhimento como prática interdisciplinar num programa de extensão. *Cad Saude Coletiva* [Internet].2005;21(1):256-65. Disponível em:http://www.scielo.br/pdf/csp/v21n1/28.pdf DOI:10.1590/S0102-311X2005000100028

Livros

Nunes ED. Sobre a sociologia em saúde. São Paulo; Hucitec;1999.

Wunsch Filho V, Koifman S. Tumores malignos relacionados com o trabalho. In: Mendes R, coordenador. Patologia do trabalho. 2. ed. São Paulo: Atheneu; 2003. v.2, p. 990-1040.

Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer Washington: National Academy Press; 2001[citado 2003 jul 13] Disponível em: http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=10149

Para outros exemplos recomendamos consultar as normas ("Citing Medicine") da National Library of Medicine (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=citmed).

Referências a documentos não indexados na literatura científica mundial, em geral de divulgação circunscrita a uma instituição ou a um evento (teses, relatórios de pesquisa, comunicações em eventos, dentre outros) e informações extraídas de documentos eletrônicos, não mantidas permanentemente em sites, se relevantes, devem figurar no rodapé das páginas do texto onde foram citadas.

Citação no texto: A referência deve ser indicada pelo seu número na listagem, na forma de expoenteapós a pontuação no texto, sem uso de parênteses, colchetes e similares. Nos casos em que a citação do nome do autor e ano for relevante, o número da referência deve ser colocado a seguir do nome do autor. Trabalhos com dois autores devem fazer referência aos dois autores ligados por &. Nos outros casos apresentar apenas o primeiro autor (seguido de et al. em caso de autoria múltipla).

Exemplos:
A promoção da saúde da população tem como referência o artigo de Evans & Stoddart,[9] que considera a distribuição de renda, desenvolvimento social e reação individual na determinação dos processos de saúde-doença.

Segundo Lima et al[9] (2006), a prevalência se transtornos mentais em estudantes de medicina é maior do que na população em geral.

Parece evidente o fracasso do movimento de saúde comunitária, artificial e distanciado do sistema de saúde predominante.[12,15]

Tabelas
Devem ser apresentadas depois do texto, numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. A cada uma deve-se atribuir um título breve, não se utilizando traços internos horizontais ou verticais. As notas explicativas devem ser colocadas no rodapé das tabelas e não no cabeçalho ou título. Se houver tabela extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar formalmente autorização da revista que a publicou, para sua reprodução.
Para composição de uma tabela legível, o número máximo é de 12 colunas, dependendo da quantidade do conteúdo de cada casela. Tabelas que não se enquadram no nosso limite de espaço gráfico podem ser publicadas na versão eletrônica. Notas em tabelas devem ser indicadas por letras, em sobrescrito e negrito.
Se houver tabela extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar autorização para sua reprodução, por escrito.

Figuras
As ilustrações (fotografias, desenhos, gráficos, etc.) devem ser citadas como Figuras e numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto e apresentadas após as tabelas. Devem

conter título e legenda apresentados na parte inferior da figura. Só serão admitidas para publicação figuras suficientemente claras e com qualidade digital que permitam sua impressão, preferentemente no formato vetorial. No formato JPEG, a resolução mínima deve ser de 300 dpi. Não se aceitam gráficos apresentados com as linhas de grade, e os elementos (barras, círculos) não podem apresentar volume (3-D). Figuras em cores são publicadas quando for necessária à clareza da informação. Se houver figura extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar autorização, por escrito, para sua reprodução.

