



UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA

**CRIOPRESERVAÇÃO EMBRIONÁRIA
E NEURO DESENVOLVIMENTO INFANTIL**

Tese apresentada à Universidade Católica Portuguesa
para obtenção do grau de Doutor em Bioética

por

Célia Francisca Iglésias Batista Neves

INSTITUTO DE BIOÉTICA

Novembro 2015



UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA

**CRIOPRESERVAÇÃO EMBRIONÁRIA
E NEURO DESENVOLVIMENTO INFANTIL**

Tese apresentada à Universidade Católica Portuguesa

para obtenção do grau de Doutor em Bioética

Por Célia Francisca Iglésias Batista Neves

Sob orientação de

Senhor Professor Doutor Daniel Serrão, Docente Emérito

da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e UCP

E coorientação de

Senhor Professor Doutor António Jacomo

Senhor Professor Doutor Walter Osswald

INSTITUTO DE BIOÉTICA

Novembro 2015

A presente versão deste trabalho poderá não estar totalmente corrigida para o Novo Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa.

RESUMO

INTRODUÇÃO - O extraordinário avanço da procriação medicamente assistida (PMA) criou um “*Admirável mundo novo*”¹ em que se concretizam muitos sonhos de parentalidade mas onde emergem importantes questões éticas e socio jurídicas.

No universo da fertilização *in vitro* (FIV) só uma minoria dos muitos embriões criados consegue sobreviver aos riscos biológicos e, se houver criopreservação os nascimentos serão reduzidos em cerca de 10%². De cada 100 embriões que chegam a ser transferidos nascem em média 15 crianças e 4 são prematuras ou têm problemas perinatais; das 11 restantes, 2 terão alterações do desenvolvimento (Hansen, M., Kurinczuk, J., et al. – 2013).

Por lei³, a criopreservação de embriões excedentários está limitada a três anos (excecionalmente seis) período após o qual são destruídos ou utilizados em investigação científica mesmo que se pudessem manter viáveis por períodos maiores (Daniel Serrão – 2003) e que tenderiam a aumentar (Papis K., Lewandowski P., et al. -2013). Face a esta realidade cresce a necessidade duma reflexão multidisciplinar alargada tanto mais que 3,5% das gestações em alguns países e 2,1% dos nascimentos em Portugal⁴, já são resultado da PMA. Sendo estas técnicas recentes⁵ **também** não se conhecem os seus efeitos a prazo, nem a nível genético ou epigenético (Wennerholm UB, Söderström-Anttila V, Bergh C. et al. -2009).

Mesmo subestimando os aspectos morais ou éticos, e privilegiando os recursos pragmáticos que viabilizam vidas humanas, evidenciam-se riscos para o ecossistema em

¹ Referência a Aldous Huxley e à célebre obra «Admirável mundo novo» em que o autor descreve de forma assustadoramente profética, não só a tecnologia da PMA como a desumanização das sociedades do futuro

² 11ª Acta da Comissão Nacional da PMA, de 9 de Maio de 2008

³ Lei n.º 32/2006 - PMA. Artigo 9.º - Investigação com recurso a embriões e Artigo 25.º Destino dos embriões

⁴ http://www.cnpma.org.pt/Docs/RELATORIO_ACTIVIDADE_PMA2011.pdf

⁵ Conseguida em 1983 com o nascimento duma criança aparentemente saudável

que vivemos e a necessidade de compatibilizar o progresso científico com a salvaguarda dos direitos fundamentais (ONU/1975) ⁶.

No estudo que realizámos sobre neurodesenvolvimento de crianças cujos embriões estiveram criopreservados, avaliámos uma amostra populacional nascida sem problemas neonatais e preenchida pelos «melhores casos» o que nos levou a omitir dos resultados, a dimensão dos riscos da FIV tais como a prematuridade e as suas consequências. Com outra metodologia porém, a comparação das inevitáveis variáveis teria sido impossível num universo tão escasso. Esta investigação situada no âmbito da Bioética e apoiada pela nossa experiência profissional, procurou contribuir para uma demanda científica que é tão fascinante quanto arriscada e que nem sempre respeita o «*Primado do embrião humano criado in vivo*»⁷

OBJECTIVO – comparar instrumentalmente o neurodesenvolvimento de crianças cujos embriões foram submetidos a criopreservação com outras social e demograficamente idênticas mas sem esse antecedente, no intuito de promover a reflexão ética e o conhecimento nesta área.

MATERIAL E MÉTODOS – Após a seleção da população baseada no modelo das histórias clínicas, definimos os critérios de amostragem e fizemos um estudo de *coorte* analítico e não-experimental, cujo modelo foi comparativo, correlacional e descritivo.

Selecionámos 60 crianças entre os 20 e os 96 meses, com 36 ou mais semanas de idade gestacional (IG) e ausência de patologia perinatal relevante, as quais foram distribuídas por 3 grupos, de acordo com os antecedentes concepcionais:

A amostra índice de conveniência, designada **Grupo A** integrou 19 crianças com criopreservação embrionária nascidas entre janeiro de 2007 e agosto de 2010. Pertencem a um escasso universo de 350 elementos que integra 80 novos casos anuais e

⁶ Declaração sobre o Progresso Científico e Tecnológico no interesse da Paz e em benefício da Humanidade Proclamada pela Assembleia Geral da ONU em 1975 - Resolução n.º 3384 (XXX).

⁷ Analogia com o artigo 2º da declaração de Oviedo, que defende o «*Primado do ser humano*» e diz: “os interesses e o bem-estar do ser humano deverão prevalecer sobre o interesse exclusivo da sociedade ou da ciência”

onde apenas 260 possuem os critérios de amostragem. O recrutamento foi difícil e exigiu uma vasta rede de contactos incluindo as novas redes digitais. A idade média do Grupo A é 51 meses (L 21- 96).

As restantes 41 crianças formaram 2 grupos controle, obtidos de forma tão aleatória quanto possível, num universo mais vasto. O **Grupo B** tem 22 crianças nascidas entre janeiro de 2006 e outubro de 2012 após FIV com transferência a fresco e com idade média de 56 meses (L 33-85). O **Grupo C** integrou 19 crianças de concepção natural, nascidas entre maio de 2007 e março de 2012 e idade média de 48 meses (L 20-85). A FIV dos grupos A e B ocorreu em centros portugueses com tecnologia equiparável.

Na avaliação neuro cognitiva usámos a metodologia de **Ruth Griffiths (EDMG)** e o **Questionário de Capacidades e de Dificuldades (SDQ-Por)** que avalia o comportamento e a socialização⁸. Os dados das avaliações foram protegidos, informatizados em Excel® e exportados para *SPSS 17.0* tendo a sua análise incluído testes paramétricos e não-paramétricos de comparação de grupos e correlações bivariadas. Só ocasionalmente foi possível uma análise multivariada. Nas variáveis qualitativas utilizou-se o Qui quadrado e na presença de frequências baixas (< 5) utilizou-se o teste exato de Fischer para tabelas de dois por dois, maximizando resultados, sem aumentar discriminações. Um valor de $P < 0,05$ foi indicativo de significado estatístico.

Houve crianças com características singulares nos 3 grupos e que não completaram as EDMG aplicadas em condições idênticas pela mesma profissional independente.

RESULTADOS – Apesar do esforço de homogeneização socio demográfica, verificaram-se ligeiras diferenças entre grupos: o sexo masculino prevaleceu no grupo B (6F/16M) e o feminino no C (13F/6M)⁹. No grupo C a idade média, por sexo, difere de forma significativa (42,5 meses no F versus 55,5 no M) sendo $p < 0,04$ e a percentagem de gémeos é maior no grupo A e intermédia no B.

⁸ EDMG = Escalas de Desenvolvimento de Ruth Griffiths, reconhecidas pela “Association for Research in Infant and Child Development”. As definições utilizadas foram as adoptadas internacionalmente e consignadas pelo uso.

⁹ F – feminino e M – masculino

Os grupos A e B (isolados ou associando A+B) e o grupo C, obtiveram os seguintes **resultados gerais e parcelares nas seis subescalas das EDMG** [Legenda – Quociente geral (QG), VM (valor médio), L (limites), SD (desvio padrão)]¹⁰

QG do Grupo A – VM 103,4 (L 86-116) SD 5,48/ Grupo B – VM 107,5 (L 87 -118) SD 5,57/ Grupo A+B – VM 105,76 (L 86-118) SD 5,65/ Grupo C – VM 108,7 (L 102-122) SD 4,47

A – Locomoção/ Desenvolvimento motor: Grupo A – VM 102,63 (L 83-122) SD 6,24/ Grupo B – VM 107,40 (L 79-131) SD 7,21/ Grupo A+B – VM 105,39 (L 79-131) SD 7,21/ Grupo C – VM 113,05 (L 92-140) SD 6,93

B - Desenvolvimento pessoal – social: Grupo A – VM 111,06 (L 95-130) SD 5,92/ Grupo B – VM 112,68 (L 83-131) SD 6,93/ Grupo A+B – VM 112 (L 83-131) SD 6,93/ Grupo C – VM 114,33 (L 96-144) SD 6,93

C – Audição/ Linguagem: Grupo A – VM 104,75 (L 79-143) SD 8,0/ Grupo B – VM 109,09 (L 91-133) SD 6,48/ Grupo A+B – VM 107,26 (L 79-143) SD 8,0/ Grupo C – VM 112,55 (L 74-141) SD 8,18

D - Coordenação olho-mão: Grupo A – VM 98,06 (L 73-117) SD 6,63/ Grupo B – VM 104,90 (L 84 -122) SD 6,16/ Grupo A+B – VM 102,02 (L 73-122) SD 7,0/ Grupo C – VM 99,83 (L 83-118) SD 5,91

E - Realização (performance): Grupo A – VM 103,50 (L 90-121) SD 5,92/ Grupo B – VM 107,50 (L 87 -125) SD 6,16/ Grupo A+B – VM 105,81 (L 87-125) SD 6,16/ Grupo C – VM 107,05 (L 93-121) SD 5,29

F – Raciocínio Prático: Grupo A – VM 100,80 (L 74-117) SD 6,56/ Grupo B – VM 104,81 (L 87 -119) SD 5,66/ Grupo A+B – VM 103,72 (L 74-119) SD 6,70/ Grupo C – VM 104,94 (L 92-117) SD 5

¹⁰ Os valores de cada subescala fornecem dados representativos do quociente intelectual (através duma equação: $IM \times 100 / IC = QI$). O QI geral é obtido através da média dos 6 sub-quocientes.

O SDQ – Por foi respondido pelos pais dos 3 grupos e resultou nos quocientes gerais, parciais e percentagens que estão expostos no quadro.

Resultados do SDQ-Por		Quociente Geral	Emoção	Comportamento	Hiperatividade	Relação	C. Pró-Social
Grupo A T19/A15 (78,94%)	N	10(66,6%)	11(73,3%)	9(60%)	12(80%)	10(66,6%)	12 (80%)
	L	2	2	2	3	0	0
	AN	3	2	4	0	4	2
GrupoB T22/A11 (50%)	N	8 (72,7%)	10(90,9)	7 (63,6%)	8(72,7%)	7(63,6%)	10(90,9%)
	L	-	-	1	-	2	1
	AN	3	1	3	3	2	-
Grupo A+B T41/A26 (63,4%)	N	18(69,2%)	20(76,9%)	15(57,7%)	19(73%)	16(61,5%)	21(80,8%)
	L	2	2	3	3	2	1
	AN	6	3	7	3	6	2
Grupo C T19/A14 (73,68%)	N	10(71,4%)	10(71,4%)	10 (71,4%)	10(71,4%)	10(71,4%)	13 (92,8%)
	L	3	3	1	1	3	1
	AN	1	1	3	3	1	-

Legenda QG = quociente geral; T = total; A = avaliados; N = normal; L = limite; AN = Anormal;

DISCUSSÃO E ANÁLISE DOS RESULTADOS

A exigente etapa de reunir amostras estatisticamente significativas com as características impostas pela metodologia, permitiu a análise de 7,3% do escasso universo índice (TEC).

Relacionaram-se os QG de cada grupo com os antecedentes da concepção. Se fossem comparados apenas os grupos A e C, os efeitos da PMA distintos da criopreservação e expressos pelo grupo B, teriam ficado incógnitos e seria introduzido um importante viés.

Os 3 grupos obtiveram QMs normais em todas as subescalas das **EDMGs** mas, o QM do grupo A = 103,4 foi ligeiramente inferior ao do grupo B = 107,5 e este ao do C = 108,7. Há uma diferença significativa ($p < 0,03$) se compararmos o QM do grupo C com o dos grupos da FIV (A + B) cujo QM = 105,76 (L 86 – 118; mediana 109). O grupo C superou sempre o grupo A e superou o grupo B em 5 das 6 as subescalas embora essa diferença só seja significativa entre os grupos A e C e apenas no **Desenvolvimento motor** ($p < 0,03$) e na **Linguagem** ($p < 0,01$).

As diferenças etárias e de género não mostraram afectar os resultados mas, a probabilidade de encontrar um QM abaixo de 2 SD da média dum grupo é maior nos grupos A ($p < 0,32$) e B ($p < 0,01$) comparativamente ao grupo de procriação natural.

A superação da média é infrequente e idêntica nos 3 grupos. Ao contrário do grupo A, os gémeos do grupo B revelaram QM superiores aos dos não gémeos e essa diferença foi significativa ($p < 0,03$).

Os resultados do **SDQ-For** assemelharam-se nos 3 grupos. 10% das crianças tiveram resultados não normais e igual percentagem teve resultados limite. Houve menor potência estatística porque só obtivemos 66,6% de respostas

CONCLUSÃO – o neurodesenvolvimento médio das crianças com FIV e TEC desta amostra populacional e nascidas sem problemas perinatais, revelou ser normal mas não tão elevado como o daquelas cuja procriação foi natural. Essa diferença é estatisticamente significativa nas áreas da locomoção e da linguagem avaliadas pelas EDMG bem como na probabilidade de uma destas crianças ter um desenvolvimento 2SD abaixo da média do seu ou dos outros grupos sem TEC.

Ou seja, a probabilidade de encontrar crianças com alterações do neurodesenvolvimento é menor no grupo de procriação natural. Os perfis emocionais ou de hiperatividade e as atitudes pró sociais, medidos pelo SDQ-Por, revelam menos diferenças.

A **conclusão principal** deste estudo é que a PMA e sobretudo a criopreservação embrionária estão mais vezes associadas a padrões de neurodesenvolvimento inferiores à média, mas não impedem o nascimento de muitas crianças com bom desenvolvimento e comportamento normal.

Esperamos ter promovido o conhecimento dos possíveis efeitos da criopreservação sobre o neurodesenvolvimento infantil e de assim ter podido contribuir para a defesa dos embriões concebidos *in vitro* e para um futuro mais seguro para todos nós.

ABSTRACT

Introduction - The extraordinary technological innovation on assisted reproductive technologies (referred here as ART) has created a “Brave New World(s)”¹¹ where many infertile couples reached their dream of parenthood. Many ethical, social and juridical challenges have emerged as well.

In the world of the in vitro fertilization (IVF) only a small minority survives all the biological risks which can be even worsened by embryonic cryopreservation. Only 15 from 100 embryos that reach to be transferred will be born and 4 from these will be born premature or shall have neonatal problems. 2 children among the 11 born at term also will have development problems in broad sense (Hansen, M., Kurinczuk, J., et al. – 2013).

According to Portuguese law¹², human embryo cryopreservation is limited to a period of three years (exceptionally six) after which all supernumerary embryos should

¹¹ Reference to the famous work of Aldous Huxley named «Brave new world» where the author describes in a scaring way the ART technologies as well as the previsible future desumanized human societies.

¹² *Lei n.º 32/2006- Procriação medicamente assistida. (Assisted Reproductive Technologies) Artigo 9.º - Investigação com recurso a embriões (investigation using human embryos) and Artigo 25.º Destino dos embriões (destiny of the embryos)*

be destroyed or used in scientific investigation no matter how many of them could be still viable (Daniel Serrão – 2003) and probably for an increasing period of time (Papis K., Lewandowski P., et al. - 2013).

As far as 3, 5% of all pregnancies in many countries and 2, 1% of all births in Portugal are depending today on IVF and this reality is leading to the increasing perception that a serious and deep discussion is missing. The long-term effects as well as genetic and epigenetic consequences of the various procedures of ART, mainly of cryopreservation, over infantile neurodevelopment are unknown (Wennerholm UB, Söderström-Anttila V, Bergh C. et al. - 2009).

Even underestimating the ethical or the moral issues and giving an advantage to the pragmatic resources which allow generating human beings in the laboratory, the risks imposed to our ecosystem cannot be ignored. It should be done an effort to keep scientific progress compatible with the primacy of human beings and their rights (UN/1975)¹³.

The population of our study has been limited to children born without neonatal problems. This option for selecting and comparing only the «best cases» caused the loss of the analysis of some risks such as the prematurity consequences associated to ART. However, if we have chosen a different methodology, the comparison between groups could not be valid because the population is scarce in the universe of cryopreservation.

This investigation work belonging to the field of Bioethics is supported by our professional experience. The empiric study was made to give a contribution to a fabulous scientific seeking but whose practice may be unsafe and disrespecting the «*Primacy of human embryo created in vivo*»¹⁴

OBJECTIVE – this study was made to compare the neurodevelopment of a cohort of children who have undergone embryonic cryopreservation with other social and demographically identical but lacking this antecedent. The main objective was to promote knowledge on this field as well as the related ethic reflection.

¹³ Declaration on the use of scientific and technological progress in the interest of peace and for the benefit of mankind. UN, November 1975 – Resolution N.3384 (XXX).

¹⁴ Analogy with article N.2 of Oviedo Declaration (from The Convention on Human Rights and Biomedicine in 1997), when defending the *Primacy of the human being* by saying: “*the interests and welfare of human being shall prevail over the sole interest of society or science*”

METHODOLOGY - After having written the theoretic foundations of this thesis, we tried to contribute with a personal empiric study based on the neurodevelopment of groups of identical children whose sole differences were their conceptive antecedents. This has been an analytic and not experimental study that used descriptive, comparative and correlative models.

The method used in socio demographic selection was the same as used in clinical anamnesis. For screening neurocognitive development we used the **Griffiths Mental Development Scales**¹⁵ (GMDS). For behavior and socialization screening we have chosen the **SDQ- pro (Strengths and Difficulties Questionnaires)**¹⁶.

We selected 60 children between 20 and 96 months old, born with 36 weeks gestational age or older, and absence of significant neonatal problems. These children were divided into 3 groups according to their conceptive antecedents. The index group named **Group A** was obtained by its convenience. All 19 children from group A have undergone embryonic cryopreservation and were born between January 2007 and August 2010. They belong to a small universe of only 350 individuals where 260 have the conditions for recruitment and no more than 80 new cases are summed each year. The difficult recruitment of samples has imposed the need of a wide net of personal and digital contacts. The mean age group A is 51 months old (L 21 – 96).

The other two studied groups (B and C) include 41 children without cryopreservation. The named **group B** has 22 children submitted to IVF with fresh transference and born between January of 2006 and October 2012. The mean age in group B was 56 months (L 33-85). The named **group C** has 19 children from natural conception and born between May of 2006 and March 2012. The mean age in group C was 48 months (L 20-85).

The children of groups A and B came from Portuguese medical assisted reproductive centers whose technology is similar. The results obtained from anamnesis and through instruments, have been protected and collected in an Excel® sheet and exported to the SPSS 17.0. The analysis of results included parametric and non parametric tests and a bivariate correlation. A multivariate analysis was possible only in

¹⁵ GMDS licenced by the “Association for Research in Infant and Child Development” (ARICD).

¹⁶

few occasions. The Qui square test was used to qualitative variables. Whenever the frequencies were low (<5) the Fischer exact test for tables 2 for 2 was used because it allows maximizing results without increasing discrimination. A value of $P < 0,05$ was considered statistically significant.

There were a few children with particular features equally distributed by the 3 groups. Some were not able to finish the Griffiths scales which have been presented always in the same environmental conditions and applied by the same independent professional.

RESULTS – Although we have made an effort to equal the groups, slight differences in some items may be present anyway: there were more male individuals in group B (6F/16M) and more females in group C (13F/6M). In group C the median age by sex, differs significantly (42,5 months in F versus 55,5 in M) with the found value of $P < 0,04$. The percentage of twins is bigger in group A and it is intermediate in group B.

