



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
MESTRADO EM TOCOGINECOLOGIA

TULIUS AUGUSTUS FERREIRA DE FREITAS

EFETIVIDADE DA UTILIZAÇÃO DE INCUBADORAS DE CO₂
EQUIPADAS COM FILTRO HEPA E FILTRO HEPA-VOC
PARA CULTIVO DE EMBRIÕES EM CICLOS DE
FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*

FORTALEZA
2010

TULIUS AUGUSTUS FERREIRA DE FREITAS

**EFETIVIDADE DA UTILIZAÇÃO DE INCUBADORAS DE CO₂
EQUIPADAS COM FILTRO HEPA E FILTRO HEPA-VOC
PARA CULTIVO DE EMBRIÕES EM CICLOS DE
FERTILIZAÇÃO *IN VITRO***

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como exigência parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Francisco das Chagas Medeiros

**FORTALEZA
2010**

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pela Biblioteca de Ciências da
Saúde da Universidade Federal do Ceará
©reprodução autorizada pelo autor

F938e Freitas, Tulus Augustus Ferreira de

Efetividade da utilização de incubadoras de CO₂ equipadas com filtro HEPA e filtro HEPA-VOC para cultivo de embriões em ciclos de fertilização *in vitro* / Tulus Augustus Ferreira de Freitas. – Fortaleza, 2010.

54 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Francisco das Chagas Medeiros

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Departamento de Saúde Materno-Infantil, Fortaleza, CE.

1. Fertilização *in vitro* 2. Controle de Qualidade 3. Qualidade do Ar 4. Incubadoras 5. Filtros I. Medeiros, Francisco das Chagas (Orient.) II. Título.

CDD: 618.1780599

TULIUS AUGUSTUS FERREIRA DE FREITAS

**EFETIVIDADE DA UTILIZAÇÃO DE INCUBADORAS DE CO₂
EQUIPADAS COM FILTRO HEPA E FILTRO HEPA-VOC PARA
CULTIVO DE EMBRIÕES EM CICLOS DE
FERTILIZAÇÃO IN VITRO**

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco das Chagas Medeiros (Orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof.^a Dr.^a Maria Angelina da Silva Medeiros
Universidade de Fortaleza – UNIFOR

Prof. Dr. José Eleutério Júnior
Universidade Federal do Ceará - UFC

"Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível."

São Francisco de Assis

A minha esposa, Márcia e meus filhos Faís e Tomás, pela compreensão dos momentos de ausência, em razão da minha escolha profissional e pela segurança que para mim representam.

Os meus queridos Tertulino e Marlene, pais, amigos, conselheiros e que tornaram possível minha caminhada pessoal e profissional.

As minhas irmãs Ana Augusta e Fabrícia, pelo carinho e apoio.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Francisco das Chagas Medeiros, pela sua admirável capacidade de fazer ciência, e pela generosidade de compartilhar seus conhecimentos com tantas gerações de graduandos, pós-graduandos e colegas de profissão.

À Prof.^a Dr.^a Zenilda Vieira Bruno, Diretora da Maternidade-Escola Assis Chateaubriand, da Universidade Federal do Ceará, pelo esforço na busca de excelência em nosso serviço-escola.

Ao Prof. Dr. Eugênio Pacelli Barreto Teles, coordenador da pós-graduação em Tocoginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela luta e dedicação constantes em manter organizado e ativo o nosso curso de pós-graduação.

Aos médicos e embriologistas da Clínica de Reprodução Humana CRIAR; nas pessoas da Dr.^a Ingrid Sene, embriologista, e dos Doutores Evangelista Torquato e Fábio Eugênio Rodrigues, médicos, pela ajuda constante no recrutamento e acompanhamento das pacientes deste estudo.

Às secretárias do curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Universidade Federal do Ceará, Iranilde, Gracilene e Mônica, pela dedicação constante e paciência com os alunos do mestrado.

Aos colegas de turma do curso de Mestrado em Tocoginecologia da Universidade Federal do Ceará, pela amizade e pela contagiante vontade de constante crescimento profissional e atualização.

A todas as pacientes que, na esperança de tratamento para suas dores e males, e na generosidade de suas atitudes e boa vontade, contribuíram espontaneamente para realização desta pesquisa, ajudando a ciência a prosseguir sua nobre caminhada.

A DEUS, pelos constantes milagres que ELE opera diariamente em nossas vidas.

RESUMO

Introdução e objetivos. A qualidade do ar em um ambiente estéril é um aspecto de grande importância para a cultura celular. Apesar de a condição da cultura ser um fator preponderante para o desenvolvimento de embriões *in vitro*, não há uma padronização dos filtros utilizados nas incubadoras dos laboratórios de fertilização *in vitro* (FIV). Nos últimos anos, a qualidade do ar nas incubadoras de cultura embrionária vem recebendo maior atenção, e o papel dos compostos orgânicos voláteis (VOC) é um item em destaque. O objetivo deste estudo foi avaliar os resultados laboratoriais de ciclos de FIV, utilizando incubadoras de CO₂ para cultura de embriões com o filtro HEPA para partículas de ar e filtro VOC de alta eficiência com carvão ativado. **Materiais e métodos.** Este trabalho consiste de um estudo observacional prospectivo, incluindo 160 ciclos de FIV realizados na Clínica de Reprodução Humana CRIAR, de janeiro de 2008 a setembro de 2009. Os ciclos foram pareados de acordo com a idade da paciente, fator de infertilidade, protocolo de bloqueio hipofisário e origem e qualidade do sêmen utilizado. Trinta e cinco (35) ciclos nos quais os embriões foram cultivados em incubadora de CO₂ equipada com filtro HEPA (grupo HEPA) e 35 ciclos cujos embriões foram cultivados em incubadora de CO₂ equipada com filtro VOC (grupo VOC) foram comparados. **Resultados.** Os grupos foram semelhantes em relação aos aspectos gerais dos ciclos de FIV. Não foram observadas diferenças entre os grupos quando avaliadas as taxas de fertilização normal e clivagem embrionária. A proporção de embriões de alta qualidade (grau A), entretanto, foi maior no grupo VOC (50,8%) comparado ao grupo HEPA (35,7%; p=0,05). **Conclusões.** Ciclos de FIV utilizando incubadoras de CO₂ equipadas com sistema de filtragem de ar do tipo VOC para cultivo embrionário resultam, em maior taxa de embriões grau A, ou seja, aqueles com maior potencial de implantação.

Palavras chave: Fertilização *in vitro*. Qualidade embrionária. Qualidade do ar. Incubadora de CO₂. Filtro de ar.

ABSTRACT

Introduction and objectives. The air quality in sterile environment is an important aspect to cell culture. It is known the culture conditions are essential for *in vitro* human embryo development; however there is no standardization for incubator filters in *in vitro* fertilization (IVF) laboratories. Recently, the incubator air quality has been receiving attention, and effect of volatile organic compounds (VOC) has being highlighted. The aim of this study was to evaluate the laboratorial outcomes of IVF cycles with embryo culture using CO₂ incubators with the HEPA filter for air particles and a high efficiency VOC filter with activated coal. **Material and methods.** This is an observational prospective controlled study which included 160 IVF cycles at Human Reproduction Clinic CRIAR between 2008 January and 2009 September. The cycles were matched to patient age, infertility etiology, pituitary desensitization protocol, and semen origin and quality. Thirty five cycles were compared in which the embryos were cultured in CO₂ incubator with HEPA filter (HEPA group) and 35 cycles where a CO₂ incubator with VOC filter was used for embryos cultures (VOC group). **Results.** The groups were similar for general characteristics of IVF cycles. We did not observed differences about normal fertilization and embryo cleavage rates. On the other side, the proportion of high quality embryos (grade A) was higher on VOC group (50.8%) than HEPA group (35.7%; p=0.05). **Conclusions.** IVF cycles using CO₂ incubator with VOC filter for embryo culture results in a increased high quality embryos rate, those with high implantation potential.

Key words: *In Vitro* Fertilization. Embryo Quality. Air Quality. Co₂ Incubator. Air Filter.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
=	Igual
<	Menor
≤	Menor ou igual
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional da Vigilância Sanitária
BCTG	Banco de Células e Tecidos Germinativos
b-hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana - fração beta
CO ₂	Gás carbônico
CV	Coeficiente de variação
DPG	Diagnóstico genético pré – implantacional
EOC	Estimulo ovariano controlado

EPM	Erro-padrão da média
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH-r	Hormônio folículo estimulante-recombinante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
H	Hora
hCG-r	Gonadotrofina coriônica humana-recombinante
HEPA	Partículas de ar de alta eficiência, do inglês <i>high efficiency particulate air</i>
HSA	Albumina sérica humana, do inglês <i>human seric albumin</i>
ICSI	Injeção Intracitoplasmática de espermatozóides, do inglês <i>intracytoplasmic sperm injection</i>
ISSO	Organização Internacional para Padronização, do inglês <i>international standardization for organization</i>
m ²	Metro quadrado
m ³	Metro cúbico
MII	Metáfase II
MG	Micrograma

mL	Mililitro
Mm	Milímetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
PM ₁₀	Partículas maiores do que 10 mm de diâmetro
TRA	Técnicas de reprodução assistida
UI	Unidades internacionais
VOC	Compostos orgânicos voláteis, do inglês <i>volatile organic compound</i>

LISTA DE TABELAS

- 1 Registros de monitoramento das incubadoras de CO₂ no período do estudo..... 39
- 2 Características gerais dos casais e ciclos de ICSI de acordo com grupos de estudo..... 41

LISTA DE QUADROS

- 1 Classificação ISS..... 21

LISTA DE FIGURAS

1	Imagem ilustrativa da paramentação utilizada em laboratórios de fertilização <i>in vitro</i>.....	22
2	A- Imagem representativa do filtro HEPA-VOC acoplado à incubadora de CO₂ B- Imagem representativa do filtro HEPA-VOC (HEPA Air-Filter - VOC) em detalhe.....	24
3	A- Imagem do laboratório de fertilização <i>in vitro</i> da Clínica de Reprodução Humana CRIAR. B- Imagem da parte externa da incubadora de CO₂.....	30
4	A e B- Imagem da parte interna das incubadoras de CO₂ do laboratório de fertilização <i>in vitro</i> da Clínica de Reprodução Humana CRIAR.....	31
5	Esquema representativo do procedimento de aspiração folicular para a recuperação de oócitos em ciclos de fertilização <i>in vitro</i>...	33
6	A- Imagem representativa de oócito em metáfase II (MII). B- Imagem representativa da injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI). C- Micromanipulador utilizado para procedimento de ICSI do laboratório de fertilização <i>in vitro</i> da Clínica de Reprodução Humana CRIAR.....	34
7	Imagem representativa de oócito com fertilização normal (pré-embrião), definida pela presença de dois pronúcleos (2PN) e dois corpúsculos polares.....	35