ANEXO 5 - Normas da Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia

Instruções aos autores

A Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia (RevBrasGincecol Obstet. ISSN 0100 7203), publicação mensal de divulgação científica da Federação das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia (Febrasgo), é dirigida a obstetras, ginecologistas e profissionais de áreas afins, com o propósito de publicar contribuições originais sobre temas relevantes no campo da Ginecologia, Obstetrícia e áreas correlatas. É aberta a contribuições nacionais e internacionais. O material enviado para análise não pode ter sido submetido simultaneamente à publicação em outras revistas nem publicado anteriormente. Na seleção dos manuscritos para publicação, são avaliadas originalidade, relevância do tema e qualidade da metodologia utilizada, além da adequação às normas editoriais adotadas pela revista. O material referente a artigos recusados não é devolvido. Todos os manuscritos submetidos à revista são analisados por pareceristas anônimos e o sigilo é garantido durante todo o processo de revisão. Cópias dos pareceres dos revisores são enviadas aos autores. Os manuscritos aceitos e os aceitos condicionalmente são enviados para os autores para que sejam efetuadas as modificações e para que os mesmos tomem conhecimento das alterações a serem introduzidas, a fim de que o trabalho seja aceito para publicação. Os autores devem devolver o texto com as modificações solicitadas assim que possível, devendo justificar, na carta de encaminhamento, se for o caso, o motivo do não atendimento às sugestões. Não havendo retorno do trabalho após três meses, presume-se que os autores não têm mais interesse na publicação. Caso haja retorno após esse prazo, será considerada nova submissão, e o trabalho deve ser submetido à nova análise. Os conceitos e declarações contidos nos trabalhos são de responsabilidade dos autores. O manuscrito enviado para publicação deve ser redigido em português.

A revista publica contribuições nas seguintes categorias: 1. Artigos Originais, trabalhos completos prospectivos, experimentais ou retrospectivos. Manuscritos contendo resultados de pesquisa clínica ou experimental original têm prioridade para publicação; 2. Notas Prévias de trabalhos em fase final de coleta de dados, mas cujos resultados são originais e relevantes para justificar sua publicação; 3. Relatos de Casos, de grande interesse e bem documentados, do ponto de vista clínico e laboratorial. O texto deve ser baseado em revisão bibliográfica atualizada. O número de referências pode ser igual ao dos trabalhos completos; 4. Técnicas e Equipamentos, que são apresentações de inovações em diagnóstico, técnicas cirúrgicas e tratamentos, desde que não sejam, clara ou veladamente, propaganda de drogas ou outros produtos; 5. Artigos de Revisão e Atualização, incluindo avaliação crítica e sistematizada da literatura. A seleção dos temas é baseada em planejamento estabelecido pela editoria e editores associados. Os autores convidados devem ter publicações em periódicos sobre o tema escolhido. O número de autores das revisões pode variar entre um e quatro, dependendo do tipo de texto e da metodologia empregada. Devem ser descritos os métodos e procedimentos adotados para a realização do trabalho, podendo ser

empregadas técnicas para se obterem atualizações, metanálises ou revisões sistemáticas. O texto deve ser baseado em revisão atualizada da literatura. Tratando-se de tema ainda sob investigação, a revisão deve discutir todas as tendências e linhas de investigação em curso. Apresentar, além do texto da revisão, resumo, abstract e conclusões. Ver a seção “Preparo do manuscrito” para informações quanto ao texto, página de rosto, resumo e abstract. Contribuições espontâneas podem ser aceitas. Nesse caso, devem ser enviados inicialmente um resumo ou esboço do texto, a lista de autores e respectivas publicações sobre o tema. Se houver interesse da revista, são convidados para redigir e enviar o texto definitivo. No caso de contribuições espontâneas, aplicam-se as normas citadas para os autores convidados; 6. Comentários Editoriais, sob solicitação do editor; 7. Resumos de Teses apresentadas e aprovadas nos últimos 12 meses, contados da data de envio do resumo. Devem conter, aproximadamente, 250 palavras e seguir as normas da revista quanto à estruturação, à forma e ao conteúdo. Incluir título em português e inglês e, no mínimo, três palavras ou expressões-chave. O resumo deve ser enviado em disquete, CD ou DVD com uma cópia impressa. Em arquivo separado, informar: nome completo do autor e do orientador; membros da banca; data de apresentação e a identificação do serviço ou departamento onde a tese foi desenvolvida e apresentada. 8. Cartas dos leitores para o editor, versando sobre matéria editorial ou não, mas com apresentação de informações relevantes ao leitor. As cartas podem ser resumidas pela editoria, mas com manutenção dos pontos principais. No caso de críticas a trabalhos publicados, a carta é enviada aos autores para que suaresposta possa ser publicada simultaneamente.