The groups A and B (alone or associating A+B) and the group C, have the following total medium results and the partial medium results in the six subscales from the GMDS [Legend – general quotient (GQ), MV (medium value), L (limits), SD (standard deviation)]¹⁷

GQs of: group A – MV 103,4 (L 86-116) SD 5,48/ Group B – MV 107,5 (L 87 -118) SD 5,57/ Group A+B – MV 105,76 (L 86-118) SD 5,65/ Group C – MV 108,7 (L 102-122) SD 4,47

A – Motor development: Group A – GQ 102,63 (L 83-122) SD 6,24/ Group B – GQ 107,40 (L 79-131) SD 7,21/ Group A+B – GQ 105,39 (L 79-131) SD 7,21/ Group C – GV 113,05 (L 92-140) SD 6,93

B - Personal-Social: Group A – GQ 111,06 (L 95-130) SD 5,92/ Group B – GQ 112,68 (L 83-131) SD 6,93/ Group A+B – GQ 112 (L 83-131) SD 6,93/ Group C – GQ 114,33 (L 96-144) SD 6,93

¹⁷ The scores sums of each individual sub-scale can be converted to 4 types of standard score [(Percentiles, Z-Scores (using tables in the Analysis Manual), age equivalents or Mental Age (using tables in the Analysis Manual) and General Quotient (GQ) using the following equation: $\text{Mental age} \times 100 / \text{chronological age in months} = \text{GQ}$). The GQ is obtained by the media of the 6 sub-quotients.

C –Language: Group A – GQ 104,75 (L 79-143) SD 8,0/ Group B – GQ 109,09 (L 91-133) SD 6,48/ Group A+B – MV 107,26 (L 79-143) SD 8,0/ Group C – GQ 112,55 (L 74-141) SD 8,18

D - Eye and hand co-ordination: Group A – GQ 98,06 (L 73-117) SD 6,63/ Group B – GQ 104,90 (L 84 -122) SD 6,16/ Group A+B – GQ 102,02 (L 73-122) SD 7,0/ Group C – GQ 99,83 (L 83-118) SD 5,91

E - Performance: Group A – GQ 103,50 (L 90-121) SD 5,92/ Group B – GQ 107,50 (L 87 -125) SD 6,16/ Group A+B – GQ 105,81 (L 87-125) SD 6,16/ Group C – GQ 107,05 (L 93-121) SD 5,29

F – Practical Reasoning: Group A – GQ 100,80 (L 74-117) SD 6,56/ Group B – GQ 104,81 (L 87 -119) SD 5,66/ Group A+B – GQ 103,72 (L 74-119) SD 6,70/ Group C – GQ 104,94 (L 92-117) SD 5

SDQ – Por: results from the 3 groups A, B and C

Results in SDQ-Por		GQ	Emotion	Behavior	Hiper activity	Relation	Pro Social behavior
GroupA T19/A15 (78,94%)	N	10(66,6%)	11(73,3%)	9(60%)	12(80%)	10(66,6%)	12 (80%)
	L	2	2	2	3	0	0
	AN	3	2	4	0	4	2
GroupB T22/A11 (50%)	N	8 (72,7%)	10(90,9)	7 (63,6%)	8(72,7%)	7(63,6%)	10(90,9%)
	L	-	-	1	-	2	1
	AN	3	1	3	3	2	-
Group A+B T41/A26 (63,4%)	N	18(69,2%)	20(76,9%)	15(57,7%)	19(73%)	16(61,5%)	21(80,8%)
	L	2	2	3	3	2	1
	AN	6	3	7	3	6	2

Group C T19/A14 (73,68%)	N	10(71,4%)	10(71,4%)	10 (71,4%)	10(71,4%)	10(71,4%)	13 (92,8%)
	L	3	3	1	1	3	1
	AN	1	1	3	3	1	-

Legend: General Quotient = GQ; Normal Behavior = N; Limit Behavior = L; Not Normal Behavior = AN; T = total; Children submitted to test = A

DISCUSSION AND ANALYSIS OF RESULTS

The effort to gather statistically significant and enough sample size within the conditions of our methodology, has allowed the analysis of 7, 3% of the scarce index universe (TEC).

We have compared the GQ (media of results) of each group according to the antecedents of its conception. If we had compared only the groups A and C and forgotten the effects of IVF alone (which may be distinct or less than what is caused by the association with cryopreservation) revealed in group B elements, we would have superimposed an important bias. The 3 groups reached a normal GQ in all scales of the EDMG but the GQ of the group A = 103,4 was less than that of group B = 107,5 and much less than that of C = 108,7. There is a significant difference ($p < 0,03$) if comparing the GQ from group C with that of the groups A and B together (A + B) whose GQ = 105,76 (L 86 – 118; median 109). The group C went always better than group A and went better than group B in 5 of the 6 scales of EDMG. That difference among groups is significant only between groups C and A and just only in the scales of Motor Development ($p < 0,03$) and of the Language ($p < 0,01$).

Age and sex differences between groups didn't influence results but the probability of finding a child with a GQ 2 SD under the media of its group is bigger in the group A ($p < 0,32$) and B ($p < 0,01$) when compared with the group C of natural conception .

To be above median is uncommon and such situation occurs identically in all groups. The twins from group B showed higher GQ than non twins and this difference is significant ($p < 0,03$) however there were not such a difference in group A.

The results from the SDQ-Por are similiar in the 3 groups but this test had lesser statistical strength because it has been finished only by 66,6% of children. 10% of all had abnormal results and another 10% had results in the limits of normality.

CONCLUSION – the GQ found in this cohort of children born without neonatal problems but who has been submitted to IVF and cryopreservation, showed corresponding to a normal neurodevelopment although not so high as that of naturally conceived children. That difference is statistically significant in the results of the group C in GMDS scales of motor development and language as well as in its higher probability of having a GQ lower than 2 SD inside its own group or in the other 2 groups from this study. In other words we can say that a naturally conceived child has a lower probability of having a neurodevelopmental handicap. The emotional characteristics as well as the hyperactivity and socialization profiles screened by SDQ-Por, didn't differ significantly among groups.

The **main conclusion** of this study is that children conceived with IVF and cryopreservation may have normal neurodevelopment and behavior but the median of their GQ is not as high as that of the naturally conceived children. They are also more prone to differ more than 2SD from medium results of its and other groups.

We hope our work had contributed to a better knowledge of the effects of cryopreservation over children's neurodevelopment and to promote the rights of the *in vitro* conceived embryos in parallel with a safer future to humankind.

ÍNDICE DE CONTEÚDOS Pág

Dedicatória -----	7
Preâmbulo -----	9
Agradecimentos -----	13

PARTE 1 – IDENTIFICAÇÃO E ÂMBITO DO PROJECTO**1.1 - Identificação do estudo**

1.1.1 – Título do estudo -----	17
1.1.2 - Áreas científicas-----	17
1.1.3 – Objetivo-----	17
1.1.4 – Instituições participantes e colaboradores-----	17
1.1.5 – Financiamento-----	17
1.1.6 – Autoria do projeto-----	18
1.1.7 – Orientador e co-orientadores -----	18
1.1.8 – Resumo em português -----	19
1.1.9 – Abstract in english -----	25
1.1.10 - Palavras chave em português e inglês-----	32
1. 2 - Principais abreviaturas -----	32
1. 3 - Terminologia básica -----	34
1.4 - Níveis de evidência científica -----	37

PARTE 2 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1- Introdução ----- 45

2.2 - Infertilidade e Medicina da Reprodução

2.2.1 – Origem do conceito e definição de infertilidade ----- 46

2.2.2 – Evolução da Medicina da Reprodução ----- 49

2.2.3 – Principais causas de infertilidade ----- 55

2.2.4 – Aspectos genéticos e ambientais da infertilidade ----- 58

2.2.5 – Principais etapas da reprodução humana ----- 69

2.3 – Contributo da PMA para a reprodução humana

2.3.1 – Introdução----- 74

2.3.2 – Terminologia e principais procedimentos da PMA ----- 77

2.3.3 – Recursos atuais da PMA

2.3.3.1 – Introdução ----- 83

2.3.3.2 – Intervenção terapêutica no ciclo reprodutor feminino----- 83

2.3.3.3 – Intervenção terapêutica no ciclo reprodutor masculino----- 87

2.3.3.4 - Fertilização assistida e crescimento embrionário ----- 89

2.3.3.5 – Composição dos meios de cultura----- 90

2.3.3.6 – Processos de transferência embrionária ----- 95

2.3.3.7 – Diagnóstico pré-implantatório ----- 99

2.3.3.8 - Criopreservação biológica

2.3.3.8.1 – Aspectos gerais da criopreservação -----	100
2.3.3.8.2 – Micromanipulação e congelamento de gâmetas e embriões -----	102
2.3.3.9 – Recursos e resultados nacionais da PMA -----	105

2.4 – Importância do meio ambiente no desenvolvimento humano

2.4.1 – Origem genética e meio ambiente -----	111
2.4.2 – Factores epigenéticos e ciclo vital -----	116
2.4.3 - PMA e desenvolvimento infantil – conhecimentos atuais	
2.4.3.1 – Introdução -----	120
2.4.3.2 - Efeitos da PMA na embriogénese -----	122
2.4.3.3 - Implantação natural do embrião -----	131
2.4.3.4 - Efeitos da PMA na nidação, placentação e crescimento fetal -----	132
2.4.3.5 – Efeitos conhecidos da criopreservação embrionária ----	136
2.4.3.6 – Influência da PMA na evolução perinatal e tardia -----	145

2.5 - Aspectos bioéticos e jurídicos da criopreservação embrionária

2.5.1 – A importância da PMA na origem da Bioética e do Biodireito -----	153
2.5.2 – Questões ético jurídicas da PMA e criopreservação embrionária -----	162
2.5.3 - Problemática dos embriões humanos excedentários -----	168
2.5.4 – A questão das células tronco embrionárias -----	177

2.5.5 – Criopreservação embrionária e neuroética -----	178
2.5.6 – Desafios e enigmas futuros -----	184

2.6 - Neurodesenvolvimento infantil - considerações e avaliação

2.6.1 - Considerações sobre o desenvolvimento humano -----	193
2.6.2 – Neurodesenvolvimento infantil. Conceito e avaliação -----	198
2.6.3 – Monitorização nacional da saúde infantil após PMA -----	200
2.6.4 – Métodos de avaliação. A difícil escolha -----	203
2.6.5 – Descrição e uso das Escalas de Ruth Griffiths (EDMG) -----	206
2.6.6 – Descrição e uso do SDQ-Por -----	208

PARTE 3 – ESTUDO COMPARATIVO DO NEURODESENVOLVIMENTO DE CRIANÇAS CUJOS EMBRIÕES ESTIVERAM CRIOPRESERVADOS

3.1 - Contributo pessoal e estudo empírico

3.1.1- Introdução -----	215
3.1.2 - Contextualização da investigação -----	215
3.1.3- Objectivos da Investigação	
3.1.3.1 - Objectivo geral -----	216
3.1.3.2. - Objectivo específico -----	217
3.1.3.3 - Questão de Investigação -----	217
3.1.4 – Questões e hipóteses em análise -----	218
3.1.5 - Consentimento informado dos participantes -----	219
3.1.6 – Autorização institucional e consentimento legal do estudo -----	219

3. 2 – Metodologia

3.2.1 – Introdução -----	221
3.2.2 – População estudada e critérios de seleção das amostras -----	222
3.2.3 – Constituição das amostras e sua caracterização demográfica -----	225
3.2.4. – Caracterização demográfica da amostra global -----	226
3.2.5 - Procedimentos de avaliação clínica e instrumental -----	227
3.2.5.1 - Triagem inicial e pré seleção dos dados anamnéticos -----	228
3.2.5.2 - Colheita e sumarização das variáveis em estudo -----	230
3.2.5.3 – Aplicação dos instrumentos psicométricos -----	231
3.2.5.3.1 – Características das EDMG 0-2 e 2-8 anos -----	231
3.2.5.3.2 - Aplicação e cotação das EDMG -----	237
3.2.5.3.3 – Características do SDQ-Por -----	238
3.2.5.3.4 - Aplicação e cotação do SDQ-Por versão pais/ professores-----	238
3.2.6 – Resultados gerais -----	239
3.2.6.1 – Resultados demográficos e anamnéticos dos grupos estudados -----	239
3.2.6.2 – Resultados das avaliações do neurodesenvolvimento e comportamento -----	242
3.2.6.2.1 - Resultados obtidos com as EDMG -----	242
3.2.6.2.2 - Resultados obtidos com as SDQ-Por -----	251

3.2.7 – Resumo do estudo empírico -----	254
3.2.8 - Análise estatística -----	254
3.2.9 - Análise dos resultados -----	255
3.2.9.1 – Análise comparativa dos perfis de desenvolvimento em função da existência de criopreservação embrionária -----	255
3.2.9.2 – Análise comparativa dos perfis de desenvolvimento em função dos factores demográficos -----	256
3.2.9.3 - Análise comparativa dos quocientes obtidos com as EDMG em função das condições embrionárias -----	258
3.2.9.4 - Análise comparativa dos resultados obtidos com o SDQ-Por em função das condições embrionárias -----	261
3.2.9.5 - Resumo dos resultados -----	262
3.2.10 - Discussão dos resultados -----	264
3.3 – Conclusões -----	268
3.3.1- Conclusões relativas às hipóteses do estudo quantitativo-----	268
3.3.2- Conclusões relativas às hipóteses do estudo qualitativo-----	269
3.4 – Reflexão final -----	271
3.5 – Síntese conclusiva e impacto do estudo -----	274
3.6 - Limitações e dificuldades -----	276
3.7 - Missão futura -----	277
BIBLIOGRAFIA -----	279
LISTA DE QUADROS, E TABELAS E FIGURAS -----	299
ÍNDICE E LISTA DE ANEXOS -----	303

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha querida e já falecida avó Leónia Batista Correia, pelo exemplo no apoio incondicional ao avanço académico dos seus descendentes.

PREÂMBULO

Esta dissertação sob o título «Criopreservação embrionária e neurodesenvolvimento infantil» reúne um conjunto de reflexões e estudos realizados pela autora, no âmbito do Programa de Doutoramento em Bioética, apresentado à Universidade Católica Portuguesa (UCP) e realizado sob a orientação do Senhor Professor Doutor Daniel Serrão, docente emérito da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e da UCP.

Este trabalho foi idealizado e desenvolvido, no intuito de melhor conhecer o neurodesenvolvimento de crianças cujos embriões estiveram criopreservados e promover a discussão crítica do efeito dessa e de outras técnicas de procriação medicamente assistida (PMA), sobre a integridade e evolução do ser humano em início de vida e conseqüentemente sobre o futuro da nossa espécie.

O objetivo central foi investigar o neurodesenvolvimento de crianças de um grupo alvo e representativo. Para tal foram comparadas crianças entre os 20 meses e os 8 anos, concebidas umas naturalmente e outras com recurso à PMA, sendo que algumas estiveram submetidas a criopreservação embrionária. Os resultados encontrados na avaliação, usando um conjunto de instrumentos com reconhecida especificidade, foram relacionados à existência ou não de processos de criopreservação embrionária, que os pudessem ter condicionado. Na prática, recorreu-se à anamnese clínica complementada com instrumentos psicométricos aplicados por uma especialista dessa área.

Cabe aqui uma breve alusão à enorme dificuldade de recrutamento numa amostra com as características pretendidas. À escassez destas crianças, associaram-se as regras metodológicas e a exigência de levar a efeito uma avaliação especializada e presencial, como aludiremos no texto. Estes critérios de qualidade implicaram elevados custos materiais e humanos. As dificuldades sentidas, explicam em parte, o tempo despendido e a quase inexistência, a nível internacional, de estudos desta natureza.

Na avaliação psicométrica foi utilizada a versão portuguesa das Escalas de Desenvolvimento Mental de Ruth Griffiths (EDMG as quais descreveremos no texto).

Apesar da autora deste estudo estar habilitada¹ para a aplicação das EDMG, entendeu que deveria procurar minimizar um eventual mas importante viés, e recorreu à colaboração de uma profissional especializada na utilização deste instrumento. A Mestre Dr.^a Lília Brito, experiente psicóloga na área do desenvolvimento infantil, fez todas as avaliações e pôde atuar de forma cega e homogénea, visto desconhecer, por acordo recíproco, os objetivos da investigação.

Foi nossa intenção inicial complementar a avaliação psicométrica com o Inventário de Competências Sociais e de Problemas do Comportamento em crianças (Child Behavior Checklist - CBCL) criado por Thomas Achenbach nos Estados Unidos da América e revisto pelo autor em 1991. Este instrumento permanece uma referência científica e está disponível numa versão portuguesa [adaptada por Fonseca et al. em 1994, em que o inventário destinado a pais passou a designar-se por «Inventário do Comportamento da Criança para Pais (ICCP)]. Numa posterior adequação às condições de estudo, viemos a optar pelo Questionário de Capacidades e Dificuldades (SDQ-Port na versão portuguesa de Fleitlich, Loureiro, Fonseca, & Gaspar, 2005) semelhante ao primeiro quanto aos objetivos, mas de maior funcionalidade quer na utilização quer na validação dos resultados.

Embora já exista alguma investigação sobre factores de risco da PMA e da criopreservação embrionária focada nos descendentes dos utilizadores, e em 2013 tenha sido publicada uma importante meta análise que era ansiosamente aguardada (Michele Hansen, Jennifer J. Kurinczuk, et al.- 2013), sentimos que a informação ainda é escassa e que é possível ir um pouco mais longe, nomeadamente na avaliação das crianças submetidas a tais técnicas na sua fase embrionária. A introdução teórica do nosso estudo estava parcialmente realizada, mas foi revista após a publicação desta meta análise. Mantivemos muitas das dúvidas existentes e o interesse pela avaliação dos resultados de técnicas cada vez mais utilizadas mas de efeitos pouco conhecidos.

Aprofundámos o desejo de promover a defesa da vida numa perspectiva bioética e a necessidade de implementar o direito do embrião humano, em fase pré implantatória, a um estatuto ético e jurídico tal como tem sido repetidamente defendido

¹ A «Association for Research in Infant and Child Development» (ARICD) supervisiona e assegura que a utilização das EDMG, seja feita apenas por profissionais com formação específica (<http://www.aricd.org.uk/about-the-griffiths-scales/>).

por diversos autores que muito respeitamos e que nos inspiraram e motivaram para a realização deste trabalho².

Esta dissertação está organizada em três partes principais:

Na Parte 1 é apresentado um resumo do projeto de investigação, na Parte 2 é feita a fundamentação teórica do tema em estudo englobando todos os aspectos envolvidos e, na Parte 3 é feito o estudo comparativo do neurodesenvolvimento de crianças cujos embriões estiveram criopreservados e que constitui a parte empírica e de contribuição pessoal.

A vertente direcionada à Medicina da Reprodução, ocupou a maior parte do estudo exploratório, focado nas etapas da PMA e é composto por uma revisão da literatura acerca das variáveis em estudo e a formulação das principais hipóteses de investigação. Aspectos do neurodesenvolvimento humano e metodologias de avaliação, bem como os instrumentos psicométricos utilizados na avaliação das crianças estudadas foram igualmente descritos.

A existência de índices bibliográficos de literatura científica e técnica, bem como de revisões internacionais disponibilizadas e facilmente acedíveis «on-line», em locais de referência (Medline, Pubmed e Cochrane entre os principais)³ proporcionou uma significativa economia temporal e um notável auxílio à investigação.

A Parte 3 engloba toda a parte prática e teórico-prática da investigação. A descrição da metodologia incluiu uma referência ao processo de recrutamento dos grupos de estudo e a caracterização das amostras estudadas. Foi incluída uma descrição sumária dos instrumentos de avaliação e dos procedimentos estatísticos utilizados e foi também enunciada a validação psicométrica das versões portuguesas das *Escalas de*

² Daniel Serrão, Walter Osswald, Jorge Biscaia, Michael Renaud entre os mais citados defensores dos direitos do embrião humano, nas últimas décadas, no nosso país.

³ MEDLINE - é uma base de dados da literatura médica e biomédica, produzida pela NLM (National Library of Medicine, USA) com referências bibliográficas e resumos de mais de 6.000 títulos de revistas publicadas nos USA e em mais de 70 países. Contem referências desde 1966 e a sua actualização é mensal. Possui mais de 21 milhões de referências bibliográficas. A MEDLINE é o componente primário da Pubmed ® uma base de dados fornecida pelo NLM [National Center for Biotechnology Information (NCBI)].

Desenvolvimento Mental de Ruth Griffiths (EDMG) e do questionário *Strengths and Difficulties Questionnaire* (Goodman, 2001) traduzido como *Questionário de Capacidades e Dificuldades* (SDQ-Port na versão portuguesa por Fleitlich, Loureiro, Fonseca, & Gaspar, 2005).

A apresentação dos resultados, encontrados em texto e em tabelas, antecedeu a discussão que pretendeu contribuir para a avaliação do impacto das técnicas de FIV de criopreservação embrionária sobre o neurodesenvolvimento infantil. No final, foram enunciados os resultados encontrados, quer próprios quer comparados, de uma forma integrada.

Após a conclusão que ocupou a última parte deste trabalho, mencionaram-se as referências bibliográficas e anexos, onde se incluem modelos de consentimento e outros dados referentes aos instrumentos utilizados.