8	A- Imagem representativa de embrião grau A no segundo dia do desenvolvimento embrionário, com quatro blastômeros simétricos, sem fragmentação. B- Imagem representativa de embrião grau A no terceiro dia do desenvolvimento embrionário, com oito blastômeros simétricos, sem fragmentação.....	36
9	Fatores de infertilidade dos casais incluídos no estudo, após pareamento.....	40
10	Comparação dos grupos HEPA e VOC quanto aos resultados de fertilização normal e clivagem embrionária nos ciclos de ICSI.....	42
11	Taxa de embriões grau A nos grupos HEPA e VOC.....	43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2	OBJETIVOS.....	27
2.1	Geral.....	27
2.2	Específicos.....	27
3	CASUÍSTICA E MÉTODO.....	28
3.1	Local do Estudo e Aspectos Éticos.....	28
3.2	Desenho do Estudo.....	29
3.3	População do Estudo.....	32
3.3.1	Estimulação ovariana controlada e ICSI.....	32
3.4	Análise dos Dados.....	37
4	RESULTADOS.....	39
5	DISCUSSÃO.....	44
6	CONCLUSÕES.....	48
	REFERÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Atualmente, estima-se que 80 milhões de pessoas em todo mundo sejam inférteis, o que representa uma prevalência de aproximadamente 10% dos casais em idade reprodutiva. Esses números, entretanto, variam entre os países desenvolvidos e em desenvolvimento, assim como há uma variação de acesso ao tratamento (WHO 1991; NACHTIGALL, 2006). Segundo dados do Ministério da Saúde, no Brasil, existem cerca de 2,1 milhões de casais com problemas de fertilidade constatada, ou seja, que tenham procurado algum tipo de tratamento (BRASIL, 2005).

A infertilidade foi reconhecida como um problema de saúde pública mundial pela Organização Mundial da Saúde (OMS), sendo considerada como um desafio-chave do milênio (BOIVIN et al., 2007). Apesar da definição de infertilidade, determinada pela OMS, ser a ausência de concepção após 24 meses de relações sexuais regulares desprotegidas, a definição clássica recomendada é de apenas 12 meses (ROWE et al., 1993; LARSEN, 2005).

O fracasso em ter uma criança é um ponto saliente em pesquisas sociais, para mulheres e homens afetados pela infertilidade (LARSEN, 2005). Cerca de 30% das causas de infertilidade são exclusivamente masculinas, uma porcentagem semelhante é atribuída a causas femininas e de conjugação de fatores do casal. Os 10% restantes são considerados como infertilidade sem causa aparente (SHAPIRO, 1993; NACHTIGALL, 2006).

As causas de infertilidade são amplamente variadas, incluindo diagnósticos tais como desordens ovulatórias, doença tubárea, endometriose, anormalidades cromossômicas, fatores imunológicos, fatores seminais e infertilidade sem causa aparente (HOMAN; DAVIES; NORMAN, 2007).

As novas tecnologias em reprodução assistida (PERIN et al., 2010), resultado do rápido avanço tecnológico que a ciência proporciona, abrangem uma

série de métodos que possibilitam a ocorrência da concepção, mediante assistência médica e tecnológica especializada, para as gestações que não ocorreriam de forma espontânea, atendendo, portanto, as situações emergentes na saúde reprodutiva.

Torna-se necessário que o uso das técnicas de reprodução assistida seja feito de forma terapêutica, como alternativa sem a qual não haveria outra possibilidade de procriação (BIGOUROUX et al., 2004). A rotina propedêutica é variável, dependendo da população a ser atingida, das características da equipe médica e da infraestrutura do serviço. Não existe um esquema ideal que sirva a todos os serviços indistintamente. Portanto, deve englobar, de forma organizada, a triagem dos fatores mais prevalentes na gênese da infertilidade conjugal e aplicação da tecnologia mais adequada em cada situação (FEBRASGO, 1997; BIGOUROUX et al., 2004).

Tem sido observado um aumento das taxas de sucesso em procedimentos de reprodução humana assistida, e o sucesso das técnicas de reprodução assistida (PERIN et al., 2010) é fortemente dependente dos métodos, materiais e equipamentos utilizados (HIGDON; BLACKHURST; BOONE, 2008).

Com o advento da injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI), um só espermatozóide é injetado centralmente no citoplasma do oócito visando à fertilização (PALERMO et al., 1992). A ICSI aumenta as taxas de fertilização, provando ser a escolha terapêutica para casais com fator de infertilidade masculina grave, onde a fertilização *in vitro* (FIV) clássica não pode ser uma opção. Embora a ICSI seja um procedimento mais demorado e mais invasivo, é o método de escolha para casais que tentam engravidar em preferência ao uso de sêmen de doador (PALERMO et al., 1995).

Com o aumento das taxas de fertilização pela utilização da ICSI, o cultivo embrionário passa a ser foco de estudo em TRA, pois, dependendo do desenvolvimento de características morfológicas dos embriões e do controle das variáveis nas quais estes são submetidos no laboratório, tem-se uma probabilidade maior de êxito nos tratamentos (VAN RUMSTE; EVERS; FARQUHAR, 2003).

Apesar de a rotina da maioria dos laboratórios ainda utilizar meios de cultivo que permitem o desenvolvimento de embriões humanos durante dois a três dias, para chegar até a fase de quatro a oito células, e serem então transferidos para a paciente; desde 1997, a cultura prolongada de embriões para o estágio de blastocisto tem sido foco de estudo. Um dos motivos para esse interesse baseou-se no argumento de que a cultura prolongada de embriões humanos para o estágio de blastocisto pode fornecer condições mais precisas acerca da seleção embrionária para a transferência, o que proporcionaria maior taxa de implantação, aumentando consequentemente as taxas de gravidez e diminuindo a probabilidade de gestação múltipla (BIGGERS, 2003).

Posteriormente, segunda razão para a cultura prolongada foi baseada na utilização do diagnóstico genético pré-implantacional (DGP), para realização de análise genética do embrião, quando, normalmente, é realizada a biopsia de um a dois blastômeros no terceiro dia de clivagem embrionária, obrigando, assim, a cultura ser prorrogada até o quinto dia de desenvolvimento, para que os resultados estejam disponíveis antes da transferência dos embriões para o útero da paciente. Atualmente, a geração de células-tronco embrionárias é outra razão para o desenvolvimento *in vitro* de embriões até o estágio de blastocistos (BIGGERS; SUMMERS, 2008).

A cultura prolongada do embrião, entretanto, o expõe a maiores efeitos do ambiente *in vitro*, e, consequentemente, aos possíveis danos causados por esta exposição. A poluição do ar é uma variável que é associada a uma ampla gama de efeitos sobre a saúde humana, e, no âmbito da reprodução humana, parece haver uma relação causal entre a poluição do ar com o baixo peso ao nascer e defeitos de nascimento (RITZ et al., 2007; LEGRO et al., 2010).

Estudo realizado recentemente em São Paulo encontrou um aumento da possibilidade de perda da gravidez após ciclos de FIV e concepção espontânea em pessoas expostas a altas concentrações de partículas maiores que 10 μm de diâmetro (PM_{10}) durante a fase folicular (PERIN et al., 2010). A hipótese para este efeito é que a qualidade do ar piora conforme o aumento das concentrações dos poluentes no meio ambiente, e em mulheres submetidas à FIV os prejuízos estão

associados com a diminuição das taxas de gravidez e de nascidos vivos (LEGRO et al., 2010).

Gametas e embriões são também excepcionalmente expostos ao ar ambiente durante a fertilização *in vitro* de oócitos e cultura de embriões, antes da sua transferência para a paciente. Portanto, o controle de qualidade do ar nesses processos deve ser muito rigoroso, levando em consideração o fato de que finas partículas de ar são compostas de uma variedade de compostos, incluindo os não orgânicos (sulfato, nitrato de amônio, íons de hidrogênio e metais) e orgânicos (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos) que podem circular de forma sistemática no laboratório e influenciar a ativação dos gametas, fecundação e desenvolvimento embrionário (LEGRO et al., 2010).

Diversos parâmetros relacionados às condições ambientais na produção de embriões *in vitro*, tais como nutrientes, meios de cultura estéreis, temperatura, pH, qualidade da água, composição da atmosfera, livre de microorganismos e poluentes, principalmente os compostos orgânicos voláteis (VOC - do inglês *volatile organic compounds*), têm sido relativamente padronizados nos últimos anos em laboratórios de produção de embriões *in vitro*, tanto humanos como animais (WILDING et al., 2007; SOUZA et al., 2009).

De acordo com a RDC nº33 (Agência Nacional da Vigilância Sanitária – ANVISA, 2006), que designa a regulamentação de condições mínimas de trabalho em laboratórios de FIV, o sistema de climatização laboratorial deve manter uma pressão positiva em relação aos ambientes adjacentes; condições de controle da temperatura entre 21°C a 24°C; umidade relativa do ar entre 40% e 60%; vazão mínima de ar total de 45(m³/h)/m²; vazão mínima de ar exterior de 15(m³/h)/m² e filtragem mínima no insuflamento com filtros G3+carvão ativado+F8 (ANVISA, 2006).

A insuflação de ar do sistema de climatização nesta sala deve ser efetuada de forma a não interferir no fluxo do equipamento utilizado para a manipulação de amostras, como fluxo laminar e incubadoras e a manipulação das amostras somente deve ser efetuada em uma área limpa classificada, no mínimo, como ISO Classe 5, segundo a norma NBR/ISO 14644-1 da Associação Brasileira

de Normas Técnicas (ABNT). Pela definição, Sala Limpa Classe 100/ISO 5 é uma sala na qual a concentração de partículas < 0,5 micron não seja maior que 100 por pé cúbico ou maior que 3.520 por metro cúbico de área do laboratório, como demonstrado no quadro 1 (ABNT, 2005).