Informações gerais

1. A revista não aceita material editorial com objetivos comerciais.
2. Conflito de interesses: devem ser mencionadas as situações que podem influenciar de forma inadequada o desenvolvimento ou as conclusões do trabalho. Entre essas situações, menciona-se a participação societária nas empresas produtoras das drogas ou equipamentos citados ou utilizados no trabalho, assim como em concorrentes da mesma. São também consideradas fontes de conflito os auxílios recebidos, as relações de subordinação no trabalho, consultorias etc.
3. No texto, devem ser mencionadas a submissão e a aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição onde foi realizado o trabalho.
4. Artigo que trate de pesquisa clínica com seres humanos deve incluir a declaração de que os participantes assinaram o termo de consentimento livre e informado.
5. A partir de agosto de 2007, os periódicos indexados nas bases de dados Lilacs e SciELO passaram a exigir que os ensaios controlados aleatórios (randomizedcontroledtrials) e ensaios clínicos (clinicaltrials) submetidos à publicação tivessem o registro em uma base de dados de ensaios clínicos. Essa decisão foi decorrente da orientação da Plataforma Internacional para Registros de Ensaios Clínicos (ICTRP) da Organização Mundial da Saúde (OMS), do InternationalCommitteeof Medical JournalEditors (ICMJE). As instruções para o registro estão disponíveis no endereço eletrônico do

ICMJE (http://www.icmje.org/clin_trialup.htm) e o registro pode ser feito na base de dados de ensaios clínicos da National Library of Medicine disponível em http://clinicaltrials.gov/ct/gui.
6. O número de autores de cada manuscrito é limitado a sete. Trabalhos de autoria coletiva (institucionais) devem ter os responsáveis especificados. Trabalhos e estudos multicêntricos podem ter número de autores compatível com o número de centros (cada situação é avaliada pela editoria e pelos revisores). Os investigadores responsáveis pelos protocolos aplicados devem ser especificados no fim do artigo. O conceito de coautoria é baseado nacontribuição substancial de cada um, seja para a concepção e planejamento do trabalho, análise e interpretação dos dados, ou para a redação ou revisão crítica do texto. A inclusão de nomes cuja contribuição não se enquadre nos critérios citados não é justificável. Todos os autores devem aprovar a versão final a ser publicada.
7. Os autores são informados, por carta, do recebimento dos trabalhos e do número de protocolo na revista. Os trabalhos que estão de acordo com as Instruções aos Autores e se enquadram na política editorial da revista, são enviados para análise de revisores indicados pelo editor.
8. Os originais em desacordo com essas instruções são devolvidos aos autores para as adaptações necessárias antes da avaliação pelo Conselho Editorial.
9. Junto com os originais, deve ser enviada carta de encaminhamento assinada por todos os autores. Podem ser enviadas cartas separadas. Na carta, deve ficar explícita a concordância com as normas editoriais, com o processo de revisão e com a transferência de copyright para a revista. O material publicado passa a ser propriedade da Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia e da Febrasgo, só podendo ser reproduzido, total ou parcialmente, com a anuência dessas entidades.
10. Para manuscritos originais, não ultrapassar 25 páginas de texto digitado. Limitar o número de tabelas e figuras ao necessário para apresentação dos resultados que são discutidos (como norma geral, limitar a cinco). Para manuscritos do tipo Relato de Caso e Equipamentos e Técnicas, não ultrapassar 15 páginas, reduzindo também o número de figuras e/ou tabelas. As Notas Prévias devem ser textos curtos, com até 800 palavras, cinco referências bibliográficas e duas ilustrações (ver “Preparo do manuscrito”, “Resultados”).
11. Enviar disquete, CD ou DVD devidamente identificado com o arquivo contendo texto, tabelas, gráficos e as legendas de outras figuras (fotos).
Encaminhar também três cópias impressas do manuscrito. O trabalho pode ser enviado para a revista pelo sistema de submissão on-line no portal SciELO. O endereço eletrônico para correspondência com a revista é: rbgo@fmrp.usp.br.

Preparo dos manuscritos

As normas que seguem foram baseadas no formato proposto pelo ICMJE e publicado no artigo Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals, atualizado em Outubro de 2008 e disponível no endereço eletrônico http://www.icmje.org/. Apresentação do texto 1. Os trabalhos devem ser digitados em espaço 2 em todas as seções, da página