Procurámos utilizar uma linguagem acessível e assente nos princípios gerais que orientam a redação de trabalhos científicos, **mas receamos não ter conseguido respeitar as regras do recente acordo ortográfico da Língua Portuguesa.**

AGRADECIMENTOS

Uma dissertação de doutoramento exige um longo percurso de reflexão, com importantes momentos de pausa e por vezes algum desânimo, mas também de muita determinação e esperança.

Este trabalho só foi possível com a ajuda dos muitos mestres, colegas e amigos que fui encontrando ao longo da minha vida académica e profissional aos quais agradeço todo o apoio recebido:

Em primeiro lugar recorro todo o percurso que me conduziu ao Instituto de Ciências Biomédicas Dr. Abel Salazar onde iniciei a licenciatura e conheci grandes nomes da Medicina, posteriormente a Faculdade de Ciências Médicas onde conclui o curso e a Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa onde fiz o Mestrado em Neurociências, sendo estes os três grandes marcos da minha formação académica. Seguidamente o meu agradecimento vai para o Instituto de Bioética da Universidade Católica Portuguesa (UCP) e para todo o seu corpo docente, por ter sido aí que prossegui esta etapa do doutoramento e sobretudo ao ilustre e muito querido de todos nós, o Professor Doutor Daniel Serrão, também Professor Emérito da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto que acreditou neste projeto aceitando ser orientador desta dissertação. A minha profunda gratidão pela generosidade e disponibilidade deste grande Professor que conseguiu engrandecer a minha já prévia e imensa admiração pelo seu exemplo de académico e de cidadão ilustre. Foi uma honra ter tido o privilégio da sua orientação e por tudo isso, aqui fica o meu «muito obrigada».

À Senhora Professora Doutora Ana Sofia Carvalho coordenadora inicial do Curso de Doutoramento em Bioética da Universidade Católica e ao Senhor Professor António Jacomo que lhe sucedeu a partir do ano letivo de 2013-2014 e de quem recebi um inestimável apoio, muito para além do suporte académico previsto.

De novo ao Senhor Professor António Jacomo e ao Senhor Professor Walter Osswald da Universidade Católica Portuguesa no seu papel repartido de representantes do orientador durante a sua ausência por razões de força maior. A estes Mestres devo, para além da sua inestimável generosidade, o valioso contributo na leitura, orientação e revisão da investigação.

A todo o corpo docente do curso de Bioética que me mostrou horizontes novos e tanto me ensinou, no profícuo debate de ideias.

À Mestre Dr.^a Lília Brito, profissional responsável do departamento de Psicologia da Maternidade Dr. Alfredo da Costa que, extra-horário, fez todas as avaliações das crianças integradas no estudo, sempre pronta para o esclarecimento oportuno e a palavra amiga de incentivo, não obstante o nosso pacto de manter o sigilo sobre a matéria em estudo e assim nos preservarmos de qualquer enviesamento evitável.

Às minhas amigas Prof^a Doutora Sara Bahia docente da Faculdade de Psicologia e Ciências da Educação da Universidade de Lisboa, à Dr.^a Maria Manuela Vidal psiquiatra do Hospital de Júlio de Matos e entusiasta das neurociências e à Dr.^a Ana Mafalda Vasconcelos Ferreira, psicóloga dirigente da Associação Redes, IPSS dedicada ao ensino de crianças e jovens com necessidades especiais, pelos ensinamentos oportunos e incentivo constantes com que me apoiaram durante todo este percurso.

Aos meus colegas e amigos profissionais de Pediatria e de Medicina Materno-fetal bem como das Unidades de Procriação Medicamente Assistida da Maternidade Dr. Alfredo da Costa, Prof^a Doutora Fátima Serrano, Prof^a Dr.^a Ana Campos, Dr^a Graça Bernardo, Dr. Gervásio da Silva, Prof^a Doutora Teresinha Simões, entre outros, pelos esclarecimentos e testemunhos da sua vivência prática, numa área menos familiar, quando em 2009 iniciei este trabalho.

À Associação Portuguesa de Fertilidade e aos seus membros, por me terem deixado divulgar, no seu endereço eletrónico (<http://www.apfertilidade.org/>), o teor deste trabalho e terem colaborado comigo de forma tão generosa.

Aos pais e a todas as crianças que me ajudaram, aceitando submeterem-se aos testes, tantas vezes motivo de deslocações, grande dispêndio de tempo e muito boa vontade.

À Dr.^a Isabel Martins a quem me ligam relações profissionais, pelo apoio no pedido de autorização à Comissão Nacional de Proteção de Dados.

A todos os conhecidos e anónimos que, tendo partilhado os seus trabalhos, foram importantes fontes de informação e inspiração e a quem peço antecipado perdão se algum contributo ou referência bibliográfica, estiver involuntariamente omissa.

A todos os colegas e amigos do curso de Bioética da Universidade Católica Portuguesa, sempre prontos a trocar conhecimentos e bibliografia, agradeço reconhecida, as enriquecedoras vivências que partilhámos.

À minha família, em especial à memória de meu pai, ao meu marido e aos meus filhos e à minha mãe e irmãos a quem tanto privei durante a execução deste projeto, que se sabe ser longo...

Por tudo e para sempre, a Deus nosso Pai.

Célia Iglésias Neves

Novembro de 2015

1 – IDENTIFICAÇÃO E ÂMBITO DO PROJECTO

1.1 - Identificação do estudo

1.1.1 – Título do estudo

Criopreservação embrionária e neurodesenvolvimento infantil.

(Effect of cryopreservation of embryos on neurodevelopmental outcome)

1.1.2 - Áreas científicas

Área científica principal – Bioética

Áreas científicas secundárias - Neurociências, Pediatria do Desenvolvimento e

Medicina da Reprodução

1.1.3 – Objetivo

O presente estudo pretendeu fazer uma avaliação comparativa do neurodesenvolvimento de crianças nascidas com e sem criopreservação embrionária e promover a discussão crítica, do impacto das técnicas de PMA sobre a integridade e o direito a um estatuto ético jurídico para o Embrião Humano.

1.1.4 – Instituições participantes e colaboradores

- Instituto de Bioética da Universidade Católica Portuguesa
- Associação Portuguesa de Fertilidade
- Comissão Nacional de Proteção de Dados

1.1.5 – Financiamento

Autónomo/ não solicitado. As opiniões expressas nesta dissertação são da responsabilidade da autora, que declara não ter identificado conflitos de interesse entre as partes, nem solicitado ou recebido contribuições pecuniárias para a sua realização.

1.1.6 – Autoria do projeto

Célia Francisca Iglésias Batista Neves

1.1.7 – Orientador e coorientadores

Orientador: Senhor Professor Doutor Daniel Serrão

Co orientadores: Senhor Professor Doutor António Jacomo e

Senhor Professor Doutor Walter Osswald

1.8 - RESUMO

Introdução - O extraordinário avanço da procriação medicamente assistida (PMA) criou um “*Admirável mundo novo*”⁴ em que se concretizam muitos sonhos de parentalidade mas onde emergem importantes questões éticas e socio jurídicas.

No universo da fertilização *in vitro* (FIV) só uma minoria dos muitos embriões criados consegue sobreviver aos riscos biológicos e, se houver criopreservação os nascimentos diminuem cerca de 10%⁵. De cada 100 embriões que chegam a ser transferidos nascem em média 15 crianças e 4 são prematuras ou têm problemas perinatais; das 11 restantes, 2 terão alterações do desenvolvimento (Hansen, M., Kurinczuk, J., et al. – 2013).

Por lei⁶, a criopreservação de embriões excedentários está limitada a três anos (excecionalmente seis) período após o qual são destruídos ou utilizados em investigação científica mesmo que se pudessem manter viáveis por períodos maiores (Daniel Serrão – 2003) e que tenderiam a aumentar (Papis K., Lewandowski P., et al. -2013). Face a esta realidade cresce a necessidade duma reflexão multidisciplinar alargada tanto mais que 3,5% das gestações em alguns países e 2,1% dos nascimentos em Portugal⁷, já são resultado da PMA. Sendo estas técnicas recentes, também não se conhecem os seus efeitos a prazo, nem a nível genético ou epigenético (Wennerholm UB, Söderström-Anttila V, Bergh C. et al. -2009). O primeiro grande êxito foi assinalado em 1983 com o nascimento duma criança aparentemente saudável

Mesmo subestimando os aspectos morais ou éticos, e privilegiando os recursos pragmáticos que viabilizam vidas humanas, evidenciam-se riscos para o ecossistema em

⁴ Referência a Aldous Huxley e à célebre obra «Admirável mundo novo» em que o autor descreve de forma assustadoramente profética, não só a tecnologia da PMA como a desumanização das sociedades do futuro

⁵ 11ª Acta da Comissão Nacional da PMA, de 9 de Maio de 2008

⁶ Lei n.º 32/2006 - PMA. Artigo 9.º - Investigação com recurso a embriões e Artigo 25.º Destino dos embriões

⁷ http://www.cnpma.org.pt/Docs/RELATORIO_ACTIVIDADE_PMA2011.pdf

que vivemos e a necessidade de compatibilizar o progresso científico com a salvaguarda dos direitos fundamentais (ONU/1975) ⁸.

No estudo que realizámos sobre neurodesenvolvimento de crianças cujos embriões estiveram criopreservados, avaliámos uma amostra populacional nascida sem problemas neonatais e preenchida pelos «melhores casos» o que nos levou a omitir dos resultados, a dimensão dos riscos da FIV tais como a prematuridade e as suas consequências. Com outra metodologia porém, a comparação das inevitáveis variáveis teria sido impossível num universo tão escasso. Esta investigação situada no âmbito da Bioética e apoiada pela nossa experiência profissional, procurou contribuir para uma demanda científica que é tão fascinante quanto arriscada e que nem sempre respeita o «*Primado do embrião humano criado in vivo*»⁹

Objectivo - Comparar instrumentalmente o neurodesenvolvimento de crianças cujos embriões foram submetidos a criopreservação com outras social e demograficamente idênticas mas sem esse antecedente, no intuito de promover a reflexão ética e o conhecimento nesta área.

Material e métodos - Após a seleção da população baseada no modelo das histórias clínicas, definimos os critérios de amostragem e fizemos um estudo de *coorte* analítico e não-experimental, cujo modelo foi comparativo, correlacional e descritivo.

Selecionámos 60 crianças entre os 20 e os 96 meses, com 36 ou mais semanas de idade gestacional (IG) e ausência de patologia perinatal relevante, as quais foram distribuídas por 3 grupos, de acordo com os antecedentes concepcionais:

A amostra índice de conveniência, designada **Grupo A** integrou 19 crianças com criopreservação embrionária nascidas entre janeiro de 2007 e agosto de 2010.

⁸ Declaração sobre o Progresso Científico e Tecnológico no interesse da Paz e em benefício da Humanidade Proclamada pela Assembleia Geral da ONU em 1975 - Resolução n.º 3384 (XXX).

⁹ Analogia com o artigo 2º da declaração de Oviedo, que defende o «*Primado do ser humano*» e diz: “os interesses e o bem-estar do ser humano deverão prevalecer sobre o interesse exclusivo da sociedade ou da ciência”

Pertencem a um escasso universo de 350 elementos que integra 80 novos casos anuais e onde apenas 260 possuem os critérios de amostragem. O recrutamento foi difícil e exigiu uma vasta rede de contactos incluindo as novas redes digitais. A idade média do Grupo A é 51 meses (L 21- 96).

As restantes 41 crianças formaram 2 grupos controle, obtidos de forma tão aleatória quanto possível, num universo mais vasto. O **Grupo B** tem 22 crianças nascidas entre janeiro de 2006 e outubro de 2012 após FIV com transferência a fresco e com idade média de 56 meses (L 33-85). O **Grupo C** integrou 19 crianças de concepção natural, nascidas entre maio de 2007 e março de 2012 e idade média de 48 meses (L 20-85). A FIV dos grupos A e B ocorreu em centros portugueses com tecnologia equiparável.

Na avaliação neuro cognitiva usámos a metodologia de **Ruth Griffiths (EDMG)** e o **Questionário de Capacidades e de Dificuldades (SDQ-Por)** que avalia o comportamento e a socialização¹⁰. Os dados das avaliações foram protegidos, informatizados em Excel® e exportados para *SPSS 17.0* tendo a sua análise incluído testes paramétricos e não-paramétricos de comparação de grupos e correlações bivariadas. Só ocasionalmente foi possível uma análise multivariada. Nas variáveis qualitativas utilizou-se o Qui quadrado e na presença de frequências baixas (< 5) utilizou-se o teste exato de Fischer para tabelas de dois por dois, maximizando resultados, sem aumentar descrições. Um valor de $P < 0,05$ foi indicativo de significado estatístico.

Houve crianças com características singulares nos 3 grupos e que não completaram as EDMG aplicadas em condições idênticas pela mesma profissional independente.

Resultados - Apesar do esforço de homogeneização socio demográfica, verificaram-se ligeiras diferenças entre grupos: o sexo masculino prevaleceu no grupo B (6F/16M) e o feminino no C [(13 feminino (F)/6 masculino (M)]. No grupo C a idade média, por sexo, difere de forma significativa (42,5 meses no F versus 55,5 no M) sendo $p < 0,04$ e

¹⁰ EDMG = Escalas de Desenvolvimento de Ruth Griffiths, reconhecidas pela “Association for Research in Infant and Child Development”. As definições utilizadas foram as adoptadas internacionalmente e consignadas pelo uso.

a percentagem de gémeos é maior no grupo A e intermédia no B. Os grupos A e B (isolados ou associando A+B) e o grupo C, obtiveram os seguintes **resultados gerais e parcelares nas seis subescalas das EDMG**. Os valores de cada subescala fornecem dados representativos do quociente intelectual (através duma equação: $IM \times 100 / IC = QI$). O QI geral é obtido através da média dos 6 sub-quocientes. [Legenda – Quociente geral (QG), Quociente intelectual (QI); VM (valor médio), L (limites), SD (desvio padrão)].

QG do Grupo A – VM 103,4 (L 86-116) SD 5,48/ Grupo B – VM 107,5 (L 87 -118) SD 5,57/ Grupo A+B – VM 105,76 (L 86-118) SD 5,65/ Grupo C – VM 108,7 (L 102-122) SD 4,47

A – Locomoção/ Desenvolvimento motor: Grupo A – VM 102,63 (L 83-122) SD 6,24/ Grupo B – VM 107,40 (L 79-131) SD 7,21/ Grupo A+B – VM 105,39 (L 79-131) SD 7,21/ Grupo C – VM 113,05 (L 92-140) SD 6,93

B - Desenvolvimento pessoal – social: Grupo A – VM 111,06 (L 95-130) SD 5,92/ Grupo B – VM 112,68 (L 83-131) SD 6,93/ Grupo A+B – VM 112 (L 83-131) SD 6,93/ Grupo C – VM 114,33 (L 96-144) SD 6,93

C – Audição/ Linguagem: Grupo A – VM 104,75 (L 79-143) SD 8,0/ Grupo B – VM 109,09 (L 91-133) SD 6,48/ Grupo A+B – VM 107,26 (L 79-143) SD 8,0/ Grupo C – VM 112,55 (L 74-141) SD 8,18

D - Coordenação olho-mão: Grupo A – VM 98,06 (L 73-117) SD 6,63/ Grupo B – VM 104,90 (L 84 -122) SD 6,16/ Grupo A+B – VM 102,02 (L 73-122) SD 7,0/ Grupo C – VM 99,83 (L 83-118) SD 5,91

E - Realização (performance): Grupo A – VM 103,50 (L 90-121) SD 5,92/ Grupo B – VM 107,50 (L 87 -125) SD 6,16/ Grupo A+B – VM 105,81 (L 87-125) SD 6,16/ Grupo C – VM 107,05 (L 93-121) SD 5,29

F – Raciocínio Prático: Grupo A – VM 100,80 (L 74-117) SD 6,56/ Grupo B – VM 104,81 (L 87 -119) SD 5,66/ Grupo A+B – VM 103,72 (L 74-119) SD 6,70/ Grupo C – VM 104,94 (L 92-117) SD 5

O SDQ – Por foi respondido pelos pais dos 3 grupos e resultou nos quocientes gerais, parciais e percentagens que estão expostos no quadro.

Resultados do SDQ-Por		Quociente						
		Geral	Emoção	Comportamento	Hiperatividade	Relação	C. Social	Pró-
Grupo A	N	10(66,6%)	11(73,3%)	9(60%)	12(80%)	10(66,6%)	12 (80%)	
T19/A15	L	2	2	2	3	0	0	
(78,94%)	AN	3	2	4	0	4	2	
GrupoB	N	8 (72,7%)	10(90,9)	7 (63,6%)	8(72,7%)	7(63,6%)	10(90,9%)	
T22/A11	L	-	-	1	-	2	1	
(50%)	AN	3	1	3	3	2	-	
Grupo A+B	N	18(69,2%)	20(76,9%)	15(57,7%)	19(73%)	16(61,5%)	21(80,8%)	
T41/A26	L	2	2	3	3	2	1	
(63,4%)	AN	6	3	7	3	6	2	
Grupo C	N	10(71,4%)	10(71,4%)	10 (71,4%)	10(71,4%)	10(71,4%)	13 (92,8%)	
T19/A14	L	3	3	1	1	3	1	
(73,68%)	AN	1	1	3	3	1	-	

Legenda QG = quociente geral; T = total; A = avaliados; N = normal; L = limite; AN = Anormal;

Discussão e análise dos resultados - A exigente etapa de reunir amostras estatisticamente significativas com as características impostas pela metodologia, permitiu a análise de 7,3% do escasso universo índice (TEC).

Relacionaram-se os QG de cada grupo com os antecedentes da concepção. Se fossem comparados apenas os grupos A e C, os efeitos da PMA distintos da criopreservação e expressos pelo grupo B, teriam ficado incógnitos e seria introduzido um importante viés.

Os 3 grupos obtiveram QMs normais em todas as subescalas das **EDMGs** mas, o QM do grupo A = 103,4 foi ligeiramente inferior ao do grupo B = 107,5 e este ao do C = 108,7. Há uma diferença significativa ($p < 0,03$) se compararmos o QM do grupo C com o dos grupos da FIV (A + B) cujo QM = 105,76 (L 86 – 118; mediana 109). O grupo C superou sempre o grupo A e superou o grupo B em 5 das 6 as subescalas embora essa diferença só seja significativa entre os grupos A e C e apenas no **Desenvolvimento motor** ($p < 0,03$) e na **Linguagem** ($p < 0,01$).

As diferenças etárias e de género não mostraram afectar os resultados mas, a probabilidade de encontrar um QM abaixo de 2 SD da média dum grupo é maior nos grupos A ($p < 0,32$) e B ($p < 0,01$) comparativamente ao grupo de procriação natural.

A superação da média é infrequente e idêntica nos 3 grupos. Ao contrário do grupo A, os gémeos do grupo B revelaram QM superiores aos dos não gémeos e essa diferença foi significativa ($p < 0,03$).

Os resultados do **SDQ-Por** assemelharam-se nos 3 grupos. 10% das crianças tiveram resultados não normais e igual percentagem teve resultados limite. Houve menor potência estatística porque só obtivemos 66,6% de respostas

Conclusão – O neurodesenvolvimento médio das crianças com FIV e TEC desta amostra populacional e nascidas sem problemas perinatais, revelou ser normal mas não tão elevado como o daquelas cuja procriação foi natural. Essa diferença é estatisticamente significativa nas áreas da locomoção e da linguagem avaliadas pelas EDMG bem como na probabilidade de uma destas crianças ter um desenvolvimento 2SD abaixo da média do seu ou dos outros grupos sem TEC.

Ou seja, a probabilidade de encontrar crianças com alterações do neurodesenvolvimento é menor no grupo de procriação natural. Os perfis emocionais ou de hiperatividade e as atitudes pró sociais, medidos pelo SDQ-Por, revelam menos diferenças.

A **conclusão principal** deste estudo é que a PMA e sobretudo a criopreservação embrionária estão mais vezes associadas a padrões de neurodesenvolvimento inferiores à média, mas não impedem o nascimento de muitas crianças com bom desenvolvimento e comportamento normal.

Esperamos ter promovido o conhecimento dos possíveis efeitos da criopreservação sobre o neurodesenvolvimento infantil e de assim ter podido contribuir para a defesa dos embriões concebidos *in vitro* e para um futuro mais seguro para todos nós.

1.9 - ABSTRACT

Introduction - The extraordinary technological innovation on assisted reproductive technologies (referred here as ART) has created a “Brave New World(s)” (4) where many infertile couples reached their dream of parenthood. Many ethical, social and juridical challenges have emerged as well.

In the world of the in vitro fertilization (IVF) only a small minority survives all the biological risks which can be even worsened by embryonic cryopreservation that decreases 10% the number of births (5). Only 15 from 100 embryos that reach to be transferred will be born and 4 from these will be born premature or shall have neonatal problems. 2 children among the 11 born at term also will have development problems in broad sense (Hansen, M., Kurinczuk, J., et al. – 2013).