Limite máximo de concentração (partículas/m³ de ar)						
ISO	0,1 <i>um</i>	0,2 <i>um</i>	0,3 <i>um</i>	0,5 <i>um</i>	1 <i>um</i>	5 <i>um</i>
ISO 1	10	2				
ISO 2	100	24	10	4		
ISO 3	1000	237	102	35	8	
ISO 4	10000	2370	1020	352	83	
ISO 5	100000	23700	10200	3520	832	29
ISO 6	1000000	237000	102000	35200	8320	293
ISO 7				352000	83200	2930
ISO 8				3520000	832000	29300
ISO 9				35200000	8320000	293000

Fonte: Adaptado de ABNT (2005).

Quadro 1- Classificação ISSO

Para a obtenção dessas condições, o Banco de Células e Tecidos Germinativos (BCTG) deve utilizar uma das opções de cabine de segurança biológica Classe II Tipo A, módulo de fluxo unidirecional, ou sala classificada como ISO classe 5 no mínimo, segundo as orientações da NBR/ISO 14644-4 da ABNT. Neste caso, o BCTG deve obrigatoriamente possuir uma antecâmara de acesso à sala de processamento, além do vestiário de paramentação.

A sala de paramentação deve estar localizada na antissala do laboratório de FIV e deve conter as vestimentas necessárias para a realização de procedimentos com o mínimo possível de contaminação. Devem ser utilizadas touca,

máscara, roupa cirúrgica e burca para o completo isolamento do embriologista (ANVISA, 2006) (Figura 1).



Figura 1- Imagem ilustrativa da paramentação utilizada em laboratórios de fertilização *in vitro*.

Fonte: Adaptado de FCE Pharma, 2010.

Obviamente, há muitos fatores que desempenham um papel no sucesso de TRA. O ambiente interno das incubadoras onde ocorreu a fertilização e desenvolvimento embrionário no laboratório é um elemento-chave para o desenvolvimento embrionário, porém, se comparado a outros fatores, tem sido pouco estudado ao longo dos anos (HIGDON; BLACKHURST; BOONE, 2008).

Sabe-se que os mamíferos são protegidos por seus sistemas imunológico, digestivo e epitelial contra agentes ambientais a que estão expostos em pequena e larga escala. Estudos recentes sobre toxicologia mostram que os mecanismos de absorção de substâncias tóxicas podem agir diretamente no oócito, com efeitos sobre o embrião após a fertilização, de sorte que se deve ter atenção aos centros de reprodução humana localizados em centros urbanos com alto índice de poluição ambiental ou próximos a áreas industrializadas (SOUZA et al., 2009).

Considerando-se que cerca de 95% do ar interno na incubadora vem da abertura da porta e apenas 5% do cilindro de CO₂ utilizado no sistema, pode-se dizer que a presença de poluentes oriundos de variadas fontes presentes na sala podem interferir no desenvolvimento *in vitro* de embriões (SOUZA et al., 2009).

Sabe-se da importância da qualidade do ar para um ambiente estéril, equilibrado com o mínimo de interferentes possível para a cultura celular no ambiente interno da incubadora, porém não há uma padronização entre os embriologistas com relação a filtros utilizados e a procedimentos básicos de limpeza das incubadoras. Cada laboratório possui os próprios protocolos, e os mantêm a partir do momento em que apresentam bons resultados de desenvolvimento embrionário e gravidez (HIGDON; BLACKHURST; BOONE, 2008).

Com a função de prevenir o crescimento bacteriano e fúngico, o sistema de filtração das incubadoras é dotado de uma disposição sólida de cobre interior, com o objetivo de proporcionar proteção de eventual contaminação passiva. Portanto, uma das opções para filtros internos de incubadoras é a câmara de fluxo de ar do filtro HEPA utilizadas em culturas embrionárias, que filtra continuamente todo o volume da câmara de ar a cada 60 segundos para evitar a contaminação da superfície. O sistema HEPA de filtração remove contaminantes do ar, que podem entrar na incubadora sobre aberturas de porta de rotina, e é a principal fonte de contaminação de células em laboratório de cultura.

Atualmente está sendo utilizado o sistema de filtração VOC disponível para acrescentar o sistema HEPA, eliminando os vapores orgânicos voláteis que podem causar riscos às culturas sensíveis. Sua tecnologia de peneira molecular captura produtos químicos potencialmente tóxicos comumente encontrados em produtos como solventes de laboratório, agentes de limpeza e de plástico, que podem de alguma forma entrar no ar injetado para a incubadora no momento da manipulação (THERMO SCIENTIFIC, 2010) (Figura 2).

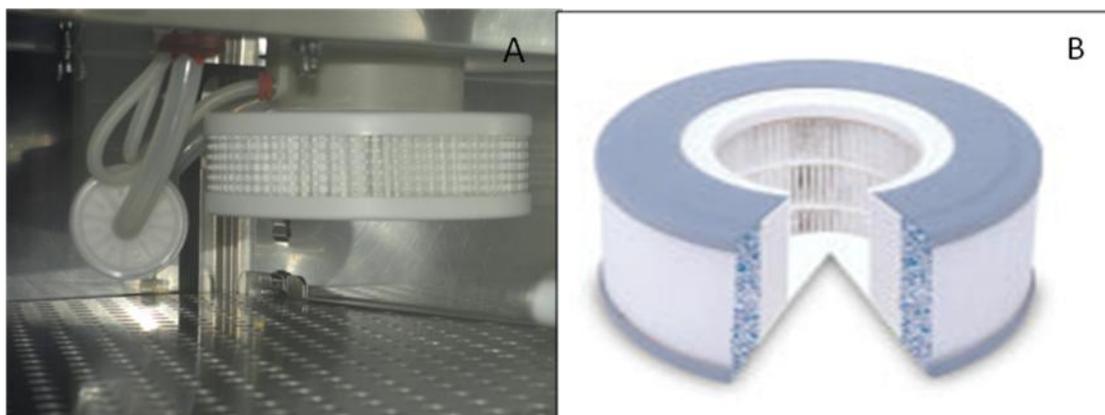


Figura 2- A- Imagem representativa do filtro HEPA-VOC acoplado à incubadora de CO₂. B- Imagem representativa do filtro HEPA-VOC (HEPA Air-Filter - VOC) em detalhe.

Fonte: Adaptado de Thermo Scientific Forma Steri-Cycle CO₂, 2010.

Sabendo que o desenvolvimento *in vitro* de embriões humanos está relacionado, entre outros fatores, às condições da cultura, a qualidade do ar no laboratório de FIV tem recebido maior atenção, principalmente após a publicação da RDC 33 com a regulamentação de condições mínimas de trabalho em laboratórios de TRA. A qualidade do ar vem sendo relacionada aos resultados de FIV, e os laboratórios têm instalado unidades de filtração especializadas, com a intenção de melhorar a qualidade do ar na cultura de embriões (HIGDON; BLACKHURST; BOONE, 2008; SOUZA et al., 2009).

De acordo com Battaglia, Khabani e Moore (2001), são estas unidades de filtração dispendiosas e, portanto, é prudente determinar se são eficazes em cada laboratório, pois a eficácia da utilização deste sistema ainda não é totalmente conclusiva.

Nos encontros internacionais de Medicina Reprodutiva, trabalhos sobre este assunto têm sido apresentados, correlacionando a presença de poluentes no ar do laboratório de FIV com os resultados de TRA, apresentando piores resultados

quando expostos aos compostos orgânicos voláteis (VOC) (WORRILOW; HUYNH; PETERS, 2000; WORRILOW et al., 2002; ESTEVES; GOMES; VERZA JUNIOR, 2004).

Os VOC são compostos químicos orgânicos que têm alto nível de pressão de vapor suficiente para vaporizar e entrar na atmosfera. São numerosos e variados, de origem natural ou artificial, podendo ser nocivos e tóxicos (COSTA; COSTA, 2002). Benzeno, tolueno, xilenos, n-butanol e metilisobutilcetona são exemplos de VOC comumente encontrados no ar como resultado de pintura, provenientes da emissão de solventes orgânicos da tinta, resinas e produtos de polimentos. Estas substâncias químicas atuam predominantemente sobre o sistema nervoso central como depressoras, podendo causar desde sonolência, tontura, fadiga até narcose e morte (TAKIGAWA; ENDO 2006).

A concentração de VOC pode ser ainda maior em ambientes internos, privados de um adequado sistema de renovação de ar, ultrapassando os limites aceitáveis para a saúde humana. Trabalhadores de ambientes internos têm mais sintomas de doenças correlatas ao ambiente laboratorial, como irritação de olhos, boca e nariz, dor de cabeça, fadiga e até asma ocupacional (ANDERSON et al., 2007).

Atenção tem sido direcionada para VOC e seu papel na alteração da cultura de embriões humanos. Para evitar que VOC provenientes de reagentes, produtos de limpeza ou materiais atuem sobre células germinativas e embriões, as incubadoras são dotadas de filtros capazes de eliminar do ar essas substâncias. O carvão ativado possui poros de tamanhos diversos que criam um campo de atração para moléculas ricas em elétrons, que ficam retidas. Os VOC, como o benzeno e o tolueno, são efetivamente removidos pelo carvão ativado. Outros gases tóxicos, como os aldeídos, são efetivamente removidos pelo permanganato de potássio, que os oxida, causando sua degradação química (FORMAN et al., 2004).

Cohen e cols. concluíram que o ar extraído de algumas incubadoras revela concentrações de VOC 100 vezes maiores do que aqueles obtidos a partir de incubadoras em operação do mesmo fabricante. Assim, conclui-se que a emissão de

gases depende de ambiente e produtos laboratoriais utilizados e devem ser preparados antes do uso (COHEN et al., 1997).

Foi demonstrado em outros estudos que o uso de carvão ativado em incubadoras reduz a concentração de VOC (WEISSENBORN; MOLLER; NEULEN, 2001). Outro estudo comparou a qualidade do ar no laboratório de FIV antes e após o deslocamento do laboratório para outro espaço físico. Um estudo comparativo entre dois laboratórios com sistema de ar (ISO 5) classe 100 e um de (ISO 6) classe 1000 mostrou que, após a instalação de classe 100, houve melhoria no desenvolvimento do embrião, maior taxa de clivagem e taxa de gestação e menor taxa de aborto (ESTEVES; GOMES; VERZA JUNIOR, 2004). Estudos anteriores sugeriram que o sistema classe 100 é o que mais se assemelha ao ambiente estéril *in vivo* (WORRILOW; HUYNH; PETERS, 2000).