de rosto às referências bibliográficas, tabelas e legendas. Cada página deve conter aproximadamente 25 linhas em uma coluna. Usar preferencialmente o processador de texto Microsoft Word® e a fonte Times New Roman 12. Não dar destaque a trechos do texto: não sublinhar ou usar negrito. Numerar todas as páginas iniciando pela página de rosto. 2. Não usar maiúsculas nos nomes próprios (a não ser a primeira letra) no texto ou nas referências bibliográficas. Não utilizar pontos nas siglas (DPP em vez de D.P.P.). Quando usar siglas ou abreviaturas, descrevê-las por extenso na primeira vez que forem mencionadas no texto. 3. Para impressão, utilizar folhas de papel branco, deixando espaço mínimo de 2,5 cm em cada margem. Iniciar cada seção em uma nova página: página de rosto; resumo e palavras ou expressões-chave; abstract e keywords; texto; agradecimentos; referências; tabelas individuais e legendas das figuras não digitadas. Página de rosto Apresentar o título do trabalho em português e em inglês; nomes completos dos autores sem abreviaturas; nome da instituição onde o trabalho foi desenvolvido, titulação, afiliação institucional dos autores, informações sobre auxílios recebidos sob forma de financiamento, equipamentos ou fornecimento de drogas. Indicar o nome, endereço, telefone, fax e e-mail do autor para o qual a correspondência deve ser enviada. Dar preferência para o endereço da instituição onde o trabalho foi desenvolvido. O autor tem de indicar quais informações pessoais não devem ser publicadas. Resumo: O resumo do trabalho deve aparecer na segunda página. Para trabalhos completos, redigir um resumo estruturado, que deve ser dividido em seções identificadas: objetivo, métodos, resultados e conclusões. Deve ter aproximadamente 300 palavras. O resumo deve conter as informações relevantes, permitindo que o leitor tenha uma ideia geral do trabalho. Deve incluir descrição resumida de todos os métodos empregados e da análise estatística efetuada. Expor os resultados numéricos mais relevantes, não apenas indicação de significância estatística. As conclusões devem ser baseadas nos resultados do trabalho e não da literatura. Evitar o uso de abreviações e símbolos. Não citar referências bibliográficas no resumo. Abaixo do resumo, indicar o número de registro e/ou identificação para os ensaios controlados aleatórios e ensaios clínicos. Na mesma página do resumo, citar pelo menos cinco palavras ou expressões- chave que serão empregadas para compor o índice anual da revista. Devem ser baseadas no Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) publicado pela Bireme, que é uma tradução do Medical SubjectHeadings (MeSH) da National Library of Medicine e está disponível no endereço eletrônico http://decs.bvs.br. Em outra página, deve ser impresso o abstract como versão fiel do texto do resumo estruturado (purpose, methods, results, conclusions). Deve ser tambémacompanhado da versão para o inglês das palavras ou expressões-chave (keywords). O resumo e o abstract dos Relatos de Casos e Artigos de Revisão ede Atualização não devem ser estruturados e são limitados a 150 palavras. Para Notas Prévias, não há necessidade do resumo. Introdução Repetir, na primeira página da introdução, o título completo em português e inglês. Nessa seção, mostre a situação atual dos conhecimentos sobre o tópico em estudo, divergências e lacunas que possam eventualmente justificar o desenvolvimento do trabalho, mas sem revisão extensa da literatura. Para Relatos de Casos, apresentar um resumo dos casos já publicados, epidemiologia da condição relatada e uma justificativa para a