According to Portuguese law (6), human embryo cryopreservation is limited to a period of three years (exceptionally six) after which all supernumerary embryos should be destroyed or used in scientific investigation no matter how many of them could be still viable (Daniel Serrão – 2003) and probably for an increasing period of time (Papis K., Lewandowski P., et al. - 2013).

As far as 3, 5% of all pregnancies in many countries and 2, 1% of all births in Portugal are depending today on IVF (7) and this reality is leading to the increasing perception that a serious and deep discussion is missing. The long-term effects as well as genetic and epigenetic consequences of the various procedures of ART, mainly of cryopreservation, over infantile neurodevelopment are unknown (Wennerholm UB, Söderström-Anttila V, Bergh C. et al. - 2009).

Even underestimating the ethical or the moral issues and giving an advantage to the pragmatic resources which allow generating human beings in the laboratory, the risks imposed to our ecosystem cannot be ignored. It should be done an effort to keep scientific progress compatible with the primacy of human beings and their rights (UN/1975).(8)

The population of our study has been limited to children born without neonatal problems. This option for selecting and comparing only the «best cases» caused the loss of the analysis of some risks such as the prematurity consequences associated to ART. However, if we have chosen a different methodology, the comparison between groups could not be valid because the population is scarce in the universe of cryopreservation.

This investigation work belonging to the field of Bioethics is supported by our professional experience. The empiric study was made to give a contribution to a fabulous scientific seeking but whose practice may be unsafe and disrespecting the «*Primacy of human embryo created in vivo*» (9)

Objective – this study was made to compare the neurodevelopment of a cohort of children who have undergone embryonic cryopreservation with other social and demographically identical but lacking this antecedent. The main objective was to promote knowledge on this field as well as the related ethic reflection.

Methodology - After having written the theoretic foundations of this thesis, we tried to contribute with a personal empiric study based on the neurodevelopment of groups of identical children whose sole differences were their conceptive antecedents. This has

been an analytic and not experimental study that used descriptive, comparative and correlative models.

The method used in socio demographic selection was the same as used in clinical anamnesis. For screening neurocognitive development we used the **Griffiths Mental Development Scales (GMDS)**. For behavior and socialization screening we have chosen the **SDQ- pro (Strengths and Difficulties Questionnaires)**.

We selected 60 children between 20 and 96 months old, born with 36 weeks gestational age or older, and absence of significant neonatal problems. These children were divided into 3 groups according to their conceptive antecedents. The index group named **Group A** was obtained by its convenience. All 19 children from group A have undergone embryonic cryopreservation and were born between January 2007 and August 2010. They belong to a small universe of only 350 individuals where 260 have the conditions for recruitment and no more than 80 new cases are summed each year. The difficult recruitment of samples has imposed the need of a wide net of personal and digital contacts. The mean age group A is 51 months old (L 21 – 96).

The other two studied groups (B and C) include 41 children without cryopreservation. The named **group B** has 22 children submitted to IVF with fresh transference and born between January of 2006 and October 2012. The mean age in group B was 56 months (L 33-85). The named **group C** has 19 children from natural conception and born between May of 2006 and March 2012. The mean age in group C was 48 months (L 20-85).

The children of groups A and B came from Portuguese medical assisted reproductive centers whose technology is similar. The results obtained from anamnesis and through instruments, have been protected and collected in an Excel® sheet and exported to the SPSS 17.0. The analysis of results included parametric and non parametric tests and a bivariate correlation. A multivariate analysis was possible only in few occasions. The Qui square test was used to qualitative variables. Whenever the frequencies were low (<5) the Fischer exact test for tables 2 for 2 was used because it allows maximizing results without increasing discrimination. A value of $P < 0,05$ was considered statistically significant.

There were a few children with particular features equally distributed by the 3 groups. Some were not able to finish the Griffiths scales which have been presented always in the same environmental conditions and applied by the same independent professional.

Results – Although we have made an effort to equal the groups, slight differences in some items may be present anyway: there were more male individuals in group B (6F/16M) and more females in group C (13F/6M). In group C the median age by sex, differs significantly (42,5 months in F versus 55,5 in M) with the found value of $P < 0,04$. The percentage of twins is bigger in group A and it is intermediate in group B.

The groups A and B (alone or associating A+B) and the group C, have the following total medium results and the partial medium results in the six subscales from the GMDS [Legend – general quotient (GQ), MV (medium value), L (limits), SD (standard deviation)]

GQs of: group A – MV 103,4 (L 86-116) SD 5,48/ Group B – MV 107,5 (L 87 -118) SD 5,57/ Group A+B – MV 105,76 (L 86-118) SD 5,65/ Group C – MV 108,7 (L 102-122) SD 4,47

A – Motor development: Group A – GQ 102,63 (L 83-122) SD 6,24/ Group B – GQ 107,40 (L 79-131) SD 7,21/ Group A+B – GQ 105,39 (L 79-131) SD 7,21/ Group C – GV 113,05 (L 92-140) SD 6,93

B - Personal-Social: Group A – GQ 111,06 (L 95-130) SD 5,92/ Group B – GQ 112,68 (L 83-131) SD 6,93/ Group A+B – GQ 112 (L 83-131) SD 6,93/ Group C – GQ 114,33 (L 96-144) SD 6,93

C –Language: Group A – GQ 104,75 (L 79-143) SD 8,0/ Group B – GQ 109,09 (L 91-133) SD 6,48/ Group A+B – MV 107,26 (L 79-143) SD 8,0/ Group C – GQ 112,55 (L 74-141) SD 8,18

D - Eye and hand co-ordination: Group A – GQ 98,06 (L 73-117) SD 6,63/ Group B – GQ 104,90 (L 84 -122) SD 6,16/ Group A+B – GQ 102,02 (L 73-122) SD 7,0/ Group C – GQ 99,83 (L 83-118) SD 5,91

E - Performance: Group A – GQ 103,50 (L 90-121) SD 5,92/ Group B – GQ 107,50 (L 87 -125) SD 6,16/ Group A+B – GQ 105,81 (L 87-125) SD 6,16/ Group C – GQ 107,05 (L 93-121) SD 5,29

F – Practical Reasoning: Group A – GQ 100,80 (L 74-117) SD 6,56/ Group B – GQ 104,81 (L 87 -119) SD 5,66/ Group A+B – GQ 103,72 (L 74-119) SD 6,70/ Group C – GQ 104,94 (L 92-117) SD 5

SDQ – Por: results from the 3 groups A, B and C

Results in		GQ	Emotion	Behavior	Hiper activity	Relation	Pro Social behavior
GroupA	N	10(66,6%)	11(73,3%)	9(60%)	12(80%)	10(66,6%)	12 (80%)
T19/A15	L	2	2	2	3	0	0
(78,94%)	AN	3	2	4	0	4	2
GroupB	N	8 (72,7%)	10(90,9)	7 (63,6%)	8(72,7%)	7(63,6%)	10(90,9%)
T22/A11	L	-	-	1	-	2	1
(50%)	AN	3	1	3	3	2	-
Group A+B	N	18(69,2%)	20(76,9%)	15(57,7%)	19(73%)	16(61,5%)	21(80,8%)
T41/A26	L	2	2	3	3	2	1
(63,4%)	AN	6	3	7	3	6	2

N	10(71,4%)	10(71,4%)	10 (71,4%)	10(71,4%)	10(71,4%)	13 (92,8%)
---	-----------	-----------	------------	-----------	-----------	------------

Group C

T19/A14	L	3	3	1	1	3	1
(73,68%)							
	AN	1	1	3	3	1	-

Legend: General Quotient = GQ; Normal Behavior = N; Limit Behavior = L; Not Normal Behavior = AN; T = total; Children submitted to test = A

Discussion and analysis of results - The effort to gather statistically significant and enough sample size within the conditions of our methodology, has allowed the analysis of 7, 3% of the scarce index universe (TEC).

We have compared the GQ (media of results) of each group according to the antecedents of its conception. If we had compared only the groups A and C and forgotten the effects of IVF alone (which may be distinct or less than what is caused by the association with cryopreservation) revealed in group B elements, we would have superimposed an important bias. The 3 groups reached a normal GQ in all scales of the EDMG but the GQ of the group A = 103,4 was less than that of group B = 107,5 and much less than that of C = 108,7. There is a significant difference ($p < 0,03$) if comparing the GQ from group C with that of the groups A and B together (A + B) whose GQ = 105,76 (L 86 – 118; median 109). The group C went always better than group A and went better than group B in 5 of the 6 scales of EDMG. That difference among groups is significant only between groups C and A and just only in the scales of Motor Development ($p < 0,03$) and of the Language ($p < 0,01$).

Age and sex differences between groups didn't influence results but the probability of finding a child with a GQ 2 SD under the media of its group is bigger in the group A ($p < 0,32$) and B ($p < 0,01$) when compared with the group C of natural conception.

To be above median is uncommon and such situation occurs identically in all groups. The twins from group B showed higher GQ than non twins and this difference is significant ($p < 0,03$) however there were not such a difference in group A.

The results from the SDQ-Por are similar in the 3 groups but this test had lesser statistical strength because it has been finished only by 66,6% of children. 10% of all had abnormal results and another 10% had results in the limits of normality.

Conclusion – the GQ found in this cohort of children born without neonatal problems but who has been submitted to IVF and cryopreservation, showed corresponding to a normal neurodevelopment although not so high as that of naturally conceived children. That difference is statistically significant in the results of the group C in GMDS scales of motor development and language as well as in its higher probability of having a GQ lower than 2 SD inside its own group or in the other 2 groups from this study. In other words we can say that a naturally conceived child has a lower probability of having a neurodevelopmental handicap. The emotional characteristics as well as the hyperactivity and socialization profiles screened by SDQ-Por, didn't differ significantly among groups.

The **main conclusion** of this study is that children conceived with IVF and cryopreservation may have normal neurodevelopment and behavior but the median of their GQ is not as high as that of the naturally conceived children. They are also more prone to differ more than 2SD from medium results of its and other groups.

We hope our work had contributed to a better knowledge of the effects of cryopreservation over children's neurodevelopment and to promote the rights of the *in vitro* conceived embryos in parallel with a safer future to humankind.

Translation of notes: (4) *reference to the famous work of Aldous Huxley named «Brave new world» where the author describes in a scaring way the technologies of ART as well as the predictable unhuman societies of the future.*(5) 11ª Acta da Comissão Nacional da PMA, de 9 de Maio de 2008 (6) *Lei n.º 32/2006- Procriação medicamente assistida. (Assisted Reproductive Technologies) Artigo 9.º - Investigação com recurso a*

embriões (investigation using human embryos) and *Artigo 25.º Destino dos embriões* (destiny of the embryos).

(7) http://www.cnpma.org.pt/Docs/RELATORIO_ACTIVIDADE_PMA2011.pdf

(8) Declaration on the use of scientific and technological progress in the interest of peace and for the benefit of mankind. UN, November 1975 – Resolution N.3384 (XXX). (9) Analogy with article N.2 of Oviedo Declaration (from The Convention on Human Rights and Biomedicine in 1997), when defending the *Primacy of the human being* by saying: “*the interests and welfare of human being shall prevail over the sole interest of society or science*”. (10) GMDS licensed by the “Association for Research in Infant and Child Development” (ARICD)

1.10 - Palavras-chave em português e inglês

Palavras-chave: Bioética, direitos do embrião, procriação medicamente assistida (PMA), fertilização in vitro (FIV), criopreservação embrionária, neurodesenvolvimento infantil

[*Key Words:* Bioethics, human embryo rights, assisted reproduction technology (ART), in vitro fertilization (IVF), cryopreserved embryos, child neurodevelopmental outcome]

1.2 - PRINCIPAIS ABREVIATURAS

ADN - Ácido desoxirribonucleico

APF – Associação Portuguesa de Fertilidade

ARN – Ácido ribonucleico

CNECV - Comissão Nacional de Ética e Ciências da Vida

CNPMA - Comissão Nacional da Procriação Medicamente Assistida

EDMG - Escalas de Desenvolvimento Mental de Ruth Griffiths

ESHRE - *European Society of Human Reproduction and Embryology*

FIV – Fertilização *in-vitro*

GIFT – Transferência intra tubária de gâmetas

HFEA – *Human Fertilisation and Embryology Authority*

ICCP - Inventário do Comportamento da Criança para Pais

ICSI - Iniciais do inglês para *intracytoplasmic sperm injection*

IMC – Índice de massa corporal o qual mede a corpulência e determina-se dividindo o peso, em quilogramas, pela altura em metros, elevada ao quadrado (peso/altura²)

IMSI – Técnica de melhoria do procedimento habitual da FIV com micromanipulação.

IPSCs – *Induced pluripotent stem cells*

OHSS – Síndrome de hiper estimulação ovárica

OMS - Organização Mundial de Saúde

PCR - Proteína C reativa basal

PMA – Procriação Medicamente Assistida

RCIU - Restrição de crescimento intra uterino

RN - recém nascido

UCIRN - Unidade de Cuidados Intensivos para recém nascidos

SPD - Por – versão portuguesa do Questionário de Capacidades e de Dificuldades

UCP - Universidade Católica Portuguesa

ZIFT - Transferência intratubária de zigotos

1.3 - TERMINOLOGIA BÁSICA

Amniocentese: recolha cirúrgica de líquido amniótico visando a análise de células ou substâncias nele contidas.

Bancos de esperma: espaços existentes em estabelecimentos de saúde que realizam a colheita, análise e conservação de sémen humano, para utilização nas técnicas da PMA

Criopreservação: conservação pelo frio, congelamento.

Diagnóstico pré implantatário: tipo de diagnóstico só possível no âmbito da PMA, por ser realizado antes da transferência do embrião para a cavidade uterina.

Diagnóstico pré natal: diagnóstico realizado durante a vida intra uterina.

Dador de gâmetas: pessoa que proporciona o(s) ovócito ou o(s) espermatozoide necessário para realizar uma fecundação artificial

Doação de ovócitos: processo através do qual se extraem óvulos de uma mulher, os quais serão fecundados e implantados no útero de outra.

Embrião: este termo aplica-se ao zigoto, e às fases sucessivas do seu desenvolvimento, até o fim do 2º mês de gestação. Altura em que passa a designar-se por feto.

Embriões excedentários: todos aqueles que tendo sido produzidos pela PMA, não foram implantados.

Epigenoma: o epigenoma é formado pelos **factores epigenéticos** que funcionam como uma espécie de reguladores ou genes adicionais que modulam a expressão dos genes propriamente ditos.

Espermatozoide: é a célula reprodutora ou gâmeta masculino.

Fecundação in vitro (FIV): consiste na junção de óvulos e espermatozoides, realizada numa proveta ou placa especial, tendo como objetivo a formação extra corpórea de embriões.

Fecundação/fertilização: Fusão do óvulo com o espermatozoide.

Gâmetas: são as células reprodutoras ou germinais (espermatozoides e ovócitos)

Gastrulação: processo formativo mediante o qual as três camadas germinativas precursoras de todos os tecidos embrionários e a orientação axial são estabelecidas.

Genoma: é formado pela ADN ou código genético.

GIFT: transferência intratubária de gâmetas. Por via laparoscópica, são introduzidos na trompa, sémen e ovócitos (1 ou 2) aguardando-se que a fecundação ocorra. Os gâmetas também podem ser depositados na cavidade uterina simulando as condições naturais.

Imprinting: consiste numa diferente metilação dos genes, o que impede a etapa da transcrição e só deixa ativo um dos alelos do par.

Inseminação artificial: é a fecundação feminina através da introdução de sémen na vagina ou na cavidade uterina, sem existência de coito.

Inseminação artificial homóloga/heteróloga: é a inseminação praticada com material genético pertencente ou não ao casal estéril.

Maternidade sub rogada ("sub-rogação"): processo em que uma mulher permite que um ovócito alheio fertilizado seja introduzido no seu útero a fim de gerar o filho de outra mulher que não pôde ou não quis assegurar a gravidez. Trata-se de substituição judicial de uma pessoa ou coisa por outra (in Dicionário Priberam da Língua Portuguesa <http://www.priberam.pt/dlpo/sub-roga%C3%A7%C3%A3o>)

Nascituro: o termo *nasciturus*, ou embrião implantado, significa o ser destinado a nascer.

Ovócito: é a célula reprodutora ou gâmeta feminino produzido nos ovários.

Prematuro ou pré termo: criança nascida antes das 37 semanas de IG

Reprodução: é a duplicação celular sucessiva com posterior desenvolvimento anatómico, bioquímico e diferenciação neurofisiológica.

Sémen: é o líquido oriundo do aparelho reprodutor masculino e que contem os espermatozoides em suspensão.

Transferência de embriões: é o transporte dos embriões obtidos pela FIV desde o laboratório até ao interior do útero feminino, onde se irão implantar.

Zigoto - é uma célula diploide, na última fase de fecundação, quando já estão unidos os cromossomas provenientes do espermatozoide e do ovócito.

1.4 – NÍVEIS DE EVIDÊNCIA CIENTÍFICA

Os estudos sobre os resultados clínicos obtidos com as várias intervenções, nem sempre satisfazem critérios de qualidade. Enfrentando a questão da qualidade dos efeitos produzidos, Austin Bradford Hill, um epidemiologista e estatístico britânico, publicou em 1965 um conjunto de critérios destinados a avaliar a causalidade entre uma doença ou condição de saúde e a exposição sofrida prévia ou concomitantemente pelos indivíduos (Bradford-Hill, A. - 1965).

A possibilidade de avaliar os níveis de evidência dos estudos científicos, deu início a um movimento crítico que assentou nos nove **Critérios de Bradford-Hill** que se podem enunciar do seguinte modo ^{11,12}:

1. **Força da associação:** A força da associação é medida pelo risco relativo ou pelo *odds ratio* e, quanto maior este for, mais provável é que haja causalidade.
2. **Consistência:** deve haver relação condizente entre os achados de um estudo e os achados de estudos similares. Uma situação deve poder observar-se em diferentes ocasiões.
3. **Especificidade:** é a relação direta (específica) existente entre a exposição e a causa da doença.
4. **Temporalidade:** a exposição à causa deve preceder a consequência.
5. **Gradiente biológico** (efeito dose-resposta): deve ser proporcional e mensurável em gradiente.
6. **Plausibilidade biológica:** a associação deve ter uma explicação plausível, consistente, com evidência biológica e concordante com o nível atual dos conhecimentos.
7. **Coerência:** os achados devem seguir as evidências da ciência atual.
8. **Evidências experimentais:** se existirem mudanças na exposição, deverão mudar igualmente os padrões da doença.

¹¹http://www.actamedicaportuguesa.com/info/apresentacoes_simposio/14_FranciscoBatelMarques.pdf

¹² http://pt.wikipedia.org/wiki/Crit%C3%A9rios_de_Hill

9. **Analogia:** permite uma explicação alternativa com outras doenças ou com outras exposições.

Para qualquer associação há essencialmente dois tipos de evidência¹³:

- **POEM – Patient Oriented Evidence that Matters**

Este tipo de evidência analisa as situações do ponto de vista do doente tais como: mortalidade, morbidade e qualidade de vida.

- **DOE – Disease Oriented Evidence**

Este tipo de evidência analisa as situações do ponto de vista da etiologia da doença, fisiopatologia, patologia clínica e farmacologia.

Quanto mais critérios de Bradford-Hill forem preenchidos por uma determinada realidade, maior a possibilidade de existir uma associação de "causa e efeito".

Após o contributo deste epidemiologista visando um maior rigor, surgiram outros modelos quer nas avaliações quer nas tomadas de decisão. Foi assim que emergiu a denominada Medicina Baseada na Evidência (MBE) muito divulgada como método, e que pode ser definida como a «aplicação consciente, explícita e criteriosa, da melhor evidência científica disponível na tomada de decisões sobre o cuidado individual dos doentes» (Azevedo, L.F., Costa Pereira, A. -2007)

O principal objetivo destas metodologias na avaliação sistemática e crítica das evidências científicas, assenta em três questões essenciais (Azevedo L.F., Costa Pereira A. – 2008):

- (1) Avaliação da validade ou qualidade metodológica das publicações científicas.
- (2) Avaliação da importância científica e prática dos resultados.
- (3) Avaliação da aplicabilidade prática dos resultados.

Têm sido estabelecidos e são muito utilizados, diversos níveis de evidência na avaliação crítica das publicações científicas. Existem distintas hierarquias de evidência disponíveis, mas são todas muito semelhantes entre si. Uma das mais conhecidas é a

¹³ Em http://www.bvs.eportuguese.org/seminario/public/documents/BVS_cochrane-161318.pdf

que foi estabelecida pelo *Oxford Centre for Evidence-based Medicine (OC-EBM)*¹⁴ que apresentamos no quadro 1.