Assim, apesar de ainda não totalmente definido, sugere-se que as taxas de fertilização *in vitro* de oócitos, taxa de clivagem de embriões e até resultados clínicos sejam otimizadas em um ambiente com qualidade do ar elevada (WORRILOW; HUYNH; PETERS, 2000; ESTEVES; GOMES; VERZA JUNIOR, 2004).

A manutenção da qualidade do ar no ambiente laboratorial e das incubadoras de CO₂ em laboratórios de FIV é uma prática já adotada pelas sociedades internacionais de Medicina Reprodutiva (GIANAROLI et al., 2000; MAGLI et al., 2008) e recentemente o Brasil passou a integrar este grupo por meio da RDC 33 (ANVISA, 2006), e manuais das sociedades brasileira (ESTEVES; CATAFESTA; MACIEL, 2004) e Latino-americana (RedLARA, 2006). A partir de então, os centros brasileiros passaram a adotar medidas que satisfaçam tais normativas, e melhores resultados nos tratamentos passam a ser observados (ESTEVES; GOMES; VERZA JUNIOR, 2004; ESTEVES; VERZA JUNIOR; GOMES, 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os resultados laboratoriais de ciclos de fertilização *in vitro* com injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), utilizando dois tipos de filtragem em incubadoras de CO₂, o tradicional filtro HEPA para partículas de ar e filtro VOC de alta eficiência com carvão ativado.

2.2 Específicos

Os resultados dos ciclos de FIV foram comparados entre aqueles cujos embriões foram cultivados em incubadora de CO₂ equipada com filtro HEPA, e aqueles cultivados em incubadora de CO₂ equipada com filtro VOC. Foram avaliados especificamente os resultados de taxas de fertilização normal, clivagem embrionária, embriões grau A e gestação.

3 CASUÍSTICA E MÉTODO

3.1 Local do Estudo e Aspectos Éticos

Este estudo foi desenvolvido junto ao Departamento de Saúde Materno-Infantil da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – Ceará, em parceria com a Clínica de Reprodução Humana CRIAR, de Teresina – Piauí.

A Clínica de Reprodução Humana CRIAR é um centro privado para o tratamento da infertilidade por técnicas de reprodução assistida cuja equipe é composta por cinco médicos especialistas em reprodução humana assistida, e três embriologistas. A demanda da clinica realiza em média 200 ciclos de FIV por ano.

Os aspectos éticos que nortearam este experimento estão baseados nas Normas de Pesquisa em Saúde, da Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde - Sobre Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CFM, 1992; CNS, 1996).

Todas as pacientes foram completamente esclarecidas sobre os objetivos do estudo e possíveis riscos. Cada participante assinou um termo de consentimento livre e informado, confirmando sua anuência em participar voluntariamente deste estudo.

Não houve qualquer conflito de interesses na realização deste estudo, pois nenhum procedimento adicional foi realizado além daqueles estabelecido nos ciclos de FIV, aos quais as pacientes estavam sendo submetidas. Também não houve qualquer custo adicional relacionado ao estudo.

3.2 Desenho do Estudo

Este trabalho consiste de um estudo observacional prospectivo, onde foram incluídos ciclos de FIV realizados na Clínica de Reprodução Humana CRIAR, no período de janeiro de 2008 a setembro de 2009. As pacientes que concordaram em participar do estudo realizaram ciclo de FIV como de rotina na Clínica de Reprodução Humana CRIAR e tiveram os embriões cultivados em incubadora de CO₂ equipada com um dos filtros: HEPA ou VOC.

A Clínica de Reprodução Humana CRIAR possuía quatro incubadoras de CO₂, Thermo Forma (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA). As incubadoras 1 e 2 estavam equipadas com filtro HEPA e outras duas com filtro VOC (Figuras 3 e 4).



Figura 3- A- Imagem do laboratório de fertilização *in vitro* da Clínica de Reprodução Humana CRIAR. B- Imagem da parte externa da incubadora de CO₂.



Figura 4- A e B- Imagem da parte interna das incubadoras de CO₂ do laboratório de fertilização *in vitro* da Clínica de Reprodução Humana CRIAR.

A seleção da incubadora para cada participante do estudo foi cega para paciente e respectivo médico, e realizada seguindo a ordem de entrada de cada paciente no estudo, destinando os embriões para uma das quatro incubadoras de CO₂ disponíveis em ordem crescente. Apenas os profissionais responsáveis pelo Laboratório de Embriologia tiveram acesso à identificação da incubadora para cada paciente.

3.3 População do Estudo

Foram avaliados no estudo 70 ciclos de FIV realizados na Clínica de Reprodução Humana CRIAR, no período de janeiro de 2008 a setembro de 2009. Os ciclos de FIV incluídos no estudo deveriam satisfazer os seguintes critérios de inclusão:

casais com história de infertilidade, definida pela ausência de gravidez após 12 meses de relações sexuais regulares sem utilização de método contraceptivo;

não utilizar doação de oócitos ou embriões; e

concordar em participar do estudo voluntariamente e assinar termo de consentimento livre e esclarecido

Foram excluídos do estudo os ciclos de FIV com as seguintes características:

pacientes que não responderam a indução da ovulação com gonadotrofinas;

pacientes que se submeteram a aspiração folicular, porém não tiveram oócitos recuperados; e

pacientes que se submeteram a aspiração folicular e obtiveram oócitos, porém não houve fertilização destes e, portanto não tiveram embriões a serem cultivados.

3.3.1 Estimulação ovariana controlada e ICSI

Todos os casais foram submetidos à investigação de infertilidade por médico especialista em Reprodução Humana, e realizaram ciclo de FIV com injeção

intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI), de acordo com protocolos-padrão da Sociedade Brasileira de Reprodução Humana (2000).

O bloqueio hipofisário foi realizado com agonista ou antagonista do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) seguido por estímulo ovariano controlado (EOC) utilizando FSH-recombinante (FSH-r, Gonal-F® - Merck-Serono). O EOC foi monitorado por dosagens séricas de estradiol e ultrassonografias transvaginais seriadas. Quando a paciente apresentou dois ou mais folículos com diâmetro igual ou superior a 16 mm, foram administrados 250 µg de gonadotrofina coriônica humana-recombinante (hCG-r, Ovidrel® - Merck-Serono) para maturação folicular final. A aspiração folicular foi realizada 34-36 horas após a administração do hCG-r.

A aspiração folicular foi realizada sob sedação e guiada por ultrassonografia (Figura 5). O fluido folicular coletado foi transferido para uma placa de Petri, onde os oócitos foram identificados e coletados.

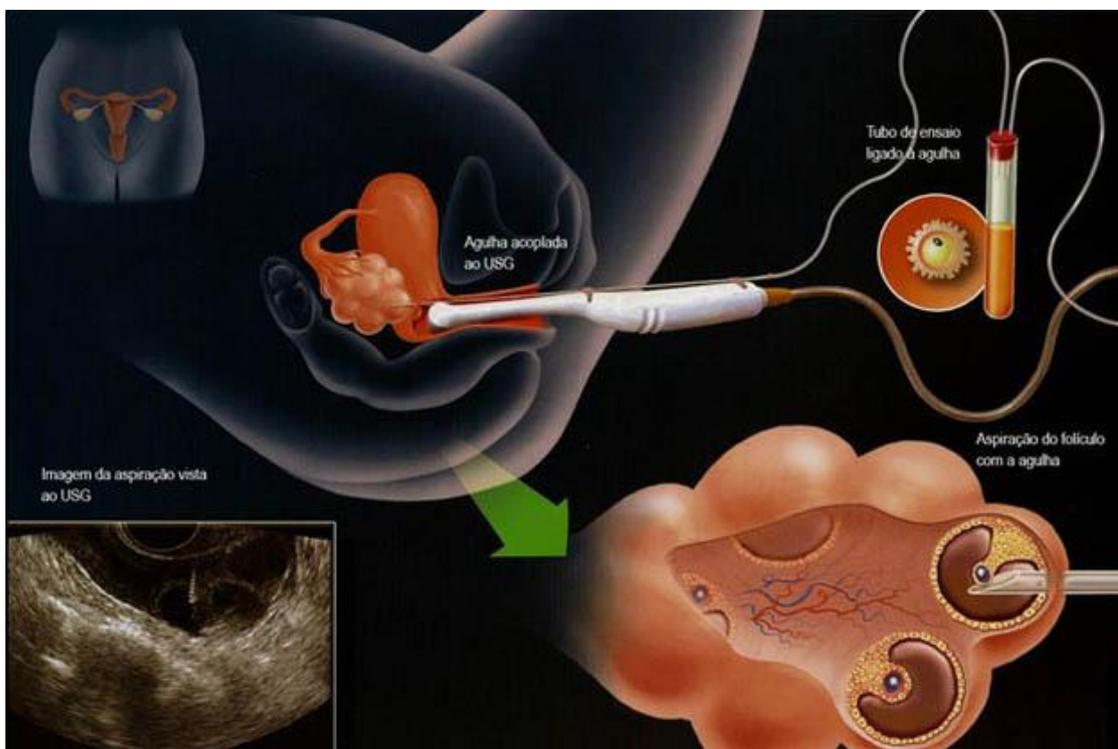


Figura 5- Esquema representativo do procedimento de aspiração folicular para a recuperação de oócitos em ciclos de fertilização *in vitro*.

Fonte: Adaptado de http://www.vivita.com.br/images/coleta_de_ovulos.jpg

Após a desnudação, os oócitos foram classificados quanto ao grau de maturação, e aqueles que se encontravam em estágio de metáfase II (MII) (Figura 6A) foram submetidos à ICSI (Figura 6B), segundo técnica-padrão descrita por Palermo e cols. (PALERMO et al., 1992), utilizando microscópio acoplado a sistema de microinjeção (Figura 6C).