apresentação como caso isolado. Expor claramente os objetivos do trabalho. Métodos Iniciar essa seção indicando o planejamento do trabalho: se prospectivo ou retrospectivo; ensaio clínico ou experimental; se a distribuição dos casos foi aleatória ou não etc. Descrever os critérios para seleção das pacientes ou grupo experimental, inclusive dos controles. Identificar os equipamentos e reagentes empregados. Se a metodologia aplicada já tiver sido empregada, indicar as referências, além da descrição resumida do método. Descrever também os métodos estatísticos empregados e as comparações para as quais cada teste foi empregado. Os trabalhos que apresentam como objetivo a avaliação da eficácia ou tolerabilidade de tratamento ou droga devem, necessariamente, incluir grupo controle adequado. Para informações adicionais sobre o desenho de trabalhos desse tipo, consultar ICH Harmonized Tripartite Guideline – ChoiceofControlGroupandRelatedIssues in ClinicalTrials (http://www.hc-sc.gc.ca/hpfb- dgpsa/tpd-dpt/e10_e.html). Ver também item 4 das "Informações gerais".Resultados Apresentar os resultados em sequência lógica, com texto, tabelas e figuras. Expor os resultados relevantes para o objetivo do trabalho e que são discutidos. Não repetir no texto dessa seção todos os dados das tabelas e figuras, mas descrever e enfatizar os mais importantes, sem interpretação dos mesmos (ver também tabelas). Nos Relatos de Casos, as seções "métodos" e "resultados" são substituídas pela descrição do caso, mantendo-se as demais. Discussão Devem ser realçadas as informações novas e originais obtidas na investigação. Não repetir dados e informações já mencionadas nas seções "introdução" e "resultados". Evitar citação de tabelas e figuras. Ressaltar a adequação dos métodos empregados na investigação. Comparar e relacionar as suas observações com as de outros autores, comentando e explicando as diferenças. Explicar as implicações dos achados, suas limitações e fazer as recomendações decorrentes. Para Relatos de Casos, basear a discussão em ampla e atualizada revisão da literatura. Recomenda-se tabular informações sobre os casos já publicados para comparação. Agradecimentos Dirigidos a pessoas que tenham colaborado intelectualmente, mas cuja contribuição não justifica coautoria, ou para aquelas que tenham dado apoio material. Referências Todos os autores e trabalhos citados no texto devem constar dessa seção e vice-versa. Numerar as referências bibliográficas por ordem de entrada no trabalho e usar esses números para as citações no texto. Evitar número excessivo de referências, selecionando as mais relevantes para cada afirmação e dando preferência para os trabalhos mais recentes. Não empregar citações dedifícil acesso, como resumos de trabalhos apresentados em congressos ou publicações de circulação restrita. Não empregar referências do tipo "observações não publicadas" e "comunicação pessoal". Para textos escritos originalmente em português, a referência também deve ser feita em português. Artigos aceitos para publicação podem ser citados acompanhados da expressão:"aceito e aguardando publicação", ou "in press", indicando-se o periódico, volume e ano. Trabalhos aceitos por periódicos que estejam disponíveis on-line, mas sem indicação de fascículos e páginas, devem ser citados como "aheadofprint". No caso de citações de outras publicações dos autores (autocitação), incluir entre as referências bibliográficas apenas trabalhos originais (não citar capítulos ou revisões), impressos em periódicos regulares e relacionados ao tema. O número de

referências bibliográficas deve ser aproximadamente 30. Para Notas Prévias, no máximo dez. Os autores são responsáveis pela exatidão dos dados constantes das referências bibliográficas. Para todas as referências, citar os autores até o sexto. Se houver mais de seis autores, citar os seis primeiros, seguidos da expressão et al., conforme os seguintes modelos: Formato impresso • Artigos em revistas - Moran CA, Suster S, Silva EG. Low-grade serous carcinoma of the ovary metastatic to the anterior mediastinum simulating multiloculartymic cysts: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 3 cases. Am J SurgPathol. 2005;29(4):496-9. - Parpinelli MA, Faúndes A, Cecatti JG, Surita FG, Pereira BG, Passini Junior R, et al. Subnotificação da mortalidade materna em Campinas: 1992 a 1994. RevBrasGinecol Obstet. 2000;22(1):27-32. - Miyatake T, Ueda Y, Yoshino K, Shroyer KR, Kanao H, Sun H, et al. Clonality analysis and human papillomavirus infection in squamous metaplasia andatypical immature metaplasia of uterine cervix: is atypical immature metaplasia a precursor to cervical intraepithelial neoplasia 3? Int J GynecolPathol. 2007;26(2):180-7.
• Livro - Baggish MS, Karram MM. Atlas of pelvic anatomy and gynecologic surgery. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 2006. • Capítulos de livro - Daher S, Mattar R, Sass N. Doença hipertensiva específica da gravidez: aspectos imunológicos. In: Sass N, Camano L, Moron AF, editores. Hipertensão arterial e nefropatias na gravidez. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. p. 45-56. Formato eletrônico Apenas para informações estatísticas oficiais e citação de referências de periódicos não impressos. Para estatísticas oficiais, indicar a entidade responsável, o endereço eletrônico, o nome do arquivo ou entrada. Incluir o número de telas, data e hora do acesso. Termos como “serial”, “periódico”, “homepage” e “monography”, por exemplo, não são mais utilizados. Todos os documentos devem ser indicados apenas como [Internet]. Para documentos eletrônicos com o identificador DOI (Digital ObjectIdentifier), mencionar no final da referência, além das informações que seguem: - Brasil. Ministério da Saúde. DATASUS [Internet]. Informações de Saúde. Estatísticas vitais. Mortalidade e nascidos vivos: nascidos vivos desde 1994. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2008. [citado 2007 Fev 7]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinasc/cnv/nvuf.def > • Monografia na internet ou livro eletrônico - Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Availablefrom: http://www.nap.edu/books/0309074029/html/Tabelas Imprimir tabelas em páginas separadas, com espaço duplo e fonte Arial 8. A numeração deve ser sequencial, em algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. Todas as tabelas devem ter título e todas as colunas da tabela devem ser identificadas com um cabeçalho. A legenda deve conterinformações que permitam ao leitor entender o conteúdo das tabelas e figuras, mesmo sem a leitura do texto do trabalho. As linhas horizontais devem ser simples e limitadas a duas no topo e uma no final da tabela. Não empregar linhas verticais. Não usar funções de criação de tabelas, comandos de justificação, tabulações decimais ou centralizadas. Utilizar comandos de tabulação (tab) e não o espaçador para separar as colunas e, para nova linha, a tecla enter. No rodapé da tabela, deve constar legenda para abreviaturas e testes estatísticos utilizados. Figuras (gráficos, fotografias e ilustrações) As figuras