Uma verdadeira autoridade no levantamento do conhecimento científico publicado é a «*The Cochrane Collaboration*» surgida em 1993 e criada pelo Professor Archibald Leman Cochrane (1909 - 1988). A *Cochrane* é uma ONG internacional e independente com mais de 28 000 colaboradores em mais de 100 países, que se dedicam à missão de recolher e atualizar informação sobre cuidados de saúde e prontamente a disponibilizarem para todo o mundo. É considerada líder em cuidados de saúde baseados na evidência e os seus colaboradores trabalham em conjunto, produzindo revisões sistemáticas designadas *Cochrane Reviews*, que depois são publicadas na *The Cochrane Library*. É um trabalho de grande credibilidade, utilidade e mérito.

A *Cochrane Collaboration* possui critérios de evidência próprios mas idênticos aos da *Oxford Centre for Evidence Based Medicine (OC-EBM)* que, por sua vez, são mais conhecidos. Apesar da enorme utilidade destes sistemas de validação, estas hierarquias de evidência não são suficientes e há que submeter todos os resultados considerados importantes, a um escrutínio ainda mais rigoroso. Mesmo em estudos que utilizam metodologias aparentemente robustas, podem surgir factores de enviesamento. Quando falamos em *vieses*, estamos a referir-nos aos erros sistemáticos que comprometem a validade dos resultados de um estudo.

Em Portugal, o Departamento da Qualidade da Direção Geral de Saúde (DGS) em parceria com a Ordem dos Médicos, adota como base para a emissão de Normas Clínicas, os Graus de Recomendação e os Níveis de Evidência constantes nas Tabelas 1 e 2, sempre que outros não sejam referidos na própria norma.

¹⁴ Disponível em <http://www.cebm.net>.

Quadro 1 - Classificação de Oxford Centre for Evidence-Based Medicine

Nível de evidência	Tipo e qualidade do estudo	
<p>I – A RS/Meta-análise de RCTs</p> <p>I - B RCT individual com IC-95% estreita</p>	<p>Revisão sistemática normalmente feita por vários autores.</p> <p>A conhecida Colaboração Cochrane facilita e coordena revisões sistemáticas desde 1995</p>	<p>Revisão - Síntese de resultados de 2 ou mais publicações sobre determinado tema</p> <p>Revisão sistemática - tentativa de sintetizar a literatura existente sobre um tema referindo os critérios de inclusão ou de exclusão dos estudos consultados</p> <p>Meta-análises - técnica estatística que sintetiza resultados de vários estudos e revisões independentes visando elaborar uma síntese ainda mais validada</p>
<p>II – A RS de estudos de <i>coorte</i></p> <p>II - B Estudo de <i>coorte</i></p> <p>RCT de baixa qualidade</p> <p>II – C Out come research</p> <p>Estudos ecológicos</p>	<p>Ensaio clínico randomizados</p>	<p>RCT - randomized controlled trial</p> <p>RS - randomized survey</p>
<p>III – A RS de estudos de caso-controle</p> <p>III – B Estudo individual de caso-controle</p>	<p>Ensaio clínico não randomizados: <i>coorte</i>, série temporal</p>	<p>Reporta-se à evidência científica obtida mediante estudos não experimentais, bem desenhados, tais como estudos comparativos, estudos de correlação e relatórios de casos</p>
<p>IV - Série de casos</p> <p>Estudos de <i>coorte</i> e de caso-controle de baixa qualidade</p>	<p>Caso-controle, estudo de caso</p>	<p>Estudos de casos individuais ou de conjuntos de casos individuais</p>
<p>V - Opinião de peritos</p>	<p>Opiniões de especialistas, baseado em evidência clínica, estudos descritivos ou pareceres de grupos de especialistas</p>	
<p>VI</p>	<p>Investigação experimental – in vitro</p>	

RCT - *randomized controlled trial*, **RS** - *randomized survey*

GRAU DE RECOMENDAÇÃO	DESCRIPTIVO
Grau I	Existem evidências e/ou consenso geral de que determinado procedimento/tratamento é benéfico, útil e eficaz.
Grau II	Existem evidências contraditórias e/ou divergência de opiniões sobre a utilidade/eficácia de determinado tratamento ou procedimento.
Grau II A	Evidências/opinião maioritariamente a favor da utilidade/eficácia.
Grau II B	Utilidade/eficácia pouco comprovada pelas evidências/opinião
Grau III	Existem evidências e/ou consenso geral de que determinado procedimento/tratamento não é benéfico/ eficaz e poderá ser em certas situações prejudicial.

Tabela 1: Graus de recomendação (adaptado e traduzido de www.escardio.org)

NÍVEIS DE EVIDÊNCIA	DESCRIPTIVO
A	A informação recolhida a partir de vários ensaios clínicos aleatorizados ou meta-análises
B	A informação recolhida a partir de um único ensaio clínico aleatorizado ou estudos alargados não aleatorizados.
C	Opinião consensual dos especialistas e/ou pequenos estudos, estudos retrospectivos e registos

Tabela 2: Níveis de evidência. Adaptado e traduzido de www.escardio.org

2 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 - INTRODUÇÃO

Ao iniciarmos o enquadramento teórico desta dissertação, que abrange várias áreas científicas, gostaríamos de expor as etapas que percorremos no estudo exploratório, englobando não só a vertente clínica mas também aspectos jurídicos e bioéticos. Por se tratar de um tema complexo, para o qual a bibliografia disponível é vasta e se encontra dispersa, recorreremos à estratégia de individualizar cinco capítulos principais de pesquisa teórica e que foram os seguintes:

- Um primeiro capítulo dedicado à evolução de Medicina da Reprodução, focado na infertilidade e designado «**Infertilidade e Medicina da reprodução**».
- Um segundo capítulo que incluiu uma revisão alargada das variáveis em estudo e designado «**Contributos da procriação medicamente assistida para a reprodução humana**».
- Um terceiro capítulo direcionado aos aspectos da transmissão genética e do desenvolvimento humano sob os efeitos ambientais e biológicos das várias tecnologias e fármacos usados na PMA, designado «**Importância do meio ambiente no desenvolvimento humano**».
- Um quarto capítulo com questões legais e de reflexão bioética sobre a PMA e a criopreservação embrionária designado «**Aspectos bioéticos e jurídicos da PMA e da criopreservação embrionária**».
- Um quinto capítulo com considerações sobre neurodesenvolvimento infantil e a descrição das características e dos motivos de escolha dos instrumentos psicométricos utilizados na avaliação neurocognitiva das crianças deste estudo e designado «**Neurodesenvolvimento infantil - considerações e avaliação**».

As implicações e a formulação das principais hipóteses de investigação são abordadas na 3ª parte da dissertação designada «**Estudo comparativo do neurodesenvolvimento de crianças cujos embriões estiveram criopreservados**» e

que constituiu o nosso contributo pessoal e estudo empírico deste tema.

A questão principal centrou-se na avaliação comparativa do neurodesenvolvimento de crianças anteriormente submetidas a criopreservação e este tema mereceu toda a atenção que a bibliografia disponível e os resultados da investigação permitiram.

2.2 - INFERTILIDADE E MEDICINA DA REPRODUÇÃO

2.2.1 – Origem do conceito e definição de infertilidade

Embora ao longo da História e até ao século XX, a infertilidade fosse interpretada como uma circunstância natural, foi sempre sentida como uma “maldição ou castigo” e a procura das causas de tal desvantagem biológica levou a uma persistente busca de soluções. Uma genuína necessidade de ultrapassar a adversidade e torná-la suportável, contribuiu para desenvolver a Medicina da Reprodução e mantê-la na vanguarda do conhecimento.

Hoje sabemos que «o ponto de partida, o equivalente a um *big-bang* pessoal, é a fusão dum óvulo com um espermatozoide» (Albert Jacquard -1998) mas, nas comunidades primitivas, a mulher era entendida como a "terra" em que o homem depositava a sua "semente" e, por analogia, a incapacidade, para gerar descendência, era-lhe tradicionalmente atribuída.

Recordando duas narrativas, que tão bem ilustram o sofrimento causado pela esterilidade, evocamos aquelas em que Oseias, na antiga sociedade de Israel, profetizou que o castigo de Deus incluiria “ventre estéril e seios secos” (Os.9.15) e a de Abraão que permaneceu sem filhos mesmo após dez anos vivendo com Sarah na Terra de Canaã. Sarah conseguiu ser mãe dando à luz Isaque, mas apenas após a serva Hagar ter tido um filho (Ismael) de Abraão. Primitivamente, quando um casal não conseguia procriar, era permitido ao marido tomar outra mulher e com ela gerar filhos que eram depois atribuídos ao casal legítimo. No episódio do difícil confronto com o rei Abimeleque que fora seduzido pela linda mulher do profeta, também está escrito que:

«Abraão orou a Deus, e Deus sarou Abimeleque e a sua mulher e as suas servas, de maneira que tiveram filhos» (Gn 20.17-18).

As causas do insucesso procriativo são muitas e frequentemente inexplicáveis mas, é nos mitos antigos, alheios a tais conhecimentos, que assenta a etimologia de muitos dos vocábulos que hoje utilizamos. Na Bíblia Hebraica, o termo “estéril” é designado por “agar” e é muito semelhante ao que significa “infecundo, impotente, desenraizado”. A violência contida na palavra é tão forte que as suas declinações assumem os sentidos de arrancar, desenraizar e desjarretar, significando este último vocábulo o corte de ligamentos e tendões, uma prática infligida às montadas dos inimigos durante a guerra (Schokel, L.A. – 1997). Da semelhança dos conceitos, sobressai a intensidade e a carga emocional da palavra (Schwartz, S.- 2004), uma vez que a falta de descendência retirava poder ao indivíduo mesmo no meio do seu povo.

Na etimologia das palavras, também podemos encontrar questões análogas à eterna e curiosa «precedência original do ovo ou da galinha» e um exemplo são as palavras testículo e testemunha. Embora se aceite que a palavra testemunha deriva da palavra testículo, supostamente porque havia o hábito dos homens jurarem falar verdade sobre este segmento da sua anatomia, há autores que defendem precisamente o contrário porque «testis» em latim (= testículos) já significava testemunha¹⁵. Desta origem se depreende que os testículos eram vistos como "testemunhas de virilidade", o que é revelador duma intuição sobre o seu papel. A palavra sémen por exemplo, deriva do vocábulo latino «semens» (semente) tal como esperma deriva do grego «spérma» (semente). O sémen, o líquido no qual se movem os espermatozoides (palavra que significa «em formato de semente») não é, como hoje se sabe, a única fonte de vida mas a semântica antecedeu muito este conhecimento e foram necessários muitos séculos para se conhecerem as principais causas de infertilidade.

¹⁵ Origem das Palavras. Curiosidades lingüísticas. Pesquisa e texto de Vivian Magalhães em <http://jovemdez.no.comunidades.net/index.php?pagina=1026031840>

Os termos esterilidade e infertilidade são por vezes usados de forma indistinta, mas denominam situações diferentes e para as quais a Ciência tem contribuído de forma diversa. Enquanto a esterilidade é uma condição definitiva que implica sempre infertilidade, o contrário não é verdadeiro. A infertilidade pode ser transitória. Bastará que um elemento do casal seja estéril para que ambos sejam inférteis, mas a infertilidade de um deles não implica a esterilidade de ambos. Os dois termos pertencem ao léxico mais comum, e ambos se aplicam, às situações em que existe dificuldade em procriar. Contudo, a sua definição clínica está bem estabelecida e designa condições concretas:

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define infertilidade como a “ausência de gravidez após dois anos de relações sexuais regulares e sem uso de contraceção” (DGS – 2006). Alguns clínicos antecipam a investigação das causas e a intervenção terapêutica quando, ao fim de 12 meses de vida conjugal ainda não aconteceu a gravidez. Como o factor tempo aumenta o sucesso reprodutivo, há quem, sobretudo na Europa, designe por «subfertilidade» muitos dos casos que caberiam na definição estrita de infertilidade, mais divulgada nos Estados Unidos. Também se verifica que, alargando a 36 meses o prazo de espera que na definição oficial corresponde a dois anos, se obtém um aumento de 50% na probabilidade de um casal «subfertil» ter conseguido gerar descendência (Gnoth C, Godehardt E. et al. – 2003) e (Gnoth C, Godehardt E, Frank-Herrmann P. et al. - 2005).

Ao longo do texto adotaremos o termo infertilidade¹⁶ para referir as situações de ausência de gravidez ao fim de 12 meses de vida heterossexual ativa no período considerado fértil do ciclo menstrual e sem recurso a meios anti concetivos (Evers, J.L. – 2002). Diz-se que a infertilidade é *primária* quando nunca houve uma gravidez prévia e que é *secundária* nos restantes casos, mesmo que os antecedentes sejam de gravidez ectópica ou de aborto (DGS – 2008).

¹⁶ Nos Estados Unidos é mais usada a designação infertilidade (Gnoth, C., Godehardt, D., Godehardt, E. et al. – 2003)

2.2.2 – Evolução da Medicina da Reprodução

Não sendo possível evocar todo o percurso do conhecimento, podemos no entanto afirmar que a associação das dificuldades procriativas a profundos sentimentos de rejeição favoreceu, e muito, o desenvolvimento da Medicina da Reprodução.

Os egípcios ainda que limitados à consciência dos factos mais óbvios, terão sido dos primeiros povos a divulgar segredos para predizer a esterilidade ou para diagnosticar precocemente uma gravidez (Morice, P., Josset, P., Dubuisson, J.B. – 1995). Nos antigos hieróglifos e posteriormente nos escritos deixados por Hipócrates (460 – 370 A.C.) que recuperou muitos conhecimentos ancestrais, encontram-se diversas alusões ao problema da infertilidade conjugal bem como a plantas medicinais e até a curiosas mezinhas que se mantiveram em uso até ao século XVIII. A planta Mandrágora por exemplo, cujas raízes sugerem fetos, era conhecida como um afrodisíaco facilitador da fertilidade feminina e um recurso empírico para a impotência masculina, a que a própria Bíblia faz alusão (Gn 30.14-20) (12,15).

*Nome científico **Mandrágora officinarum L.** - há registos do uso medicinal de mandrágoras desde a antiguidade. Esta planta possui uma raiz muito peculiar a que são atribuídas ações calmantes e analgésicas, mas que se sabe poder causar alucinações quando é ingerida em doses elevadas. Esta planta ancestralmente classificada como macho e fêmea, tornou-se conhecida como remédio para a impotência sexual masculina. De acordo com o antigo naturalista romano Plínio (“o velho”), a mandrágora é macho quando as folhas são largas e a raiz é preta por fora e branca por dentro. No caso da planta fêmea a raiz é toda preta e as suas raízes são bifurcadas¹⁷.*

¹⁷ <http://herbologiamistica.blogspot.pt/2011/04/magia-da-mandragora.html>



Fig. 1 - *Mandrágora* – Fotografia de duas raízes antropomórficas de Mandrágora.



Fig. 2 - Ilustração do manuscrito do séc. XV "*Tacuinum Sanitatis*"¹⁸

¹⁸<http://bruxaria-tradicional.blogspot.pt/2011/04/bruxaria-tradicional-mandragora.html>

A par das persistentes tentativas de vencer a adversidade que a esterilidade representa, sempre houve a ideia de que as mulheres eram as principais responsáveis pelas dificuldades reprodutivas dum casal e esta convicção que era bem aceite, prevaleceu até ao fim da Idade Média. De acordo com dados históricos, a inseminação artificial poderá ter sido iniciada pelos povos árabes que a praticaram em animais por volta de 1322. Um século mais tarde, em 1420, há notícia de que D. Joana de Portugal, segunda mulher do rei Henrique IV de Espanha, terá tentado dar um herdeiro ao trono, ajudada por médicos espanhóis e recorrendo a métodos artificiais (Pussi, W. A. - 2005). Esta célebre e nobre tentativa poderá ter sido a primeira inseminação artificial em seres humanos, embora a esterilidade do monarca tenha impedido o êxito. Apesar dos avanços clínicos, o total obscurantismo sobre a biologia da reprodução manteve-se até à invenção do microscópio por Anton von Leeuwenhoek¹⁹ que permitiu a descoberta dos espermatozoides em 1677. O jovem aluno Johamm Ham terá sido o primeiro a identificar os gâmetas masculinos, mas foi o seu mestre Leeuwenhoek quem descreveu a notável observação e a relacionou com o enigma da procriação. Na mesma época foram publicados outros estudos da sua autoria, sobre a anatomia do ovário e a nidação embrionária.

O facto da publicação de factos científicos se ter generalizado na Europa e nos Estados Unidos a partir do séc. XVIII, incentivou a experimentação e a procura de novas soluções para a infertilidade. Em 1776, o biólogo italiano e também monge jesuíta Lázaro Spallanzani, opositor das teorias da geração espontânea, foi o primeiro a estudar as consequências da congelação de sémen e a conseguir a inseminação artificial de uma cadela em 1782²⁰.

No ano de 1785, Auguste Thouret professor da Faculdade de Medicina de Paris conseguiu fecundar a sua mulher, com a aplicação intravaginal do sémen próprio, recorrendo para tal a uma seringa de estanho. (Fernandes T.B., 2000, p. 50). Também ficou célebre o êxito do médico escocês John Hunter²¹ que inseminou uma mulher com

¹⁹ Anton von Leeuwenhoek and his perception of spermatozoa. Chapter 4:4.1 Leeuwenhoek and images of Homunculi . Adapted from an article by EG Ruestow, J. History of Biology 16: 185-224. Em <http://10e.devbio.com/article.php?ch=4&id=65>

²⁰ Lázaro Spallanzani. In Infopédia [Em linha]. Porto: Porto Editora, 2003-2014.

²¹ [Premières IAC:John Hunter : 1785-90 (patron de Jenner) Un cas de mari hypospade]

esperma do epidídimo do seu marido portador de hipospadias (deformação da uretra) permitindo o nascimento dum filho de ambos em 1791²². Apesar desta evolução, só em 1827 é que se identificaram os ovócitos no tecido ovárico e, a grande descoberta de que o embrião provém do encontro dum espermatozoide com um ovócito, só ocorreu em 1843.

Já várias publicações tinham divulgado casos bem-sucedidos de inseminação artificial homóloga, quando William Pancoast inovou a técnica com o uso de sémen de dador. Esta possibilidade causou grande alvoroço no meio científico e deu origem ao primeiro caso conhecido de gravidez por inseminação artificial heteróloga, em 1884²³. Em 1886, Montegazza propôs a formação de bancos de esperma congelado e Mariom Sims, que é considerado o pai da Ginecologia, aperfeiçoou o método aplicando esperma diretamente no útero e publicando uma descrição detalhada da sua técnica. Em 1889, Robert Dickison que foi presidente da Sociedade Americana de Ginecologia reportou o que designava por «impregnações» e que mais não eram do que inseminações com sémen de dador. Os relatos de tais práticas foram, não só publicados, como até promovidos, atribuindo-se-lhes vantagens eugénicas que faziam sucesso na época (Swason, K W. – 2012). Os bancos de sémen proliferaram durante a Segunda Guerra Mundial e foram concebidas milhares de crianças, que nasceram enquanto os pais combatiam (Fernandes - 2000, p. 50). Na Alemanha distinguiu-se o médico H. Schultze pela sua investigação em Medicina da Reprodução²⁴.

O conceito de «bebé proveta» foi ganhando consistência e, em 1932, foi publicada a famosa obra de Aldous Huxley «Brave New World» (Admirável Mundo Novo, na tradução portuguesa) em que o autor descreve de forma profética, não só a tecnologia da reprodução artificial como todos os riscos que lhe poderão estar subjacentes.

Em 1944, o ginecologista John Rock da Harvard Medical School e a sua assistente Miriam Menkin conseguiram obter quatro embriões, após inúmeras tentativas

²² (UNESCO/IUBS/Eubios Living Bioethics Dictionary version 1.3 http://homepage.univie.ac.at/herbert.gottweis/WiSe2005/Se_BioPolWiSe2005/EUBIOS-Bioethics%20Dictionary.pdf)

²³ (<http://theocatho.unistra.fr/maj/pdf/thiel%20dieu%20et%20la%20vie%20-%20chenu.pdf>)

²⁴ Cruz, A., Bioética Cristiana, Una propuesta para el tercer milenio, Introducción al Derecho de Familia, Pág. 287

laboratoriais de colocação de ovócitos humanos em presença de espermatozoides ²⁵. Estes dois cientistas não ousaram introduzir os «seus» embriões na cavidade uterina e interromperam as tentativas devido ao elevado número de insucessos, mas o desenvolvimento da fertilização in vitro (FIV) deve muito ao seu contributo (Papis, K., Lewandowski, P. et al. – 2013)

Coube a Robert G. Edwards o primeiro êxito da FIV, assinalado com o nascimento de Louise Brown em 1978 no Reino Unido. Foi este pioneiro que pronunciou a emblemática frase: "The most important thing in life is having a child,(...)" (*A coisa mais importante na vida é ter um filho. Nada é mais especial do que uma criança*) e por isso, o reconhecimento do seu mérito com a atribuição do prémio Nobel da Medicina em 2010, não só reforçou o sentimento generalizado de que a capacidade de procriar é um dom, como veio legitimar alguma ousadia na investigação e na prática da PMA (Gallagher, J. - 2013).