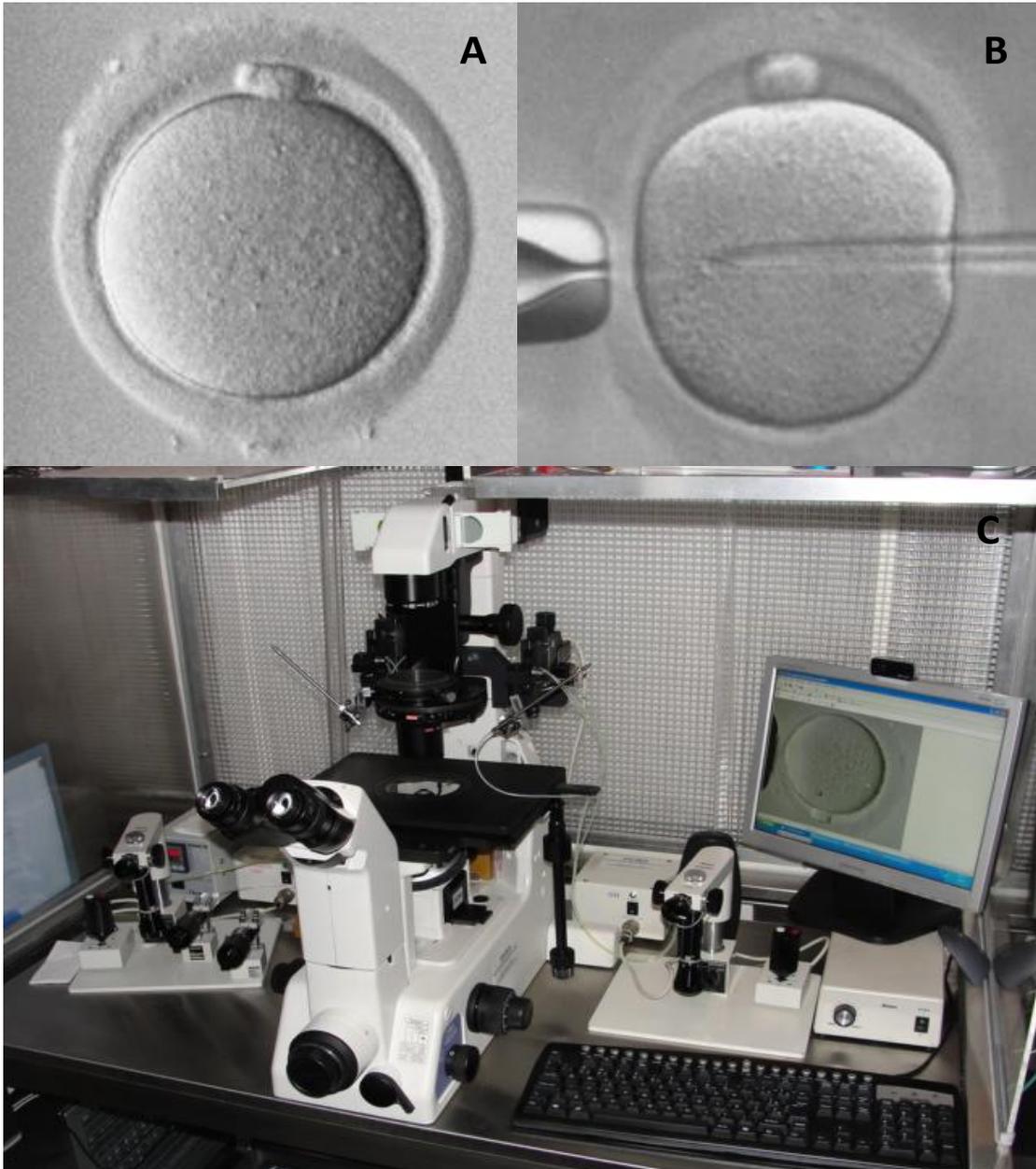


Figura 6- A- Imagem representativa de oócito em metáfase II (MII). B- Imagem representativa da injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). C- Micromanipulador utilizado para procedimento de ICSI do laboratório de fertilização *in vitro* da Clínica de Reprodução Humana CRIAR.

Os oócitos injetados foram incubados a 37°C em ambiente com 5% de CO₂, equipadas com filtros HEPA ou VOC de acordo com desenho do estudo (item 3.4), em gota de 50 µL de meio de cultura G1 (Vitrolife, Suíça) suplementado com 10% de albumina sérica humana (HSA-Human Seric Albumin, Irvine Scientific, EUA) coberto por óleo mineral (Ovoil, Vitrolife, Suíça) previamente equilibrado para temperatura e pH.

No primeiro dia após a ICSI, foi verificada a fertilização normal, definida pela presença de dois prónucleos (2PN) e dois corpúsculos polares (VEECK, 1999) (Figura 7). Foi considerada neste estudo a taxa de fertilização normal, calculada pela razão entre o número de oócitos com fertilização normal e o número total de oócitos injetados e intactos por paciente.



Figura 7- Imagem representativa de oócito com fertilização normal (pré-embrião), definida pela presença de dois pronúcleos (2PN) e dois corpúsculos polares

Nos dias subsequentes, os embriões foram avaliados quanto à clivagem e classificados de acordo com características morfológicas. Foi considerada neste estudo a taxa de clivagem, definida pela razão entre o número de embriões clivados e o número de oócitos com fertilização normal (VEECK, 1999).

A classificação embrionária foi realizada utilizando-se o mesmo padrão para todos os ciclos, levando-se em consideração o número e a simetria dos blastômeros e porcentagem de fragmentação. No segundo e terceiro dia do desenvolvimento embrionário, foram considerados embriões de alta qualidade, grau A, aqueles com dois a quatro ou mais de seis blastômeros simétricos, respectivamente nos dias 2 e 3 do desenvolvimento; e fragmentação menor do que 5% (VEECK, 1999) (Figura 8).

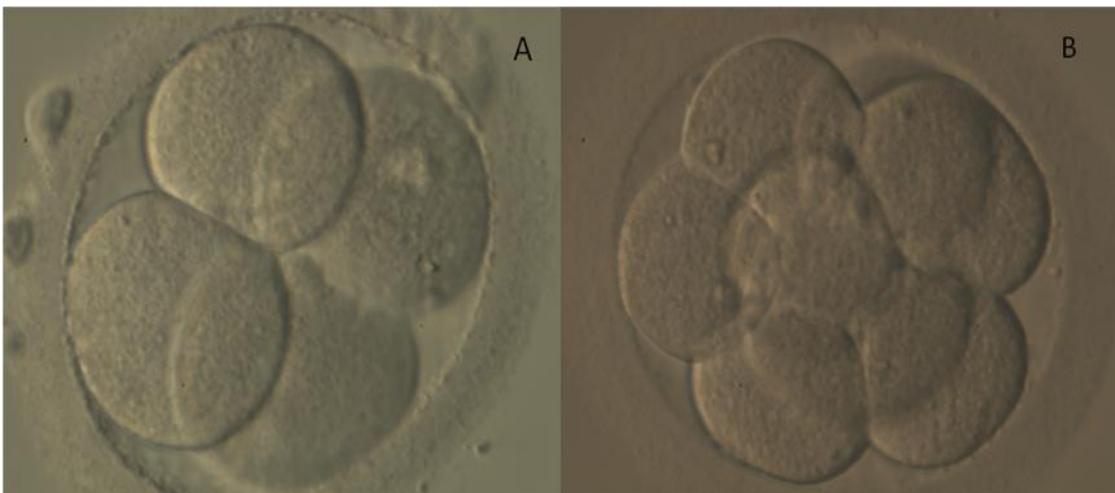


Figura 8- A- Imagem representativa de embrião grau A no segundo dia do desenvolvimento embrionário, com quatro blastômeros simétricos, sem fragmentação. B- Imagem representativa de embrião grau A no terceiro dia do desenvolvimento embrionário, com oito blastômeros simétricos, sem fragmentação

De um a quatro embriões foram transferidos para a cavidade uterina das pacientes no segundo ou terceiro dia do desenvolvimento embrionário, de acordo com critérios médicos e laboratoriais para cada ciclo, como realizado na rotina.

A gestação foi diagnosticada pela dosagem sérica de β -hCG, 12 dias após a transferência embrionária. A gestação clínica foi confirmada por ultrassonografia, pela presença de saco gestacional com batimento cardíaco, quatro a cinco semanas após a transferência embrionária.

3.4 Análise dos Dados

Foram inicialmente incluídos no estudo 160 ciclos, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão pré estabelecidos, resultando em 75 ciclos nos quais os embriões foram cultivados em incubadora de CO₂ equipada com filtro HEPA, os quais constituíram o grupo HEPA; e 85 ciclos cujos embriões foram cultivados em incubadora de CO₂ equipada com filtro VOC, compuseram grupo VOC.

Os dados clínicos dos casais e resultados dos ciclos de FIV foram obtidos a partir das fichas clínicas das pacientes, as quais foram pareadas de acordo com a idade, fator de infertilidade, protocolo de bloqueio hipofisário e origem e qualidade do sêmen utilizado na ICSI para os grupos HEPA e VOC. Apesar de todos os casais incluídos no estudo estarem de acordo com os critérios de inclusão e exclusão preestabelecidos, os grupos não eram homogêneos quanto à etiologia da infertilidade, origem e qualidade do sêmen, idade das pacientes e protocolo de bloqueio hipofisário utilizado.

Já que os itens citados são relevantes para que os resultados laboratoriais dos ciclos de FIV sejam comparáveis, foi realizado o pareamento dos grupos de estudo, de forma que para cada ciclo incluído no grupo HEPA, um ciclo com mesma etiologia da infertilidade, origem e qualidade do sêmen, faixa de idade das pacientes e protocolo de bloqueio hipofisário era incluído no grupo VOC. Os ciclos que não apresentaram possibilidade de pareamento entre os grupos foram

excluídos. Após o pareamento, cada grupo passou a ser constituído de 35 pacientes, com as mesmas características, totalizando 70 ciclos analisados.