devem ser impressas em folhas separadas e numeradas sequencialmente, em algarismos arábicos, conforme a ordem de aparecimento no texto. Todas as figuras devem ter qualidade gráfica adequada (usar somente fundo branco) e apresentar título e legenda, digitados em fonte Arial 8. No disquete, CD ou DVD devem ser enviadas em arquivo eletrônico separado do texto (a imagem aplicada no processador de texto não significa que o original está copiado). Para evitar problemas que comprometam o padrão da revista, o processo de digitalização de imagens (scan) deve obedecer aos seguintes parâmetros: para gráficos ou esquemas usar 800 dpi/bitmap para traço; para ilustrações e fotos (preto e branco) usar 300 dpi/RGB ou grayscale. Em todos os casos, os arquivos devem ter extensão .tif e/ou .jpg. No caso de não ser possível a entrega do arquivo eletrônico das figuras, os originais devem ser enviados em impressão a laser (gráficos e esquemas) ou papel fotográfico (preto e branco) para que possam ser devidamente digitalizadas. Também são aceitos arquivos com extensão .xls (Excel), .cdr (CorelDraw®), .eps, .wmf para ilustrações em curva (gráficos, desenhos, esquemas). São aceitas, no máximo, cinco figuras. Se as figuras já tiverem sido publicadas, devem vir acompanhadasde autorização por escrito do autor/editor e constando a fonte na legenda da ilustração. Legendas Imprimir as legendas usando espaço duplo, acompanhando as respectivas figuras (gráficos, fotografias e ilustrações) e tabelas. Cada legenda deve ser numerada em algarismos arábicos, correspondendo a cada figura e tabela, e na ordem que foram citadas no trabalho. Abreviaturas e siglas Devem ser precedidas do nome completo quando citadas pela primeira vez no texto. Nas legendas das tabelas e figuras, devem ser acompanhadas de seu nome por extenso. As abreviaturas e siglas não devem ser usadas no título dos artigos e nem no resumo.

Envio dos manuscritos

Os documentos devem ser enviados para: Jurandyr Moreira de Andrade Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia – Editoria Avenida Bandeirantes, 3.900, 8º andar – Campus Universitário CEP 14049-900 – Ribeirão Preto/SP Fone: (16) 3602-2803/Fax: (16) 3633-0946 E-mail: rbgo@fmrp.usp.br A submissão pode ser efetuada por meio do sistema de “Submissão on-line” da SciELO. Para correspondência, pode ser empregado o e-mail rbgo@fmrp.usp.br.

Itens para a conferência do manuscrito

Antes de enviar o manuscrito, conferir se as Instruções aos Autores foram seguidas e verificar o atendimento dos itens listados abaixo. Os itens 1 e 7 não são necessários para trabalhos enviados via “Submissão on-line” no site SciELO.