A partir de 1947 começou a ser divulgada a possibilidade de se congelarem e posteriormente se aquecerem embriões animais, em estado pré implantatório, permitindo adiar o seu desenvolvimento intrauterino (Oliveira Borges, 2000, p.12); um pouco mais tarde generalizou-se a criopreservação de gâmetas e, em 1973, foi muito noticiado o sucesso da equipa de David, G. (David, G. – 2009), que congelou o sémen dum rapaz de 13 anos com doença de Hodgkin e 23 anos mais tarde, através de ICSI, este jovem conseguiu a fertilização de 5 ovócitos da sua jovem mulher. Foram transferidos 3 embriões que deram origem ao nascimento de gémeos em 1997 (*Le Monde 02/09/04*)²⁶.

A primeira gravidez humana, obtida com a técnica de criopreservação embrionária, conduziu ao nascimento de Zoe Leyland em 1984, uma menina australiana cujo embrião esteve congelado dois meses. No mesmo ano nasceu o primeiro ser humano concebido com ovócitos doados e, em abril de 2004 conseguiu-se a primeira gravidez a partir de tecido ovárico criopreservado (Wang, J., Sauer, M.V. - 2006).

²⁵ First Human Eggs Fertilized in a Laboratory in <http://www.pbs.org/wgbh/americanexperience/features/general-article/babies-first-eggs-fertilized/>

²⁶ http://www.chu-besancon.fr/erebf/c/Pr_JL_Bresson.pdf.

Em janeiro de 2007 Louise Brown o verdadeiro ícone contemporâneo da Medicina da Reprodução, foi ela própria mãe (anunciado em primeira mão no Daily Express).

Todos estes saberes que se acumularam e participaram na evolução da Humanidade, foram-se transformando numa das mais bem-sucedidas e inovadoras áreas da Medicina. Embora as novas tecnologias da PMA tenham viabilizado o sonho de muitos pais, contribuíram para novos problemas, onde se destaca o aparecimento de embriões excedentários e as questões decorrentes do uso de gâmetas heterólogos. Há opções terapêuticas muito favorecidas pela pressão que a sociedade exerce sobre os casais sem filhos e já legalmente legitimadas, mas que continuam a suscitar um amplo debate. O utilitarismo que norteia algumas situações de parentalidade a todo o custo, alcançada por um verdadeiro encarniçamento reprodutivo, também gera problemas novos e questões ético jurídicas nunca antes suspeitadas. Para além da preocupação bioética que emerge destas situações, têm chegado ao meio científico estudos que desvendam problemas inexplorados mas que apontam para uma maior vulnerabilidade das crianças artificialmente concebidas (Middelburg K.J., Heineman M.J., et al. – 2008), (Bos A.F., Hadders-Algra M. – 2008), (Hvidtjorn, D., Schieve, et al. – 2009), (Reefhuis J, Honein MA, et al. – 2009).

2.2.3 – Principais causas de infertilidade

A infertilidade dum casal pode ser determinada por múltiplos factores e nem sempre implica disfunção do sistema reprodutor. As causas de infertilidade repartem-se por factores de origem genética, biológica ou causas dependentes das condições de vida. Na maior parte dos países, a infertilidade conjugal tem por base 30% a 40% de factores masculinos e uma percentagem idêntica de causas femininas, com uma incidência que aumenta com o avançar da idade. A investigação das causas deve sempre abranger os dois elementos do casal porque em um terço dos casos de infertilidade as razões são partilhadas e em 10% não se consegue estabelecer a razão (Whitman-Elia, G.F., Baxley, E.G. - 2001), (NSH, Fertility – 2004).

A ausência de descendência aumentou em muitos países, devido a causas bem identificadas como o adiamento voluntário da parentalidade, os hábitos de vida pouco

saudáveis, a obesidade, o consumo de álcool ou drogas, o aumento das infecções de transmissão sexual e a poluição entre as mais citadas (DGS – 2008. Pág.5).

Quando a origem da infertilidade é atribuível ao elemento feminino, as causas ginecológicas mais frequentes, distribuem-se da seguinte forma: endometriose²⁷ 5% dos casos, patologia das trompas 15% e alterações da ovulação nos restantes 15% ou mesmo mais casos.

Há condições de trabalho e circunstâncias de vida dos progenitores, que afetam de forma comprovada a sua capacidade reprodutiva (DGS – 2008. Pg.12) e exercem efeitos nocivos sobre a descendência.

Têm sido encontrados pesticidas e outros produtos tóxicos, quer no sémen quer na gordura humana, com impacto na fertilidade. Muitos estudos diretos estão no entanto dificultados no elemento feminino, porque os ovócitos são escassos e a simples colheita chega para alterar o seu estado metabólico. Grande parte da investigação, sobre efeitos biológicos mediados por factores ambientais, é feita em células somáticas em que ocorrem mitoses e não nos gâmetas em que ocorre meiose. A questão sobre se as alterações mediadas pelo meio ambiente são transmitidas de forma estável (e mantidas ao longo das divisões celulares) ou se são repostas a seguir à mitose, mediante uma fonte informativa ainda desconhecida, permanece um assunto de intenso debate, a que voltaremos a aludir neste texto.

Paracelso, médico alemão do século XVI e emérito fundador da Toxicologia, dizia que «a dose faz o veneno» e, bastam pequenas doses para que alguns efeitos nocivos se façam sentir. Muitos tóxicos ambientais tais como as substâncias halogenadas, os metais pesados do tipo do bromo, fluor, iodo e cloro entre outros, são capazes de alterar o funcionamento do eixo hipotálamo-hipofisário e afetar a homeostasia hormonal de que depende a saúde dos organismos vivos. Estas substâncias que funcionam como «alteradores endócrinos e neuro endócrinos» existem no nosso ambiente, não são biodegradáveis e quando se acumulam, são capazes de modificar não só a morfologia mas também as funções celulares dos organismos expostos.

Os efeitos das substâncias tóxicas são com frequência dose-dependentes, o que leva a que maiores exposições conduzam a maiores danos e possam, inclusivamente,

²⁷ Endometriose é uma condição em que tecido histologicamente idêntico ao do endométrio ou seja, a mucosa que reveste a cavidade uterina, surge de forma ectópica em outras regiões do corpo fora da parede interna do útero.

repercutir-se nas gerações futuras. Reza a história, que Amadeus Mozart sucumbiu aos 33 anos, em consequência duma intoxicação por mercúrio administrado para tratamento da sífilis, de que o génio musical padecia. A explicação é tanto mais verosímil se tivermos presente uma patologia existente numa região asiática em que o peixe consumido tem elevado teor de mercúrio. O mercúrio ingerido transforma-se em metilmercúrio pela ação bacteriana e, como é lipossolúvel e bastante neurotóxico, pode lesar vários órgãos ou atingir o cérebro fetal por via placentar, causando a «doença de Minamata» congénita. Em alturas de maior poluição, aumentam os casos de paralisia cerebral com lesões difusas características, sendo os fetos mais afetados do que as próprias mães (Tsuguyoshi Suzuki, et al. – 1992).

De entre as causas de redução da fertilidade, há algumas melhor investigadas: o álcool, muitos medicamentos e a generalidade das drogas ilícitas incluindo as ditas «leves», afetam direta ou indiretamente a capacidade procriativa. Também existe uma comprovada associação entre o tabagismo e a quantidade e qualidade dos gametas.

Tanto no homem como na mulher, quer a obesidade quer a carência nutricional, com índices de massa corporal (IMC)²⁸ que ultrapassem por excesso ou por defeito os valores limite de 19 e 29, estão relacionados com uma redução da fertilidade.

De entre as profissões que mais expõem a factores físicos e vivenciais desfavoráveis, contam-se, no homem, todas as profissões que submetam a região do escroto a temperaturas elevadas, (por exemplo a proximidade de fornos industriais e a condução prolongada de veículos motorizados). Para o homem e a mulher revelam ser nocivos os agentes anti neoplásicos, as infeções nosocomiais e as radiações ionizantes. A exposição profissional a pesticidas, tintas, solventes, cádmio, mercúrio e chumbo, entre os principais minerais pesados, são outras situações muito adversas à saúde reprodutiva. Profissões que envolvam maior tensão psicológica ou esforço físico ou trabalho noturno por turnos, também limitam da fecundidade.

²⁸ O IMC mede a corpulência e determina-se dividindo o peso, em quilogramas, pela altura em metros elevada ao quadrado [peso / (altura x altura)]. Em <http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i008253.pdf>

Os casais ou indivíduos inférteis tendem a ter antecedentes clínicos de maior gravidade, muitos deles com repercussão na descendência, o que constitui uma acrescida desvantagem.

A fertilidade diminui ao longo da vida em ambos os sexos mesmo perante o notável aumento da longevidade e no sexo feminino há uma interrupção mais abrupta, pelo simples facto dos ovócitos se esgotarem. Esta inexorável redução é pouco afetada pelas condições de vida e, por isso, a idade materna adquire grande importância em termos demográficos e de segurança reprodutiva.

De acordo com dados populacionais duma recente *Cochrane Review* elaborada pelo *Cochrane Menstrual Disorders and Subfertility Group*, a infertilidade conjugal atinge no ocidente 1 em cada 7 casais, ou seja, 10 a 15% da população em idade fértil, razão pela qual o recurso à PMA tem vindo a aumentar, adquirindo uma relevância social que gostaríamos de sublinhar no enquadramento desta investigação.

2.2.4 – Aspectos genéticos e ambientais da infertilidade

Embora não exista um aumento quantificado, constata-se que a infertilidade tem vindo a aumentar em muitas regiões mundiais. Entre os factores apontados como principais responsáveis, conta-se o fácil controle da natalidade e o aumento da idade dos progenitores quando nasce o primeiro filho (Bredkjaer, H.E., Grudzinskas, J.G. – 2001).

No sexo feminino a capacidade reprodutiva declina 5 a 10 anos antes do fim dos ciclos ovulatórios e cessa com a menopausa. No mundo dito ocidental existe uma estreita janela de oportunidade para a procriação, agravada pelo facto das mulheres que necessitam recorrer aos tratamentos de infertilidade terem em média mais 5 anos do que as que concebem espontaneamente (Skora, D., Frankfurter, D. – 2012).

Em alguns países europeus nomeadamente em Portugal, a idade média das mães quando nasce o primogénito, aumentou de forma tão dramática que já se situa acima dos trinta anos²⁹. Esta nova realidade social tem ajudado a transformar a PMA num recurso crescente para todos aqueles que desejam procriar mas têm dificuldade em conceber um

²⁹ Em 2013 a idade nacional média das mães á data do nascimento do primeiro filho foi de 29,7 anos segundo os dados do INE

filho biológico. Até ao momento (2015) já terão nascido mais de 4 milhões de crianças com recurso à FIV e atualmente 1% dos americanos e 2,4% dos franceses nascem por este meio (Jammes, H., Fauque, P., Jouannet, P. – 2010). São números demasiado elevados para serem ignorados e exigem vigilância, não apenas médica mas de toda a sociedade.

Para além do adiamento da parentalidade, existem causas primárias em que os factores genéticos contribuem para uma percentagem significativa de situações. A infertilidade tende a ser uma área pouco acessível à Genética porque as causas hereditárias, em última instância impedem a transmissão da molécula de ADN de uma geração para outra e, tal facto, impõe limites à investigação (Lopes, A.M., Aston, K.I., et al. - 2013). Na figura 3 está representada a distribuição mundial da infertilidade indexada ao elemento feminino aos 20 e aos 44 anos, identificando-se curiosas assimetrias cujas causas são multifactoriais (Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., et al. – 2012).

A Genética atual baseia-se em duas grandes áreas que são a Citogenética, uma ciência que é mais utilizada na clínica e consiste no estudo dos cromossomas e a Genética Molecular que estuda o ADN e é mais utilizada em investigação laboratorial. Muito do que se sabe sobre a «Genética da infertilidade», resulta de factos observados em experiências animais, uma vez que existem limites éticos muito restritivos para a investigação em humanos.

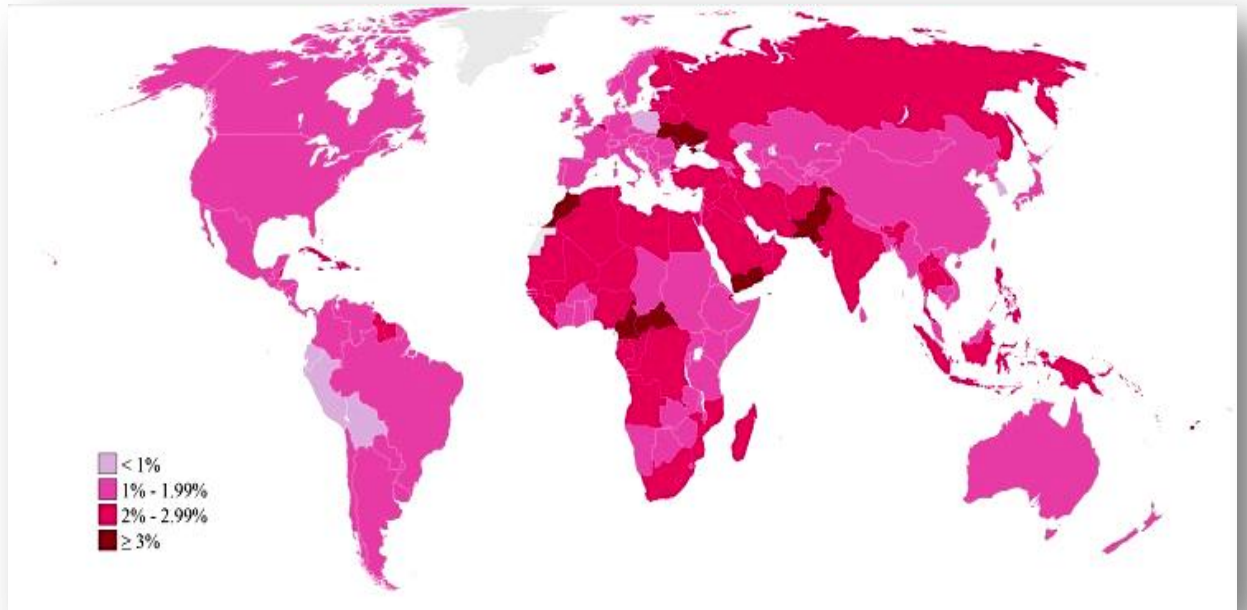


Fig. 3 - "Prevalence of primary infertility among women who seek a child, in 2010"³⁰.

³⁰ <http://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.1001356>

A passagem da informação genética humana pode ser veiculada pelos autossomas³¹ ou pelos cromossomas sexuais, X ou Y. Esta transmissão hereditária obedece a duas vias principais, mas não exclusivas, que são o tipo dominante e o tipo recessivo. Porém, além desta transmissão Mendeliana³² dita clássica, coexistem outras vias recentemente descobertas de transmissão de informação tais como a hereditariedade mitocondrial, as mutações instáveis, o *imprinting* e as alterações epigenéticas (palavra composta com dois vocábulos de origem grega que no conjunto significam “sobre a genética”), temas estes que desenvolveremos ao longo do texto.

Muitas das situações de infertilidade, têm a sua origem em mutações definitivas mas casuais do código genético, as quais afetam pontualmente o ADN. Todos somos portadores de genes mutados, mas maioritariamente recessivos, em que o efeito nocivo é compensado pela ação do gene normal vindo do outro progenitor. A ação dum gene recessivo só se manifesta quando existe em duplicado, exceto em circunstâncias muito particulares.

Como existem milhares de genes diferentes torna-se muito reduzida a probabilidade de dois indivíduos, não consanguíneos, possuírem as mesmas alterações no seu genoma. Também só esporadicamente é que duas pessoas com as mesmas mutações irão procriar juntas. Se numa população existir por exemplo, uma mutação que afete uma em cada mil pessoas, independentemente do sexo, a probabilidade casual de duas pessoas afetadas se encontrarem e procriarem, é teoricamente igual ou inferior a 1/1000 multiplicado por 1/1000, ou seja, um caso por cada milhão. Como cada um dos membros desse hipotético casal tem 1 gene normal e 1 gene mutado e transmitirá aleatoriamente aos filhos um desses genes, em média só uma vez em cada 4 esse casal heterozigótico irá transmitir 2 vezes o gene mutado. É necessária a simultaneidade de transmissão dos 2 genes mutados para que os descendentes expressem a mutação recessiva. Assim sendo e de acordo com a genética Mendeliana, quando uma pessoa em

³¹ *Autossoma* - cada um dos cromossomas que formam o património genético, à exceção dos cromossomas sexuais (do grego *autós*, «próprio» + *sóma*, «corpo»). Em Infopédia -2014.

³² Gregor Mendel (1822-1884) – Monge agustiniano, professor de ciências naturais e o criador da genética moderna para a qual contribuiu com a célebre descoberta das leis de transmissão das características dos indivíduos à sua descendência.

cada mil é portadora duma mutação recessiva, apenas 1 pessoa em cada 4 milhões irá exprimir ou será afetada pela doença correspondente à mutação. Da mesma forma, em termos estatísticos, é preciso que uma pessoa em cada 50 transporte uma determinada mutação para que uma doença ou característica, herdada ao mesmo tempo de ambos os pais, afete uma criança em cada 10 mil.

Cada ser humano tem em média três genes com mutações perigosas e esta realidade constitui o chamado «fardo genético» da humanidade. As consequências dependem do número de genes envolvidos e por regra todas as mutações são desfavoráveis. Os defensores de práticas eugénicas acreditavam, poder melhorar a genética das populações impedindo a reprodução das pessoas portadoras de deficiências, o que carece de fundamento. Como a maior parte das doenças são recessivas, os genes doentes são transportados por pessoas normais (no exemplo referido há 1 pessoa afetada em cada 50, e os indivíduos com dois genes doentes são apenas 1 em 10 mil), se se impedir a reprodução dos indivíduos afetados, exclui-se em cada geração apenas uma fração mínima, o que pouco altera a frequência média da mutação na população.

A humanidade atingiu ao longo da sua evolução, um ponto de equilíbrio em que há equivalência entre as mutações que vão surgindo «de novo» e as que desaparecem. Há uma estabilidade de genes mutados e, esta seleção natural tem conseguido que o tal «fardo genético» não aumente de geração para geração. Com a globalização e a mobilidade dos povos, as doenças recessivas serão cada vez mais raras, mas poderão tornar-se frequentes em zonas isoladas ou em sociedades estratificadas, que promovam o casamento entre membros da mesma casta.

Um risco que poderá surgir é o que decorre do recurso crescente à PMA com potencial para interferir nos sistemas primordiais de seleção natural. Damos como exemplo, um estudo sobre infertilidade masculina em que participaram mais de 300 homens com azoospermia³³ provenientes de vários centros nacionais e onde se verificou

³³ Azoospermia – ausência de espermatozóides no líquido seminal (Do grego *a-*, «sem» + *zōon*, «animal» + *spérma*, «esperma» + *-ia*). Em Infopédia: Porto Editora, 2003-2014. Disponível em: <http://www.infopedia.pt/lingua-portuguesa/azoospermia>.

que tinham mais alterações genéticas do que os indivíduos com espermatogénese normal (Lopes, A. M., Aston, K.I., et al. - 2013). A coordenadora do estudo realizado pelo Grupo de Genética Populacional do Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP) em parceria com a *Washington University School of Medicine*, explicou que as duplicações e deleções genéticas desses homens, foram encontradas em vários cromossomas (não só nos cromossomas sexuais) e em genes importantes para a formação dos gâmetas. Alexandra Lopes relacionou a azoospermia dos portadores de tais mutações, com uma resposta encontrada pela natureza para evitar a disseminação desses erros genéticos.

A hereditariedade ligada ao ADN tem uma transmissão razoavelmente bem conhecida mas existem outras formas de passagem da informação que dependem dos chamados factores epigenéticos e estão relacionadas com o ambiente. Repare-se que todas as células dum mesmo organismo partilham o mesmo ADN, mas funcionam de formas distintas. Há modificações no meio celular, que podem afetar a expressão, sem todavia alterarem a sequência dos nucleótidos. Foi Conrad Waddington quem primeiro nomeou este fenómeno, criando o termo “*epigenotype*” em 1942 para se referir ao conjunto de factores extrínsecos ao ADN que são capazes de influenciar a expressão genética e o fenótipo (Slack, J.M. – 2002).