Os dados foram submetidos a uma análise descritiva e estatística, utilizando *software* Minitab 14 for Windows (Minitab, EUA). A análise descritiva incluiu o perfil demográfico das pacientes, assim como as características gerais dos ciclos de ICSI. Os dados numéricos foram apresentados como média e erro-padrão da média (EPM) e comparados utilizando teste t de Student pareado, e os dados categóricos foram apresentados como percentagem, e analisados pelo teste de Qui-quadrado. Foi considerada diferença estatisticamente significativa quando valor de $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

As incubadoras foram reguladas para manter temperatura a 37,0 °C, com ambiente a 5,0% de CO₂, e o pH dos meios de cultura no ambiente da incubadora deve manter-se neutro. Foi realizado monitoramento por meio de registros diários das temperaturas e níveis de CO₂, e registros semanais de pH dos meios de cultura, os quais devem se manter estáveis. As médias dos registros de monitoramento das incubadoras CO₂, bem como coeficiente de variação (CV) e comparação entre as incubadoras equipadas com filtro HEPA e VOC estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Registros de monitoramento das incubadoras de CO₂ no período do estudo

	GRUPO-HEPA		GRUPO-VOC		p*
	Média ± EPM	CV	Média ± EPM	CV	
Temperatura (°C)	37,05 ± 0,02	0,20%	37,06 ± 0,03	0,25%	0,729
Concentração de CO₂	5,47 ± 0,03	2,15%	5,52 ± 0,03	2,29%	0,150
pH	7,25 ± 0,02	0,50%	7,29 ± 0,02	0,63%	0,434

* teste t de Student

Fonte: elaboração própria com os dados da pesquisa direta.

Em relação à etiologia da infertilidade dos casais incluídos nos estudo após o pareamento, observou-se que a maioria apresentava fator de infertilidade masculina (38,6%), seguido por infertilidade idiopática (21,4%), obstrução tubária (20,0%), fatores associados (14,3%) e endometriose (5,7%) (Figura 9).

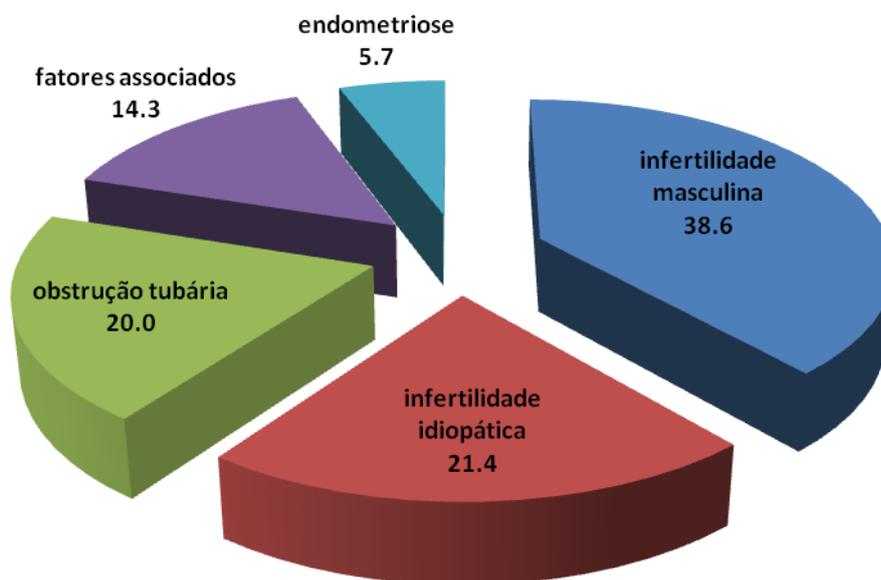


Figura 9- Fatores de infertilidade dos casais incluídos no estudo, após pareamento

Fonte: elaboração própria com os dados da pesquisa direta.

Cinquenta casais (71,4%) estavam realizando o primeiro ciclo de ICSI, dez realizaram o segundo ciclo (14,3%) e dez casais efetivaram o terceiro ou quarto ciclos de ICSI (14,3%).

A maioria das pacientes utilizou bloqueio hipofisário com agonista do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (82,9%) e espermatozóides ejaculados para a ICSI (90,0%). A Tabela 2 mostra as características gerais dos casais e dos ciclos de ICSI de acordo com os grupos estabelecidos. Não houve qualquer diferença significativa entre os grupos.

Tabela 2- Características gerais dos casais e ciclos de ICSI de acordo com grupos de estudo

Características gerais	GRUPO-HEPA (Média ± EPM)	GRUPO- VOC Média ± EPM)	p*
Idade da mulher (anos)	32,3 ± 0,8	32,7 ± 0,7	0,173
Idade do homem (anos)	38,1 ± 1,8	35,8 ± 1,1	0,250
Dose total de FSH-r administrada (UI)	1958,3 ± 94,7	2032,1 ± 88,6	0,533
Concentração sérica de estradiol no dia do hCG	2759,4 ± 451,6	2721,4 ± 433,9	0,960
Nº de folículos > 15mm no dia do hCG	8,3 ± 0,7	9,7 ± 0,8	0,151
Nº oócitos obtidos	11,7 ± 1,9	12,7 ± 1,5	0,677
Nº de embriões obtidos	5,2 ± 0,5	6,1 ± 0,7	0,337

* teste t de Student pareado

Fonte: Elaboração própria. Dados da pesquisa

A taxa de oócitos maduros também foi semelhante entre os grupos (HEPA: 83,5% *versus* VOC: 75,5%; p=0,957). A partir do fato dos grupos terem se apresentado semelhantes quanto ao número de oócitos obtidos, taxa de oócitos maduros e número de embriões, é possível inferir que a quantidade de placas preparadas para o cultivo embrionário também tenha sido semelhante entre os grupos. Como consequência, supõe-se que a manipulação das incubadoras em relação à frequência de abertura e fechamento das mesmas não tenha variado, mantendo, assim, condições médias semelhantes de entrada de ar e temperatura nas incubadoras para os dois grupos estudados.

Em seguida, foram comparados os resultados de fertilização e clivagem embrionária de acordo com o tipo de filtro utilizado na incubadora de CO₂, não tendo sido observadas diferenças entre os grupos HEPA e VOC (Figura 10).

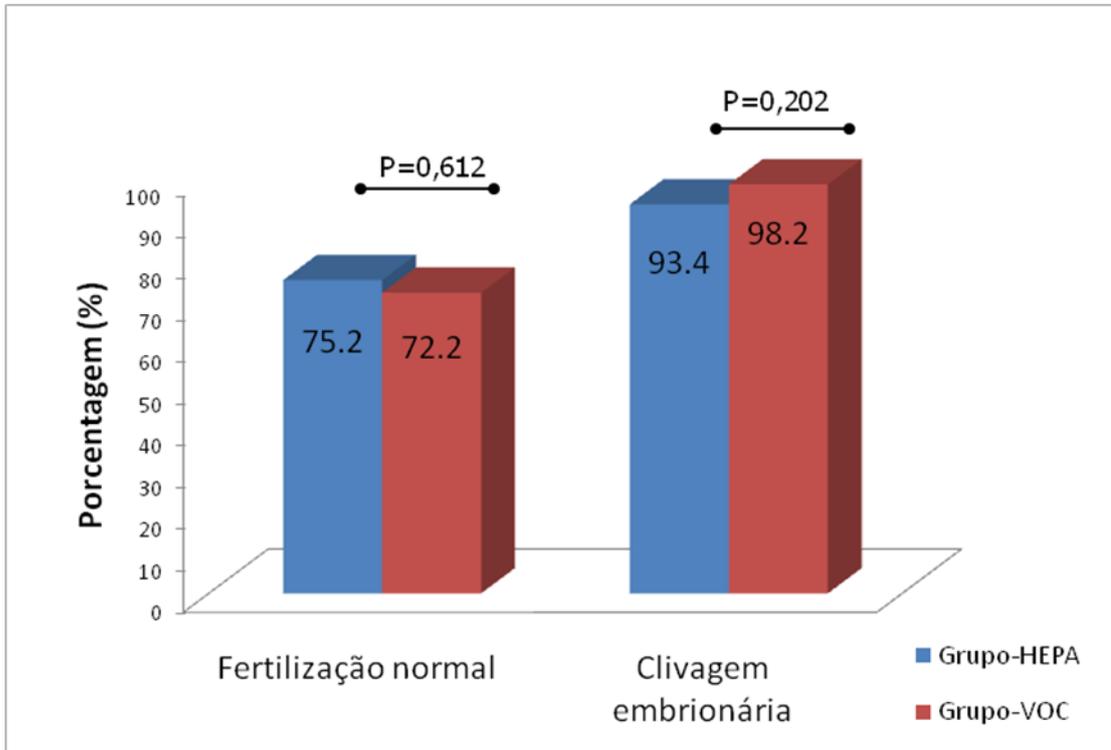


Figura 10- Comparação dos grupos HEPA e VOC quanto aos resultados de fertilização normal e clivagem embrionária nos ciclos de ICSI

Fonte: Elaboração própria. Dados da pesquisa

Apesar de não se haver observado diferenças entre os grupos quando comparadas as taxas de fertilização normal e clivagem embrionária; ao se avaliar a proporção de embriões grau A por grupo de estudo, notou-se uma diferença estatisticamente significativa, pois um maior número de embriões grau foi obtido quando cultivados em incubadora de CO₂ equipada com filtro VOC (Figura 11).