1. Carta de encaminhamento assinada por todos os autores;
2. Citação da aprovação do projeto do trabalho por Comissão de Ética em Pesquisa (na seção “métodos”) e termo de consentimento livre e informado;
3. Conflito de interesses: se, quando aplicável, foi mencionado, sem omissão de informações relevantes;
4. Página de rosto com todas as informações solicitadas;

5. Resumo e abstract estruturados e compatíveis com o texto do trabalho;
6. Cinco ou mais palavras-chave relacionadas ao texto e respectivas keywords;
7. Mídia (disquete, CD ou DVD) contendo arquivo com o texto integral, tabelas e gráficos, corretamente identificado;
8. Verificar se todas as tabelas e figuras estão corretamente citadas no texto e numeradas, e se as legendas permitem o entendimento das mesmas;
9. Fotos devidamente identificadas e anexadas à correspondência;
10. Referências bibliográficas: numeradas na ordem de aparecimento e corretamente digitadas. Verificar se todos os trabalhos citados estão na lista de referências e se todos os listados estão citados no texto.

ANEXO 6 - Normas do Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida (JBRA)

Instruções aos autores (JBRA)

TYPES OF PUBLISHED ARTICLES

Original articles. Pieces of work resulting from scientific research presenting original data about experimental or observational aspects of medical, biological, biochemical and psychosocial character and including descriptive statistical analysis and/or inferences of own data. These articles have priority for publication. They must be composed of: title page, abstract and keywords, text (divided in Introduction, Material and Methods, Results, Discussion or equivalent, Conclusion), acknowledgments (if applicable), references, tables (if available), figure legends (if available) and figures (if available).

Reviews. Papers whose aim is to summarize, analyze, evaluate or synthesize investigative papers already published in scientific journals. They must include a synthesis and critical analysis of the researched literature and cannot be confused with update articles. They must be composed of: title page, abstract and keywords, text, references, tables (if available), figure legends (if available) and figures (if available).

Update or opinion articles. Papers reporting usually current information on themes of interest to certain specialties (such as a new technique or method). They have different characteristics from reviews, since they do not display critical analysis of the literature. They must be composed of: title page, abstract and keywords, text, references, tables (if available), figure legends (if available) and figures (if available).

Case reports. Articles representing descriptive data of one or more cases, exploiting a method or problem through example(s). The selected cases should be of great interest, with unusual disease or evolution or submitted to unexpected or alternative treatments. They must involve humans or animals and should present the studied individual's characteristics (gender, age, etc.). They must be composed of: title page, abstract and keywords, text (divided in: Introduction, Case Description and Discussion or equivalent), references, figure legends (if available) and figures (if available).

Letters to the reader. Letters to the editor commenting, discussing or criticizing articles published in JBRA Assisted Reproduction will be welcome and published as long as they are accepted by the Editorial Board. They must be composed of: title, name of author, identification of the publication being commented on and references (if available). It is recommended to include 500 words at the most, references inclusive. Whenever possible, a reply by the authors will be published alongside with the letter.

COVER LETTER

You have to prepared a cover letter for your submission, explaining why we should publish your manuscript and elaborating on any issues relating to our editorial policies detailed in the instructions for authors, and declaring any potential competing interests. This should be provided using the 'cover letter' section of the submission process.
The cover letter have to carry the following information:

- Title
- Authors' names
- Authors' institutional affiliation, showing department/unit, institution and geographic region
- Name of the institution where the work was carried
- Name, mailing address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the corresponding author

PREPARATION OF ORIGINAL PAPERS

Preferably use Microsoft Word® processor. Papers should be typed in Times New Roman font sized 12, single-spaced and aligned to the left. Every section should be started on a new page in the following order: title page, abstract and keywords, text, acknowledgements, references, tables, figure legends and figures. All of the pages should be numbered consecutively.

Abbreviations should be spelled out in the first mention in the text; and after the first appearance, only the abbreviation should be used. In the abstract, the use of abbreviations should be avoided.
Chemicals should be presented by their generic name. If relevant, commercial name of the substance and the manufacturer's name must be informed in parentheses.

The presentation of units of measurements should follow the International System (IS).
Genes of animals should be presented in italics with capital letter initials (example: Sox2); genes of human beings should also be presented in italics; however, with all capital letters (example: SOX2). Proteins should follow the same pattern: capital/small, without italics, though.

Title Page

The title page should carry the following information:

- Concise and comprehensive title, representing the content of the article
- Short running head (no more than 40 characters including letters and spaces)
- Information about support given in the form of loan, equipment or drugs

- Congresses where the study was presented

Abstract
The content of the texts should not exceed 250 words.
For original articles, the abstract should be structured as follows: Objective, Methods, Results and Conclusion. For case reports, reviews and update articles, the abstract should not be structured. The use of abbreviations should be avoided in the abstract, and references should not be cited. Right after the abstract, three to six keywords should be presented.