Torna-se necessário um mecanismo que possibilite a diferenciação celular entre os vários tecidos já que *a priori* todas as células têm o mesmo ADN. Esse processo de reprogramação celular depende assim dos factores epigenéticos que, em conjunto, formam o epigenoma. Os **factores epigenéticos** são uma espécie de genes adicionais que regulam a expressão dos genes propriamente ditos. De forma criativa diversos autores têm comparado o genoma (ADN ou código genético) a um livro cujo texto é sempre o mesmo mas que permite diversas leituras ou, numa versão mais digital, o genoma seria o *hardware* dum computador e o epigenoma o seu *software* (Thomas Jenuwein e Jörn Walter)³⁴.

³⁴ Prof. Jörn Walter é o coordenador do projecto alemão para estudo do genoma humano (DEEP - Deutsches Epigenom Programm) que ainda decorre (2012-2017) sendo um estudo multicêntrico e multidisciplinar de grande envergadura. O Prof. Thomas Jenuwein é o director do Instituto Max Planck de Imunobiologia e epigenética. Em www.deutsches-epigenom-programm.de

Ao contrário do ADN as características epigenéticas são sensíveis ao ambiente e mutáveis com o meio celular. Este mecanismo de interação permite a «**plasticidade do genoma humano**» e por isso, dois indivíduos com a mesma base genética, podem adquirir fenótipos diferentes. É desta forma que mesmo os gémeos monocoriónicos e ditos verdadeiros, nunca são totalmente iguais.

Uma vez que tudo o que nos rodeia é suscetível de interferir na química das nossas células, não podemos negligenciar os inevitáveis efeitos das tecnologias da PMA sobre e o epigenoma dos gâmetas ou do embrião humano. Os mecanismos subjacentes à plasticidade celular, ainda são pouco conhecidos mas os processos bioquímicos pelos quais os fenómenos de modificação ocorrem, são essencialmente três:

(1) **Modificação das histonas** - são proteínas que estão ligadas ao ADN, formando com ele os nucleossomas. Durante muitos anos pensou-se que estas proteínas eram um mero suporte, mas hoje sabe-se que interferem na expressão e regulação dos genes.

(2) **Metilação do ADN** – esta ação funciona associada à modificação das histonas. Se não ocorrer acetilação das histonas, em harmonia com a metilação do ADN, produz-se heterocromatina. Ou seja, ADN em configuração fechada que impede a transcrição.

(3) «**Noncoding**» **ARN (ácido ribonucleico)** ³⁵: descobertas recentes no campo da epigenética e regulação genética, vieram revelar o papel regulador das moléculas de ARN que não codificam nem são traduzidas em proteínas. Atualmente sabe-se que estes fragmentos de ARN são específicos dos vários tipos celulares e também são modificáveis pelos factores ambientais.

Chama-se *imprinting* genómico à modificação epigénica do genoma, que vai permitir que se expressem somente os genes dum único alelo parental (em vez dos dois). Mesmo com sequências iguais do ADN, cada tipo celular pode ter um epigenoma

³⁵ O **ácido ribonucleico** (em português com a sigla **ARN** e em inglês, **RNA**) é um polímero constituído pelos nucleótidos adenina, guanina, citosina e uracilo, responsável pela síntese proteica e sintetizado pelo ADN (o qual forma moléculas maiores e integra timina em vez de uracilo)

diferente originado pelo tipo de metilação ou modificações das histonas a que foi submetido (Shiota, K. et al. – 2009). Repare-se que todas as células de um organismo possuem o mesmo ADN mas especializam-se das formas mais diversas. Se pretendermos estudar a sequência de ADN, podemos socorrer-nos de qualquer tipo de célula mas, se quisermos estudar os fenómenos epigenéticos, temos de ter em conta o grupo celular de onde provêm.

Um exemplo do reino animal que é muito conhecido e facilita o entendimento dos fenómenos de *imprinting*, é aquele que se observa nos equídeos. Tanto o cavalo (*Equus caballus*) como o jumento (*Equus asinus*) têm origem filogenética comum mas que se terá separado há milhões de anos. As diferenças entre jumentos e cavalos não impedem a sua reprodução híbrida mas o que se passa com a descendência é muito curioso: as crias são estéreis e possuem fenótipos muito diferentes conforme a progenitora seja de uma espécie ou de outra. Ou seja, se a mãe for uma égua, a cria terá orelhas longas e designar-se-á mula se for fêmea e burro se for macho. Se a mãe for uma jumenta a cria será um bardoto/a (hinny do inglês) que é um tipo de animal pouco comum, mais pequeno que a mula ou o burro e com orelhas menores³⁶. O processo, que se pensa ser responsável por estas diferenças, é o *imprinting* genómico dependente dos factores epigenéticos e do ambiente portanto diverso do processo mendeliano. As bases moleculares destas formas de transmissão da informação genética são desconhecidas, mas evidências recentes apontam para factores difusíveis nomeadamente o ARN, cujo papel poderá vir a revelar-se ainda mais importante do que a metilação do ADN e da cromatina (Lucia, I., Daxinger, L., Whitelaw, E. - 2012).

Atualmente já se conhecem muitas das consequências da metilação do ADN na espécie humana (von Känel, T., Huber, A.R.- 2013):

- (1) Regulação de genes específicos de forma a controlar o metabolismo celular. As mudanças de curto prazo nos padrões de expressão genética são geralmente causados por factores de transcrição, enquanto a regulação genética de longo prazo é obtida pela interação de múltiplos factores.

³⁶ «Diferença entre jumento, mula, burro, jegue, asno e bardoto». Em <http://guiaanimal.blogspot.pt/2014/09/diferenca-entre-jumento-mula-burro.html>

- (2) *Imprinting* genómico: refere-se, como vimos, a um subgrupo de genes que é regulado por um mecanismo epigenético específico, que permanece estável durante as divisões celulares e que se calcula que perfaça 1% do genoma humano. O imprinting permite a transmissão de um ou mais genes a partir dum único progenitor. Os genomas maternos e paternos têm de ser complementares e esta complementaridade é conseguida através dum mecanismo que constitui um verdadeiro “diálogo”, que tem lugar precocemente, na fase pré zigótica dos pro-núcleos.

Bioquímicamente o *imprinting* consiste numa diferente metilação dos genes, o que impede a etapa da transcrição e só deixa ativo um dos alelos do par. Um exemplo bem estudado e conhecido, do resultado duma metilação génica diferenciada, é o que ocorre com os cromossomas X de origem materna e paterna. Na metilação do ADN ocorre um processo químico em que há adição de um grupo metilo às moléculas de citosina (posição C₅ do anel da pirimidina) ou de adenina (posição N₆ do anel purínico) e, esta alteração reguladora do gene vai permitir a expressão dum único dos alelos do par, seja materno ou paterno.

- (3) Lionização ou inativação do cromossoma X: a metilação do ADN está envolvida na inativação de um dos 2 cromossomas X presentes nos indivíduos do sexo feminino, de forma a assegurar uma quantidade idêntica de genes ligados ao cromossoma X, tanto em homens como em mulheres.
- (4) Defesa do genoma: elementos parasitas do genoma, tais como retrotransposomas, são inativados através da metilação da sua sequência de ADN. Este processo tem um papel chave na manutenção da integridade do genoma.

Tendo presentes os mecanismos enunciados, não nos surpreende que as anomalias do processo de metilação do ADN determinem consequências. Se houver falha da metilação, uma doença recessiva ligada ao cromossoma X pode mesmo assim manifestar-se num elemento feminino se o alelo saudável for inativado.

Para os genes que só exigem uma cópia ativa, o *imprinting* garante a inatividade de um dos alelos, reprimindo-o. A repressão de alguns genes é vantajosa porque, se não

fosse o silenciamento de 1 alelo do par, haveria genes que codificariam proteínas em quantidade excessiva, o que seria prejudicial para as células e levaria ao aparecimento de doenças específicas ou neoplasias (Ménézo, Y., Lichtblau, I., Elder, K. – 2013).

Ao longo da nossa existência, tudo o que consumimos, os hábitos de vida, o clima, a poluição, o repouso ou a fadiga, a saúde e a sua falta, tudo tem influência no nosso corpo e modifica a química das nossas células. Podemos afirmar que o resultado das situações de exposição, a que o ser humano está sujeito ao longo da sua existência, resulta do balanço entre estes dois componentes fundamentais: a Genética e o ambiente (Feil, R., - 2012). É consensual que existe uma hereditariedade ligada ao ambiente que afeta a fertilidade e esta realidade devolve-nos à realidade da PMA, onde existe manipulação de gâmetas fora do seu ambiente natural.

2.2.5 – Principais etapas da reprodução humana

“Toda vida provém de uma vida pré-existente” (Bolzan, A.,- 1998)

Antes de prosseguirmos na exposição do nosso trabalho, gostaríamos de fazer alusão às etapas mais marcantes do início da vida humana, totalmente alheias ao facto da fertilização poder ocorrer ou não no exterior do organismo materno, já que a grande questão é: «quando começa uma nova vida, sempre única e irrepetível».

Quando falamos em embriões, o que está em causa não é o método que presidiu à sua concepção, mas sim a realidade de cada nova vida, considerada sempre como um fim em si mesma (em Serrão, D. – 2003). Por tal razão iremos definir os termos «zigoto e embrião» em permanente consonância com o que foi estabelecido pelo grupo de trabalho que preparou o protocolo para a proteção do embrião e do feto, anexo à Convenção de Oviedo de 4 de abril de 1997³⁷ e que reforçou os seguintes conceitos:

Período pré concepção - a ovogénese (apresentada em esquema na Fig.6) e a **espermatogénese**, que constituem respetivamente a formação dos gâmetas femininos e

³⁷ Convenção para a protecção dos Direitos do Homem e da dignidade do ser humano relativa às aplicações da Biologia e da Medicina - Convenção dos Direitos do Homem e a Biomedicina.

masculinos, podem ser divididos em várias etapas, que no caso feminino são as seguintes:

Fase de multiplicação ou de proliferação: nesta fase as células germinativas sofrem mitoses consecutivas, multiplicam-se e originam ovogônias. Nos fetos humanos do sexo feminino, esta fase proliferativa termina por volta do 3º mês da gestação. Ao nascer, uma criança do sexo feminino já possui cerca de 400 000 folículos de Graff nos seus ovários. Embora pareça um número elevado, é muito reduzido comparativamente aos indivíduos do sexo masculino que produzirão espermatogônias, ao longo de quase toda a sua vida, num processo designado por **espermatogénese**.

Fase de crescimento: depois da sua formação, as ovogônias iniciam a 1ª divisão da meiose que irá ser interrompida na prófase 1. Nesse período haverá um acentuado crescimento do citoplasma à custa da acumulação de substâncias nutritivas. O depósito de nutrientes é chamado vitelo, e é necessário para a nutrição e desenvolvimento do embrião. Terminada esta fase de crescimento, as ovogônias dão origem aos ovócitos primários (também chamados ovócitos de primeira ordem ou ovócitos de tipo 1). Nas mulheres, esta fase mantém-se até à puberdade.

Fase de maturação: Dos 400 000 ovócitos de tipo 1, só 350 ou 400 é que se irão transformar em gâmetas maduros, ao ritmo de um a cada ciclo menstrual. A fase de maturação inicia-se com a menarca.

Quando um ovócito de tipo 1 completa a 1ª divisão da meiose, interrompida na prófase 1, dá origem a 2 células. Uma delas dará o 1º glóbulo (ou corpúsculo) polar que está destinado a sucumbir porque não recebe citoplasma e muitas vezes não chega a iniciar a 2ª divisão da meiose. A outra célula, grande e rica em nutrientes, dará um ovócito de tipo 2 (ovócito de segunda ordem ou secundário).

Quando ocorre a 2ª divisão da meiose, forma-se um 2º corpúsculo polar, que também sucumbirá em pouco tempo, e um óvulo que constitui o gâmeto feminino que é uma célula grande e cheia de vitelo (fig. 6).

Em condições naturais existe uma perfeita coordenação endócrina entre o ovário, o hipotálamo e a hipófise que permite o desenvolvimento do ovócito e a preparação do endométrio.

Ovogênese

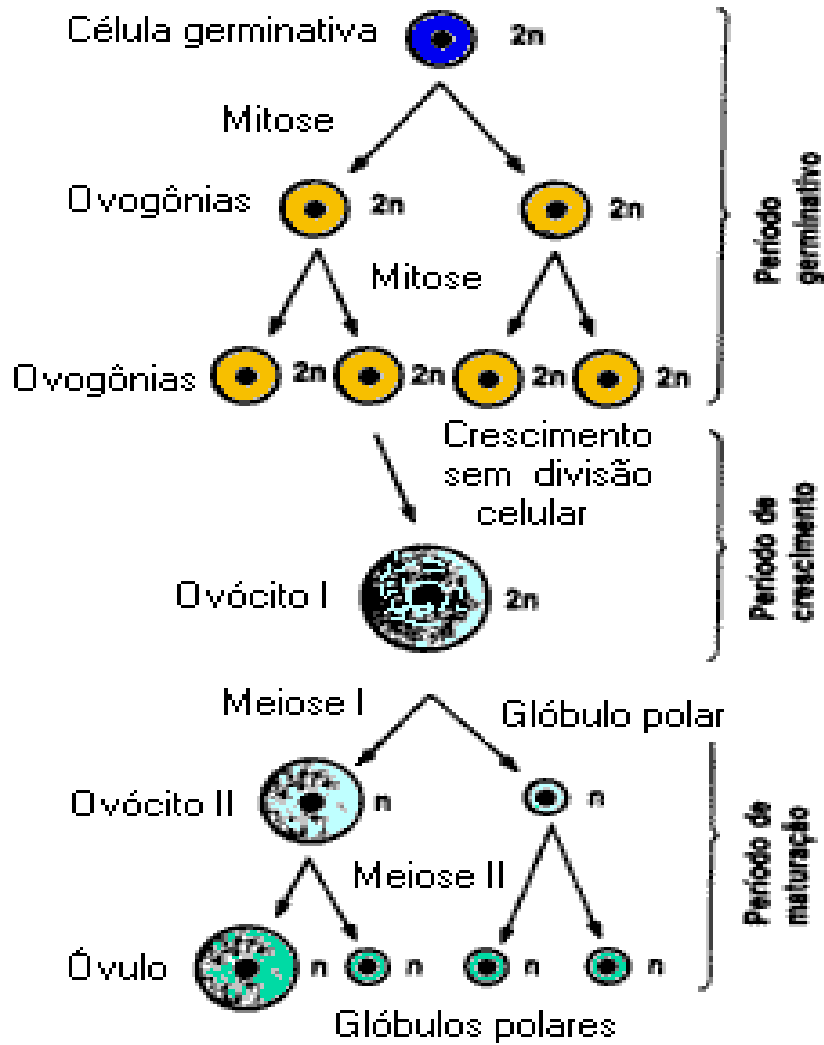


Fig.4 – Representação esquemática da ovogênese³⁸.

³⁸ Em <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Citologia2/nucleo16.php>

Embriogénese - A embriogénese, seja ela natural ou secundária a uma FIV, pode ser descrita numa forma sequencial, recorrendo às principais etapas que vão desde a fertilização até ao início da vida fetal. De acordo com a descrição do biólogo Alejandro Bolzan (Bolzan, A. - 1998, p. 28-29) por nós adaptada, podem enunciar-se as seguintes etapas:

1º) **Fertilização**: A gametogénese humana dá origem a dois tipos de células haploides com 23 cromossomas cada, chamadas gâmetas e designadas espermatozoides e ovócitos conforme provêm do organismo masculino ou feminino. O primeiro contacto do espermatozóide com a superfície do ovócito ocorre nas trompas de Falópio da mulher e esta etapa, chamada fertilização, finaliza com a união dos dois pró-núcleos, juntando os cromossomos de ambos os gâmetas sob uma mesma envoltura nuclear. É aqui que se inicia uma nova vida humana. A fusão dos pró-núcleos ocorre aproximadamente vinte horas após o início da fecundação e restabelece uma célula diploide com 46 cromossomas, típica da nossa espécie.

2º) **Estadio de pré-zigoto**: Este é um conceito muito recente. Corresponde a um momento em que, embora o espermatozóide já tenha penetrado no óvulo, o material genético de ambos ainda não se misturou, de acordo com os conhecimentos actuais [...]

3º) **Estadio de zigoto**: corresponde ao óvulo já fertilizado. Ou seja, já existe uma célula diplóide com 46 cromossomas. O zigoto é a célula primordial que surge na última fase de fecundação, após a fusão dos pró núcleos. Quando já estão unidos os dois conjuntos de cromossomas, segue-se a sua condensação e organização num código genético único que, através de divisões sucessivas, irá formar o novo indivíduo.

4º) **Estadio de pré-embrião**: No processo de diferenciação poderá considerar-se uma fase pré-embriónica que vai desde a primeira clivagem ou divisão celular (formando 2 células) até ao 14º dia após a fecundação (momento em que aparece o primeiro esboço do sistema nervoso = linha primitiva). [...]. A clivagem da primeira célula, diploide e pluripotencial a que chamamos zigoto, ao se dividir em duas, origina 2 blastómeros. Ao fim de três dias de sucessivas divisões surge um agregado composto por doze ou mais blastómeros, ainda envolvidos pela membrana pelúcida do ovócito e que se designa por mórula. Por volta do 5º dia a mórula, já na cavidade uterina, dá origem ao blastocisto.

5º) **Estadio de embrião**: refere-se ao novo ser em desenvolvimento, a partir do 14º dia de vida – momento em que, segundo muitos cientistas, se atingiria a individualização biológica do ser humano [...] e que vai até ao 2º mês de desenvolvimento. Segundo a mencionada convenção de Oviedo, o termo **Embrião** aplica-se ao zigoto e às fases sucessivas do seu desenvolvimento.

6º) **Feto**: Findo o processo de implantação, e após o 2º mês de desenvolvimento, o embrião passa a ser designado por feto, o qual vai prosseguir um amadurecimento funcional dos órgãos, até ao nascimento.

O termo **concepto** (do latim *conceptus*) também é bastante usado, sobretudo em textos de cariz jurídico-legislativo e significa “o ser que se inicia no momento da concepção e que continua maturando com o mesmo carácter ontológico” (Oselka R. - 2005). Ao optar pelo termo concepto, atribui-se carácter humano ao ser resultante da fecundação do óvulo.

O termo **nascituro** (do latim *nasciturus*) refere-se ao ser cujo nascimento é previsível ou seja, o ser destinado a nascer (Oselka, G.W. - 2005).

2.3 – CONTRIBUTOS DA PMA PARA A REPRODUÇÃO HUMANA

2.3.1 – Introdução

Sempre que um segmento das ciências médicas tem uma fase de maior progresso, tal como ocorreu na sequenciação do genoma humano ou na utilização alargada das células estaminais, surge uma evolução em cadeia das tecnologias que lhe estão associadas. A Medicina da Reprodução sendo paradigmática deste fenómeno, «interpenetra e recebe influências de diversas áreas» (Griffith, L.G., Grodzinsky, A.J.- 2001) levando a que as soluções criadas pela PMA, se tenham transformado num verdadeiro fenómeno dos «*media*» que suscita um compreensível interesse e impulsiona o conhecimento científico.

A viabilização do nascimento dum recém-nascido saudável através da PMA, impõe sofisticados recursos médicos. A manipulação de gâmetas e embriões fora do organismo, bem como as terapêuticas que estimulam a ovulação ou permitem obter e preservar esperma e ovócitos para posterior fertilização, requerem um vasto conjunto de técnicas. Sendo o principal objetivo deste estudo investigar os efeitos das tecnologias da PMA sobre o neurodesenvolvimento infantil, sentimos que se impunha uma referência ao atual «estado da arte» e à sua repercussão sobre o sistema reprodutor e efeitos conhecidos sobre o embrião humano. Neste pressuposto, recorremos ao contributo duma abrangente revisão, oriunda dos Estados Unidos da América e publicada em livro (Myers, E.R., McCrory, D.C., et al. - 2008) com texto integral disponível «on-line»³⁹. Esta revisão de revisões, baseada numa «Cochrane Collaboration» visou escrutinar as técnicas da PMA (ART na sigla em língua inglesa) bem como a segurança das intervenções de indução da ovulação. A equipa de investigadores também fez um extenso levantamento das publicações em inglês surgidas na Medline® entre Janeiro de 2000 e Janeiro de 2008 a que associou revisões publicadas pelo Cochrane Menstrual Disorders and Subfertility Review Group e baseou-se em 3 aspectos essenciais:

- Avaliar os resultados gerais da PMA
- Avaliar os resultados particulares de cada uma das técnicas e
- Avaliar resultados tardios, relativos não só à mãe mas também ao feto e à criança.