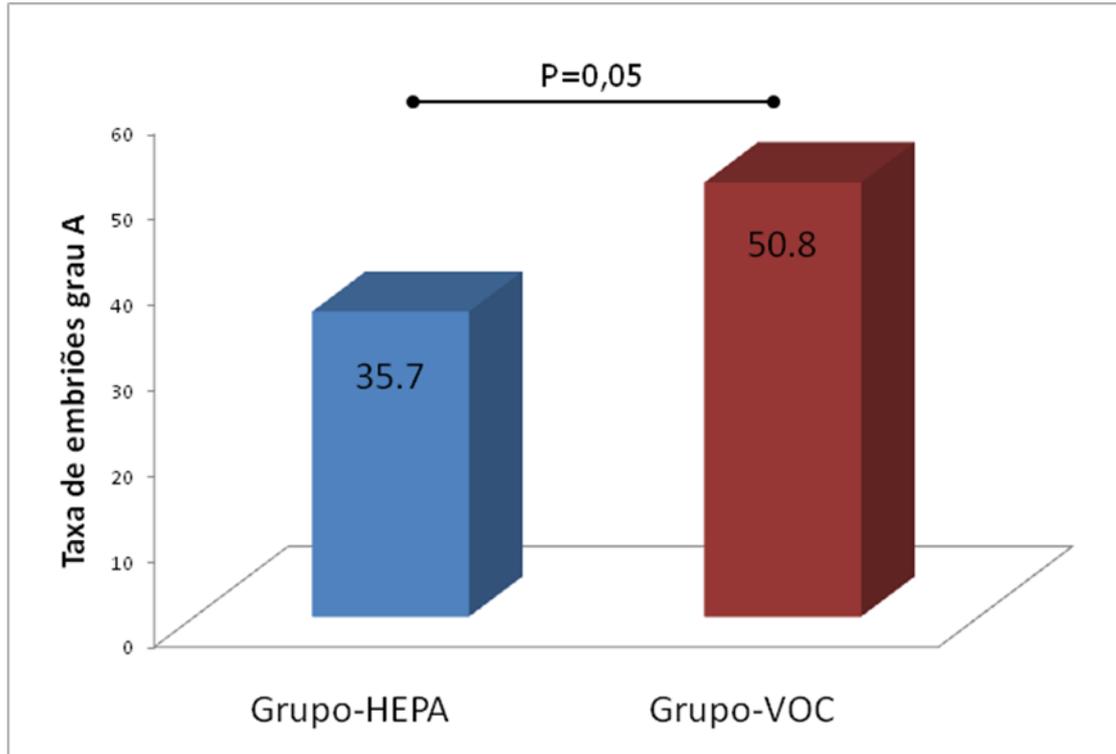


Figura 11- Taxa de embriões grau A nos grupos HEPA e VOC

Fonte: Elaboração própria. Dados da pesquisa

Foram selecionados os embriões de melhor qualidade e transferidos em média $2,6 \pm 1,6$ embriões por paciente no grupo HEPA, com 47,9% dos embriões graus A. No grupo VOC foram transferidos em média $3,0 \pm 1,6$ embriões, com 57,2% dos embriões grau A ($p=0,205$ e $p=0,308$, respectivamente). A taxa de gestação clínica para as pacientes do grupo HEPA foi de 42,9% e no grupo VOC de 25,7% ($p=0,129$).

5 DISCUSSÃO

O sucesso da TRA é altamente dependente dos métodos, suprimentos e equipamentos utilizados, além da experiência de médicos e embriologistas da equipe. Apesar, porém, dos vários fatores envolvidos, o ambiente da incubadora onde o embrião se desenvolve *in vitro* até a transferência ao útero materno é crucial (HIGDON; BLACKHURST; BOONE, 2008).

A incubadora deve ter um controle rigoroso quanto à temperatura, qualidade, composição e umidade relativa do ar (HIGDON; BLACKHURST; BOONE, 2008). A frequência com que a incubadora é aberta e o tempo durante o qual os embriões são mantidos fora da incubadora também são fatores críticos para o desenvolvimento embrionário, já que uma redução na exposição dos embriões ao ar ambiente promove desenvolvimento de embriões de melhor qualidade e maior taxa de formação de blastocisto (ZHANG et al., 2010).

Menor tensão de oxigênio na incubadora, o que supostamente proporciona uma diminuição dos efeitos dos radicais livres de oxigênio nos embriões, também parece promover maior sucesso nos ciclos de FIV (MEINTJES et al., 2009). Estas observações corroboram a importância da qualidade do ar da incubadora onde o embrião está exposto durante os dias de cultivo *in vitro*, e, conseqüentemente, dos filtros utilizados para este fim.

A remoção de poluentes do ambiente interno de incubadoras equipadas com filtro VOC, de alta eficiência com carvão ativado, parece fornecer uma camada de proteção mais elevada contra contaminantes do que e o tradicional HEPA para partículas de ar (HIGDON; BLACKHURST; BOONE, 2008).

O objetivo deste estudo foi comparar os resultados laboratoriais dos ciclos de ICSI, quando os embriões foram cultivados em incubadora de CO₂ equipada com filtro HEPA ou VOC. Não foram observadas diferenças na fertilização normal e clivagem embrionária; por outro lado, notou-se que a proporção de embriões grau A,

ou seja, aqueles considerados com maior potencial de implantação, era maior quando cultivados em incubadora de CO₂ equipada com filtro VOC.

Estudo anterior visando a avaliar o desenvolvimento de embriões de mamíferos após a remoção de potenciais poluentes do ambiente da incubadora utilizando filtros VOC, comparado à incubadora com filtro HEPA, mostrou que houve diferença de 6% na taxa de formação de blastocisto a favor da incubadora utilizando filtro VOC (HIGDON; BLACKHURST; BOONE, 2008). Esses autores conseguiram observar resultados significativos somente na cultura embrionária na fase de blastocisto, enquanto neste estudo foi possível notar resultados mais precoces, no segundo e terceiro dias do desenvolvimento embrionário, com uma diferença de 15% na taxa de embriões grau A entre os grupos.

Os achados do estudo ora sob relato não demonstraram qualquer relação entre o filtro da incubadora e resultados clínicos dos ciclos de ICSI. Sabe-se, entretanto, que os resultados de gestação clínica são influenciados por diversos fatores além da qualidade embrionária, e mais especificamente do filtro de ar da incubadora. Entre estes fatores intervenientes estão aqueles relacionados ao paciente, como a idade e a etiologia da infertilidade; ao tratamento, como a fertilização; e inerentes aos profissionais e procedimentos envolvidos, como a habilidade do embriologista, o tipo de cateter e transferência embrionária (RHODES et al., 2005).

Assim, é coerente que não se tenha observado diferenças entre as taxas de gestação, já que diversos outros fatores não controlados neste estudo podem interferir nos resultados e, portanto, não se há de considerar os resultados clínicos como objetivo principal a ser avaliado.

Por outro lado, visando a uma boa utilização das incubadoras no estudo, e com a intenção de reduzir ao máximo os vieses, foram tomadas algumas medidas, como ter sempre um meio de calibração interno, já que a calibração elimina as diferenças de fabricação entre as incubadoras, e até mesmo de incubadoras de um mesmo fabricante (HIGDON; BLACKHURST; BOONE, 2008). Além disso, testes

trimestrais usando placas com meios de cultivo e padronização da posição dos embriões dentro da incubadora foram realizados.

Mantiveram-se registros diários das temperaturas, níveis de CO₂ e pH do meio de cultura, bem como o ambiente da sala em que a incubadora reside de acordo com a orientação para cultura de embriões humanos (ESTEVES; CATAFESTA; MACIEL, 2004; RedLARA, 2006). Tais registros fazem parte da rotina do laboratório e neste estudo contribuiu para certificação de que a única variável diferente entre as incubadoras de CO₂ fosse a mudança de filtro. Qualquer eventual alteração associada tanto com a incubadora como ao ambiente externo a ela foram registrados.

Algumas limitações, contudo, devem ser ressaltadas. As pacientes que compunham a população geral da clínica foram alocadas prospectivamente e controladamente em dois grupos por ordem de inclusão no estudo, de acordo com os critérios de inclusão. As pacientes apresentando algum dos critérios de exclusão foram retiradas do estudo, mas os grupos ainda não eram homogêneos quanto às características das pacientes.

Para evitar que a variabilidade entre os grupos pudesse interferir nos resultados (RHODES et al., 2005), os ciclos foram pareados, levando-se em consideração a idade das mulheres, a etiologia da infertilidade, a origem do espermatozóide utilizado na ICSI e o protocolo de bloqueio hipofisário utilizado. Com o pareamento, apesar de os grupos terem se tornado semelhantes quanto às características das pacientes e dos ciclos de ICSI, o número final de ciclos avaliados tornou-se bastante reduzido.

Este estudo deverá ser continuado, para que um maior número de pacientes possa ser avaliado a fim de confirmar os resultados obtidos até o momento. Para que as muitas variáveis intervenientes dos resultados dos ciclos de FIV sejam controladas, os oócitos de cada paciente deverão ser divididos em dois grupos, sendo que os embriões da mesma paciente sejam cultivados nos dois tipos de incubadora e o desenvolvimento embrionário posteriormente comparado.

Mesmo com o pequeno número de amostra e outras possíveis interferências nos resultados deste estudo, foi possível encontrar resultados significativos quanto à taxa de embriões de alta qualidade, grau A, no segundo e terceiro dias de desenvolvimento, de acordo com a incubadora utilizada. Assim, se pode assegurar que a qualidade do ar da incubadora é de suma importância no desenvolvimento embrionário, e filtros com carvão ativado devem ser utilizados a fim de melhorar os resultados dos ciclos de FIV.

6 CONCLUSÕES

Com suporte nos resultados observados neste ensaio conclui-se que ciclos de fertilização *in vitro* com injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), nos quais são utilizadas incubadoras equipadas com sistema de filtragem de ar do tipo VOC para cultivo embrionário, resulta em melhor resultado laboratorial.

A utilização de incubadoras equipadas com sistema de filtragem de ar do tipo VOC não interfere nas taxas de fertilização normal, clivagem embrionária ou gestação; por outro lado, obtém-se maior taxa de embriões grau A, ou seja, aqueles com maior potencial de implantação.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR/ISO 14644-1**: Salas limpas e ambientes controlados associados. Rio de Janeiro, 2005.

ANDERSON, S. E.; WELLS, J. R.; FEDOROWICZ, A.; BUTTERWORTH, L. F.; MEADE, B. J.; MUNSON, A. E. Evaluation of the contact and respiratory sensitization potential of volatile organic compounds generated by simulated indoor air chemistry. **Toxicol. Sci.**, v. 97, n. 2, p. 355-363, 2007.

ANVISA (Brasil). RDC/ANVISA nº 33, de 17 de fevereiro de 2006. Regulamento técnico para o funcionamento dos bancos de células e tecidos germinativos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/index.htm>>. Acesso em: 25 jul. 2010.

BATTAGLIA, D. E.; KHABANI, A. C. R.; MOORE, D. E. Prospective randomized trial of incubator CODA filtration units revealed no effect on outcome parameters for IVF. **Fertil Steril.**, v. 75, Suppl. 1, p. S6, 2001.

BIGGERS, J. D. Fundamentals of the design of culture media that support human preimplantation development. In: Van BLERKOM, J.; GREGORY, L. (Ed.). **Essential IVF**: basic research and clinical applications. Dordrecht: Kluwer Academic, 2003. p. 291–332.

BIGGERS, J. D.; SUMMERS, M. C. Choosing a culture medium: making informed choices. **Fertil. Steril.**, v. 90, n. 3, p. 473-483, 2008.

BIGOUROUX, V.; ROUSSEL, H.; SOUCHE, A.; BOURREL, R.; SCIORTINO, V. The use of clomiphene citrate in ambulatory medicine practice in the Midi-Pyrenees area: compliance to national guidelines applicable to infertility diagnosis and to prescription and monitoring rules applicable to clomiphene citrate treatments. **Gynecol. Obstet. Fertil.**, v. 32, n. 11, p. 954-960, 2004.