Acknowledgements
This part is dedicated to acknowledging the work of those who have helped intellectually, but whose contribution does not justify co-authorship or those people or institutions who have given material support.

References
In the text, the citations will be identified by the author's last name in parentheses followed by the publication year.
Examples: one author (Steptoe, 1978), two authors (Edwards & Steptoe, 1980), and more than two authors (Van Steirteghem et al., 1988).

The references should be presented in alphabetical order (each author's surname followed by his/her first two initials), and should not be numbered. Papers by the same author should be chronologically organized; papers by the same author in the same year should be identified with letters after each year (2000a, 2000b, etc.). The presentation of references will follow the format proposed in the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (see examples below). All references cited in the list should be mentioned in the text and vice-versa.

1. **Journal Article**
   Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM. Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro.Br J ObstetGynaecol. 1980;87:737-56.
2. **Book**
   Wolf DP, Quigley MM, eds. Human in vitro fertilization and embryo transfer. New York: Plenum Press; 1984.
3. **Book Chapter**
   Simpson JL. Gonadal dysgenesial and sex abnormalities: phenotypic-karyotypic correlations. In: Vallet HL, Porter IH, eds. Genetic mechanisms of sexual development. New York: Academic Press; 1979. p. 365-77.
4. **Electronic Journal Article**
   Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. Am J Nurs [electronic journal]. 2002 June [cited 2002 aug 12];102(6):[approximately 3 p.]. Available at: http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/ Wawatch.htm.
5. **Article published in the Internet**
   Wantland DJ, Portillo CJ, Holzemer WL, Slaughter R, McGhee EM. The effectiveness of web-based vs. non-webbased interventions: a

meta-analysis of behavioral change outcomes. J Med Internet Res. 2004;6(4):e40. Available at: http://www.jmir.org/2004/4/e40/. Accessed: 29/11/2004.

6. **Site**
   OncoLink [site in the Internet]. Philadelphia: University of Pennsylvania; c1994-2006. [updated 2004 Sept 24; cited 2006 March 14]. Available at: http://cancer.med.upenn.edu/.
7. **Software**
   Smallwaters Corporation. Analysis of moment structures: AMOS [software]. Version 5.0.1. Chicago: Smallwaters; 2003.

TablesAnd Figures

Tables and figures (graphs, photographs, etc.) should be numbered in Arabic numerals according to the order in which they appear in the text and should have individual legends, presented at the end of the paper.

In the tables, use horizontal lines only, and each piece of information should be in an independent cell. Explanations about items in the tables should be presented in footnotes identified by the following symbols, in this sequence: *,†, ‡, §, ||,¶,**,††,‡‡.
Figures must be submitted in electronic formats such as .jpg, .gif or .tif, with a minimum resolution of 300 dpi.

Photographs of patients should not allow their identification.
Figures previously published and included in submitted articles should include the original source in the legend and should be accompanied by a permission letter from the copyright's holder (publisher or journal).

SUBMISSION OF ARTICLES

To facilitate the articles publication, JBRA Assisted Reproduction prefers online submission. Manuscripts must be submitted by one of the authors of the manuscript, and should not be submitted by anyone on their behalf. The submitting author takes responsibility for the article during submission and peer review.

You will be also asked to provide the contact details (including email addresses) of potential peer reviewers for your manuscript. These should be experts in their field, who will be able to provide an objective assessment of the manuscript. Any suggested peer reviewers should not have published with any of the authors of the manuscript within the past five years, should not be current collaborators, and should not be members of the same research institution. Suggested reviewers will be considered alongside potential reviewers recommended by the Editor and/or Editorial Board members.

ANEXO 7 – Certificado de submissão do artigo 1 a Revista de Saúde Pública

Submission Confirmation

Print

Thank you for your submission

Submitted to
Revista de Saúde Pública

Manuscript ID
RSP-2016-0060

Title
COMPARING FERTILIZATION AND REPRODUCTION SUCCESS IN A ISO 5/7 AND IN A CONVENTIONAL LABORATORY

Authors
Gontijo, Erica
da Silva, Marcos
de Castro, Ana Maria
Rezende, Hanstter
Approbato, Mário

Date Submitted
03-Jun-2016

Author Dashboard

© Thomson Reuters | © ScholarOne, Inc., 2015. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.
ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.