BOIVIN, J.; BUNTING, L.; COLLINS, J. A.; NYGREN, K. G. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. **Hum. Reprod.**, v. 22, n. 6, p. 1506-1512, 2007.

BORGES JÚNIOR, E.; IACONELLI JÚNIOR, A. **I Consenso Brasileiro de Indução de Ovulação em Reprodução Assistida**. [S.l.], 1999.

BRASIL. Senado Federal. Especial Cidadania: dicas de saúde publicadas. **Jornal do Senado**, Brasília, DF, 2005.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA (Brasil). Norma nº 1.358/92. Normas técnicas para utilização das técnicas de reprodução assistida. Disponível em: <http://www.portalmedico.org.br/resolucoes/cfm/1992/1358_1992.htm>. Acesso em: 29 set. 2010.

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). Resolução nº 196/96. Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/bioetica/res19696.htm>>. Acesso em: 29 set. 2010.

COHEN, J.; GILLIGAN, A.; ESPOSITO, W.; SCHIMMEL, T.; DALE, B. Ambient air and its potential effects on conception in vitro. **Hum. Reprod.**, v. 12, n. 8, p. 1742-1749, 1997.

COSTA, M. F.; COSTA, M. A. Exposição ocupacional a compostos orgânicos voláteis na indústria naval. **Quim. Nova**. v. 25, n. 3, 2002.

ESTEVES, S. C.; CATAFESTA, E.; MACIEL, M. C. A. **I Consenso Brasileiro de Embriologia em Medicina Reprodutiva**. São Paulo, 2004. Disponível em: <<http://www.pronucleo.cjb.com.br>>. Acesso em: 29 set. 2010.

ESTEVES, S. C.; GOMES, A. P.; VERZA JUNIOR, S. Control of air pollution in assisted reproductive technology laboratory and adjacent areas improves embryo formation, cleavage and pregnancy rates and decreases abortion rates: comparison between a class 100 (ISO 5) and a Class 1 000 (ISO 6) cleanroom for micromanipulation and embryo culture. **Fertil. Steril.**, v. 82, Suppl. 2, p. S259-260, 2004.

ESTEVES, S. C.; VERZA JUNIOR, S.; GOMES, A. P. Comparison between International Standard Organization (ISO) type 5 and type 6 cleanrooms combined with volatile organic compounds filtration system for micromanipulation and embryo culture in severe male factor infertility. **Fertil. Steril.**, v. 86, n. 3, Suppl. 1, p. S353-S354, 2006.

FCE Pharma. Disponível em:<http://www.sbccc.com.br/revistas_pdfs/ed%2034/34FCE%20Pharma2008.pdf>. Acesso em: 29 set. 2010.

FEBRASGO. **Infertilidade conjugal**: manual de orientação. [S.l.], 1997.

FORMAN, M.; POLANSKI, V.; HORVATH, P.; GILLIGAN, A.; RIEGER, D. Reductions in volatile organic compounds, aldehydes, and particulate air contaminants in an IVF laboratory by centralized and stand alone air filtration systems. **Fertil. Steril.**, v. 82, Suppl. 2, p. S324, 2004.

GIANAROLI, L.; PLACHOT, M.; VAN KOOIJ, R.; AL-HASANI, S.; DAWSON, K.; DEVOS, A.; MAGLI, M. C.; MANDELBAUM, J.; SELVA, J.; VAN INZEN, W. ESHRE guidelines for good practice in IVF laboratories. Committee of the Special Interest Group on Embryology of the European Society of Human Reproduction and Embryology. **Hum. Reprod.**, v. 15, n. 10, p. 2241-2246, 2000.

HIGDON, H. L.; BLACKHURST, D. W.; BOONE, W. R. Incubator management in an assisted reproductive technology laboratory. **Fertil. Steril.**, v. 89, n. 3, p. 703-710, 2008.

HOMAN, G. F.; DAVIES, M.; NORMAN, R. The impact of lifestyle factors on reproductive performance in the general population and those undergoing infertility treatment: a review. **Hum. Reprod. Update**, v. 13, n. 3, p. 209-223, 2007.

LARSEN, U. Research on infertility: which definition should we use? **Fertil. Steril.**, v. 83, n. 4, p. 846-852, 2005.

LEGRO, R. S.; SAUER, M. V.; MOTTLA, G. L.; RICHTER, K. S.; LI, X.; DODSON, W. C.; LIAO, D. Effect of air quality on assisted human reproduction. **Hum. Reprod.**, v. 25, n. 5, p. 1317-1324, 2010.

MAGLI, M. C.; VAN DEN ABBEEL, E.; LUNDIN, K.; ROYERE, D.; VAN DER ELST, J.; GIANAROLI, L. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories. **Hum. Reprod.**, v. 23, n. 6, p. 1253-1262, 2008.

MEINTJES, M.; CHANTILIS, S. J.; DOUGLAS, J. D.; RODRIGUEZ, A. J.; GUERAMI, A. R.; BOOKOUT, D. M.; BARNETT, B. D.; MADDEN, J. D. A controlled randomized trial evaluating the effect of lowered incubator oxygen tension on live births in a predominantly blastocyst transfer program. **Hum. Reprod.**, v. 24, n. 2, p. 300-307, 2009.

NACHTIGALL, R. D. International disparities in access to infertility services. **Fertil. Steril.**, v. 85, n. 4, p. 871-875, 2006.

PALERMO, G.; JORIS, H.; DEVROEY, P.; VAN STEIRTEGHEM, A. C. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. **Lancet**, v. 340, n. 8810, p. 17-18, 1992.

PALERMO, G. D.; COHEN, J.; ALIKANI, M.; ADLER, A.; ROSENWAKS, Z. Intracytoplasmic sperm injection: a novel treatment for all forms of male factor infertility. **Fertil. Steril.**, v. 63, n. 6, p. 1231-1240, 1995.

PERIN, P. M.; MALUF, M.; CZERESNIA, C. E.; NICOLOSI FOLTRAN JANUARIO, D. A.; NASCIMENTO SALDIVA, P. H. Effects of exposure to high levels of particulate air pollution during the follicular phase of the conception cycle on pregnancy outcome in couples undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. **Fertil. Steril.**, v. 93, n. 1, p. 301-303, 2010.

RED LATINOAMERICANA DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA (RedLARA). **Manual de Procedimientos: Laboratorio de Reproducción Asistida**. San Tiago, Chile, 2006.

RHODES, T. L.; MCCOY, T. P.; HIGDON, H. L.; BOONE, W. R. Factors affecting assisted reproductive technology (ART) pregnancy rates: a multivariate analysis. **J. Assist. Reprod. Genet.**, v. 22, n. 9/10, p. 335-346, 2005.

RITZ, B.; WILHELM, M.; HOGGATT, K. J.; GHOSH, J. K. Ambient air pollution and preterm birth in the environment and pregnancy outcomes study at the University of California, Los Angeles. **Am. J. Epidemiol.**, v.166, n. 9, p. 1045-1052, 2007.

ROWE, P. J.; COMHAIRE, F. H.; HARGREAVE, T. B.; MELLOWS, H. J. **WHO Manual for the standard investigation and diagnosis of the infertile couple**. Cambridge, Cambridge University Press, 1993.

SHAPIRO, C. **When part of the self is lost: helping clients heal after sexual and reproductive losses**. San Francisco, Jossey-Bass, 1993.

SOUZA, M. C.; MANCEBO, A. C.; DA ROCHA, C. A.; HENRIQUES, C. A.; SOUZA, M. M.; CARDOSO, F. F. Evaluation of two incubation environments--ISO class 8 versus ISO class 5--on intracytoplasmic sperm injection cycle outcome. **Fertil. Steril.**, v. 91, n. 5, p. 1780-1784, 2009.

TAKIGAWA, T.; ENDO, Y. Effects of glutaraldehyde exposure on human health. **J. Occup. Health**, v. 48, n. 2, p. 75-87, 2006.

THERMO SCIENTIFIC FORMA® DIRECT HEAT CO2 INCUBATORS. 2010. Disponível em:<
http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Product/productPDF_7382.pdf>. Acesso em: 29 Sept. 2010.

VAN RUMSTE, M. M.; EVERS, J. L.; FARQUHAR, C. M. Intra-cytoplasmic sperm injection versus conventional techniques for oocyte insemination during in vitro fertilisation in patients with non-male subfertility. **Cochrane Database Syst Rev.**, n. 2, CD001301, 2003.

VEECK, L. L. **An Atlas of Human Gametes and Conceptuses**: An Illustrated Reference for Assisted Reproductive Technology. New York, USA: The Parthenon Publishing Group, 1999.

WEISSENBORN, U.; MOLLER, M.; NEULEN, J. Reduction of volatile organic compound in incubators by activated charcoal. **Hum. Reprod.**, v. 16, Suppl. 1, p. 126, 2001.

WHO. **Infertility**: a tabulation of available data on prevalence of primary and secondary infertility. Geneva, 1991.

WILDING, M.; DI MATTEO, L.; D'ANDRETTI, S.; MONTANARO, N.; CAPOBIANCO, C.; DALE, B. An oocyte score for use in assisted reproduction. **J. Assist. Reprod. Genet.**, v. 24, n. 8, p. 350-358, 2007.

WORRILOW, K. C.; HUYNH, H. T.; BOWER, J. B.; SCHILLINGS, W.; PETERS, A. J. A retrospective analysis: seasonal decline in implantation rates (IR) and its correlation with increased levels of volatile organic compounds (VOC). **Fertil. Steril.**, v. 78, p. S39, 2002.

WORRILOW, K. C.; HUYNH, H. T.; PETERS, A. J. The innovative marriage between classroom and assisted reproductive technologies (ART)—the design, construction and national environmental balancing bureau (NEBB) certification of a prototype class 100/class 10 IVF laboratory cleanroom. **Fertil. Steril.**, v. 74, p. S103, 2000.

ZHANG, J. Q.; LI, X. L.; PENG, Y.; GUO, X.; HENG, B. C.; TONG, G. Q. Reduction in exposure of human embryos outside the incubator enhances embryo quality and blastulation rate. **Reprod. Biomed. Online**, v. 20, n. 4, p. 510-515, 2010.