Os autores desta obra cujo contributo para o nosso trabalho salientámos, referem um sentimento que é comum a numerosos investigadores, e que consiste na dificuldade em seleccionar tanta informação disponível. Foram suas (Myers, E.R., McCrory, D.C., et al. – 2008), mas poderiam ter sido nossas, passe a imodéstia, as seguintes palavras:

«.... Given the large volume of the literature, the methodological complexities involved in interpreting the literature (in particular, the results of non-randomized studies of outcomes in subgroups and diagnostic tests), and the

³⁹ Effectiveness of Assisted Reproductive Technology em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK38540/>

recent publication of several large relevant trials, the timeline for producing this draft report was extended (...). »

Apesar da equipa americana ter conseguido identificar 5294 publicações relevantes no âmbito da PMA e rever 1210 artigos completos e 478 *abstracts*, reportou um número reduzido de ensaios aleatórios (randomizados) em que a maioria fornecia dados insuficientes sobre as taxas de gravidez, ou não fazia referência à evolução das gestações, ou à percentagem de nascimentos.

Juntando aquela importante revisão à análise que fizemos de documentos mais recentes, sobre as técnicas utilizadas e variantes associadas e reconhecidas pela *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE - no seu último relatório de junho de 2009), sentimo-nos próximos da saturação teórica em alguns temas, ao mesmo tempo que nos deparámos com lacunas de informação em outras áreas. Não incluindo no nosso trabalho a descrição do longo percurso diagnóstico, e a difícil tomada de decisão inerente aos tratamentos de infertilidade, podemos no entanto dizer que os procedimentos a que os casais inférteis se submetem, se baseiam essencialmente nas etapas da PMA, a que aludiremos no texto e que a seguir resumizamos:

1. Métodos de preparação de gâmetas e tecidos germinativos
2. Maturação *in vitro* de ovócitos
3. FIV com e sem micromanipulação
4. Criopreservação de gâmetas e de tecidos germinativos
5. Criopreservação de zigotos e de embriões.
6. Transferência embrionária para a cavidade uterina

Sempre que abordamos os custos inerentes aos tratamentos de infertilidade, sobressai o contraste entre os exorbitantes recursos que são necessários para ultrapassar as dificuldades reprodutivas e a notável eficácia e sincronismo da natureza. Para além dos custos materiais e humanos teme-se que esta interferência nos mecanismos naturais,

possa ter consequências nas crianças assim concebidas, bem como nos seus progenitores e no ecossistema em que vivemos, razões estas mais do que suficientes para as legítimas preocupações que estiveram na génese do nosso trabalho!

2.3.2 – Terminologia e principais procedimentos da PMA

No âmbito da PMA todo o trabalho silencioso e altamente eficaz que deveria ser realizado pela natureza, passa a ser mimetizado, ou suportado, pela panóplia de recursos já disponíveis. A intervenção terapêutica, sobretudo na vertente feminina, pode ocorrer muito antes da indispensável junção dos gametas. Segundo a *Human Fertilisation and Embryology Authority (HFEA)*⁴⁰ o que marca o início dum tratamento de FIV com transferência a fresco, é o momento em que são administradas drogas para estimulação ovárica à futura mãe. Se não forem utilizadas drogas, o início é marcado pela primeira tentativa de punção para recolha de ovócitos.

O que define a PMA é a manipulação de gametas fora do organismo e, este conjunto de procedimentos engloba numerosas tecnologias satélite, que interferem a vários níveis do ciclo reprodutor humano. Sendo assim, cabe-nos referir as principais etapas do processo de reprodução em que pode existir intervenção terapêutica:

Pré conceção - nesta fase e sobretudo no que à futura mãe diz respeito, há toda uma série de abordagens terapêuticas, maioritariamente hormonais, das quais depende o êxito da PMA e que serão discutidas ao longo do texto.

Transferência intratubária de ovócitos (GIFT) (do inglês *Gamete Intrafallopian Transfer* – transferência intratubária de gametas): É uma técnica em que os ovócitos maduros, recolhidos cirurgicamente do organismo feminino, são introduzidos com a ajuda de um cateter na trompa de Falópio, onde deverá ocorrer a fertilização. Por via laparoscópica, introduz-se o sémen e os ovócitos (em número de 1 ou 2, sejam

⁴⁰ A «Human Fertilisation and Embryology Authority» é a entidade independente do Reino Unido que supervisiona o uso de gametas e de embriões no âmbito dos tratamentos de infertilidade e de investigação. A HFEA licencia as clínicas de fertilidade que realizam FIV, outros procedimentos de PMA e ainda a investigação com embriões humanos. In <http://www.hfea.gov.uk/>

homólogos ou não) no local desejado. Os gametas também podem ser depositados na cavidade uterina simulando as condições naturais.

Os ovócitos excedentes poderão ser utilizados numa fecundação *in vitro* e os embriões daí resultantes também poderão ser conservados para utilização posterior. Em 1988, nasceu a primeira criança portuguesa em que houve recurso a esta técnica (SEMER – 2011⁴¹).

FIV e embriogénese inicial - Quando é realizada uma FIV, a sequência do desenvolvimento é, em tudo semelhante ao que acontece em condições naturais, se bem que perturbada pelas interferências iniciais (fig. 7). Nesta técnica tanto a fecundação como o desenvolvimento inicial passam a ocorrer *in vitro*:

Dia 1 – Após a inseminação ou após uma micro injeção de sémen no ovócito [técnica de injeção intracitoplasmática de sémen ou ICSI (abreviatura vinda do inglês *intracytoplasmic sperm injection*, a qual será abordada ao longo do texto)] deve ocorrer a fecundação e o estágio de pro núcleos. Ao fim de 12 a 18 horas os pro núcleos unem-se dando origem a um embrião constituído por 1 célula diploide, o designado zigoto. Desde o início da fecundação e até à fusão dos 2 **pro núcleos**, há uma fase de **pré-zigoto** que dura cerca de vinte horas e que corresponde ao período em que o espermatozoide já penetrou no ovócito, mas o material genético de ambos os gametas ainda não se misturou. O conhecimento desta fase designada de pro núcleos é recente, e tem permitido algumas especulações sobre o preciso momento em que começa a vida de um novo ser.

Aproximadamente 30 horas após a fecundação, o zigoto sofre a primeira clivagem, dando origem a duas células designadas **blastómeros**.

Dia 2 - existem 2 a 4 blastómeros que se irão replicar. Entre a fertilização e o estágio de 4 blastómeros ocorrem aproximadamente 45 horas.

Dia 3 - já há 6 a 12 blastómeros.

⁴¹ SEMER – Sector de estudos de Medicina da Reprodução Humana, actualmente designada de Serviço de Genética Médica e Reprodução Humana dos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC)

Dia 4 - contam-se 64 blastómeros que adquirem o aspeto de uma amora, razão pela qual esta fase se designa por **mórula** (*do latim morus = amora*).

Dia 5 - há 250 células e o embrião designa-se por **blastocisto**.

Dia 6 - surge o blastocisto eclodido.

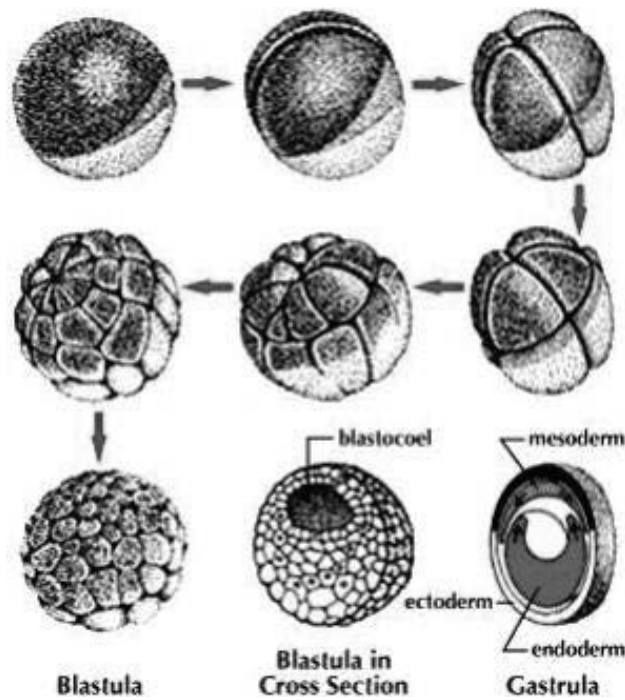


Fig. 5 – Processo de segmentação embrionária⁴²

Maturação in vitro (MIV) – O zigoto é deixado crescer até à fase de embrião de seis a oito células (48 a 72 horas após a fecundação) antes de ser transferido. Os diferentes intervalos de tempo a que é feita a transferência são importantes e fazem variar os índices de sucesso.

Após a fase de incubação que é muito limitada no tempo, segue-se a de transferência para a cavidade uterina, onde o embrião prosseguirá a divisão celular.

Gerar mais embriões e sobretudo conseguir preservá-los para evitar os repetidos e indesejáveis ciclos de estimulação ovárica, é um dos objetivos da PMA. No caso dum tratamento com criopreservação embrionária, a *HFEA* assinala o início do

⁴² <http://www.infoescola.com/wp-content/uploads/2009/08/segmentacao1.jpg>

ciclo com a retirada do embrião criopreservado da cuba de congelamento, para ser incubado e transferido (*HFEA - The Patients' Guide to IVF Clinics Provisional Data 2002*).

Tanto nos processos naturais como após uma FIV com transferência a fresco ou após criopreservação, a implantação do embrião multicelular no endométrio ocorre por volta do 7º dia após a fertilização e, no caso do embrião humano, conclui-se por volta do 14º dia. O processo de reprodução humana que inclui o desenvolvimento da placenta e a diferenciação do novo ser, completa-se em 40 semanas e culmina com o nascimento.

ICSI (do inglês *intracytoplasmic sperm injection*) – a ICSI consiste na micro injeção dum espermatozoide diretamente no ovócito, o que possibilita a fecundação (fig.6). O desenvolvimento desta técnica surgida pela primeira vez em 1993, constituiu uma verdadeira revolução para os casos de subfertilidade masculina e vai sendo cada vez mais utilizada pelos bons resultados que proporciona.

Os espermatozoides que podem ter menor mobilidade, são selecionados pela morfologia e, esta técnica de ICSI clássica, digamos assim, tem evoluído. A ICSI passa a ser designada por IMSI quando se recorre à ajuda da microscopia de alta resolução. A IMSI (que significa então injeção intracitoplasmática de espermatozoides selecionados pela morfologia de alta resolução) requer um microscópio de micro injeção com uma capacidade de resolução muito elevada ou seja, com um poder de ampliação até 16 mil vezes, em detrimento dos aparelhos tradicionais que aumentam até 400 vezes em média. É escolhido um único espermatozoide de preferência o que parece mais apto, o qual é depois colocado dentro do óvulo, ou na zona pelúcida do gâmeta feminino, com a ajuda duma micropipeta.

Em novembro de 2010 nasceram em Portugal duas crianças concebidas pela técnica de IMSI, em que foi utilizado um microscópio invertido para microinjeção de espermatozoides e que preenchia estes critérios.

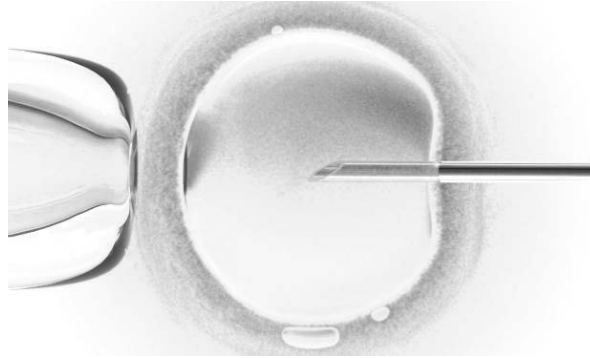


Fig. 6 - Técnica de ICSI (intracytoplasmatic sperm injection) ⁴³

A seguir à ICSI e vencidas as dificuldades atribuíveis ao componente masculino, seguem-se os passos de uma FIV clássica e o embrião é transferido para o útero, entre três a seis dias como habitualmente. Os espermatozoides podem ser recolhidos diretamente do sémen ejaculado ou através da aspiração dos tubos seminíferos ou do epidídimo.

Nos casos em que não existe infertilidade masculina, não existe evidência de qualquer benefício atribuível à ICSI (comparativamente à FIV clássica), mas tem havido um aumento sensível do recurso a esta técnica, mesmo na ausência dum acréscimo equivalente das situações de infertilidade por fator masculino. De acordo com a mesma fonte (ESHRE – 2009), a FIV e a ICSI contribuíram respetivamente para 36,7% e 63,3% dos ciclos de PMA analisados (com grandes variações entre países) e foram utilizados embriões congelados em 24,6% dos casos. A comunidade científica interroga-se sobre se, este excessivo recurso à ICSI não irá contribuir para a disseminação da infertilidade por fator masculino nas gerações vindouras.

Doação de gâmetas: ovócitos (DO) ou espermatozoides (DE) - A PMA estabelece diferenças com o processo natural, e uma das que levanta maiores questões éticas, decorre da circunstância de se poder utilizar gâmetas heterólogos a um casal. Em alguns casos de esterilidade, pode recorrer-se à doação de ovócitos ou de esperma ou mesmo à adoção de embriões e realizar toda a fase inicial da conceção em meio laboratorial. (NICE Clinical Guidelines – 2004)

⁴³ Em <http://fertileweb.com/reproductive-medicine/icsi/>

A doação de ovócitos ou de sémen pode ser uma opção para dadores férteis, ou pacientes de PMA em condições de o fazer. Em contraponto à doação de sémen, que é facilitada pela natureza, a colheita de ovócitos requer quase sempre uma indução hormonal da maturação folicular e da ovulação, seguida de aspiração por meios cirúrgicos. Os ovócitos obtidos após estimulação ovárica são colhidos após amadurecimento e podem ser submetidos a um tratamento que permite a sua conservação. Em 2002, em Portugal, a SEMER além da criopreservação de gâmetas, iniciou a congelação de ovócitos fecundados no estágio de dois pronúcleos.

A decisão sobre o número de ovócitos a inseminar, interfere no êxito dos tratamentos de infertilidade e é motivo de imenso debate porque condiciona o número de embriões suscetíveis de transferência. (Pandian, Z. et al. Cochrane Database Syst Rev. - 2013).

Intervenção farmacológica - São frequentes os casos em que um dos progenitores não tem qualquer problema, mas é submetido aos tratamentos da PMA, para que a FIV possa ser realizada. No cenário meramente teórico, os procedimentos são tecnicamente acessíveis. Em relação ao elemento feminino os protocolos terapêuticos são mais complexos mas em relação ao elemento masculino os procedimentos são pouco invasivos e raramente passam por abordagens farmacológicas.

Acontece que promover numa estimulação hormonal que provoca a maturação dum elevado número de ovócitos, os quais depois de fertilizados *in vitro* podem dar origem à formação de numerosos embriões, não é um procedimento isento de riscos. Embora a estimulação ovárica aumente a probabilidade de se conseguir o tão desejado filho, também eleva os riscos obstétricos e levanta importantes questões bioéticas relativas à criação e manutenção de **embriões excedentários** que são todos aqueles que tendo sido concebidos, nunca foram implantados (Daniel Serrão – 2003) (Schenker, J.G. – 2011).

2.3.3 - Recursos actuais da PMA

2.3.3.1 – Introdução

Tem havido uma enorme evolução quer das abordagens farmacológicas quer dos processos de manipulação e de preservação de gametas e embriões.

Os índices de sucesso na PMA são muito inferiores aos que decorrem dos processos naturais, embora as causas não se devam apenas às tecnologias utilizadas. De acordo com dados publicados pela «Associação Portuguesa de Fertilidade» (APF)⁴⁴ as taxas médias de maturidade oocitária, de fertilização e de desenvolvimento embrionário pré-implantação dependem mais de factores pessoais e aleatórios (qualidade dos ovócitos e dos espermatozoides) do que das técnicas utilizadas.

Neste trabalho descreveremos algumas das intervenções farmacológicas a que as mulheres com problemas de fertilidade ou desejo de engravidar são submetidas, porque consideramos que tais técnicas da PMA terão que dar origem a inevitáveis alterações epigenéticas no organismo feminino, nos seus gâmetas e conseqüentemente na sua descendência.

2.3.3.2 - Intervenção terapêutica no ciclo reprodutor feminino

A intervenção terapêutica da PMA, para quem deseja ser mãe num contexto reprodutivo desfavorável, impõe numerosos procedimentos e etapas que interagem entre si e tentam reproduzir as condições naturais. Esse percurso impõe duas etapas fundamentais:

1 - Estimulação artificial do ovário para que surjam mais folículos, capazes de fornecerem ovócitos que uma vez fertilizados, possam dar origem a embriões.

2 – Sincronização entre o momento da transferência, as condições do endométrio e os níveis hormonais que mais favoreçam a evolução da gravidez.

O processo é exigente e há condições naturais que não é possível reproduzir mesmo com tecnologia sofisticada. Recuando à fase mais inicial do ciclo reprodutor feminino,

⁴⁴ <http://www.apfertilidade.org/web/tecnicas-de-reproducao/134-fecundacao-in-vitro-fiv>

recordamos que os ovócitos se mantêm num estado haploide e não metilado até à puberdade, altura em que a menarca (1ª menstruação) marca o início dum novo ciclo. Sob o ponto de vista hormonal o ciclo ovárico depende da secreção alternada de quatro hormonas: o estrogénio e a progesterona, secretados principalmente pelos ovários, e as hormonas luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) produzidas pela hipófise.

No início de cada ciclo menstrual, a hipófise liberta pequenas quantidades de FSH e de LH que estimulam o crescimento dos folículos ováricos. O amadurecimento dos folículos condiciona um aumento da produção de estrogénios, que favorece a proliferação do endométrio. O nível máximo da produção estrogénica é atingido a meio do ciclo e atua numa forma conjugada.

Neste processo verificam-se dois fenómenos: uma concentração inicialmente alta de estrogénio que reduz os pulsos de LH e FSH hipofisários mas, logo de seguida, causa um súbito aumento hormonal pré-ovulatório que estimula a rutura do folículo e a libertação do ovócito (ovulação). Os elementos residuais, do folículo rompido na ovulação, dão origem ao corpo lúteo o qual, por sua vez, irá libertar estrogénio e progesterona. Caso tenha havido fertilização a progesterona permanece elevada, de forma a manter a gestação, até que a placenta assuma essa função.

Em mulheres amenorreicas, com disfunção hormonal ligeira, pode constituir tratamento suficiente, a administração da hormona hipotalâmica libertadora de gonadotrofina (GnRh) em pulsos (que induzem a libertação apropriada das hormonas gonadotróficas hipofisárias FSH e LH) ou um tratamento com gonadotrofinas. Existem outras opções terapêuticas que incluem:

- Antagonistas orais dos estrogénios
- Punção ovárica com diatermia⁴⁵
- Gonadotrofinas injetáveis.

⁴⁵ Lesões superficiais do ovário capazes de alterar a produção endócrina e favorecer a ovulação

Descreveremos em traços gerais os protocolos farmacológicos mais usados nas várias etapas do ciclo ovárico (ESHRE, Hum Reprod. - 2009) recordando que após a reativação hormonal do primeiro estágio da meiose, é feita uma punção do ovário em ambiente cirúrgico, e são colhidos os ovócitos para serem fecundados no exterior.

(1) Supressão da secreção endógena de gonadotrofina hipofisária

A fim de se obterem mais folículos amadurecidos, tenta-se atrasar o pico normal de LH, com a chamada «pituitary down-regulation». A supressão hipofisária obtém-se, administrando agonistas da GnRH, 2 ou 3 semanas antes do ciclo previsto para a FIV. Em alternativa, pode recorrer-se aos antagonistas diretos do recetor GnRH, que não exigem tratamento prévio com anticoncetivos orais.

(2) Estimulação ovárica com agentes exógenos

Logo que ocorre a baixa das gonadotrofinas endógenas, administram-se gonadotrofinas exógenas provocando uma hiper estimulação ovárica controlada. Utiliza-se a gonadotrofina coriônica humana (hCG), que tem uma atividade biológica idêntica à da LH e também induz a desejada maturação que deve anteceder a colheita dos ovócitos.

Há várias modalidades para indução da ovulação mas nem todas as mulheres, mesmo hormonalmente normais, respondem à terapêutica estimulante com uma produção aumentada de folículos (definido como três ou mais) sendo comuns respostas mais fracas.

(3) Indução da maturação folicular e ovulação

Num ciclo espontâneo, a ovulação é estimulada pela subida de LH. O aumento da progesterona causa a luteinização indispensável para a preparação do endométrio, a implantação do embrião e a placentação inicial. A situação ideal exige sincronização porque, se a ovulação ocorrer cedo demais, todo o ciclo FIV pode ficar inviabilizado. A estimulação ovárica, controlada, obedece a regras precisas. A maturação dos folículos (idealmente 3 folículos com pelo menos 17 mm) é monitorizada ecograficamente porque, a libertação e a colheita dos ovócitos na altura ideal, tem de ser programada.

(4) Colheita de ovócitos (Punção)

A colheita de ovócitos é feita através de punção folicular, sob analgesia e monitorizada ecograficamente. Os ovócitos mais promissores podem ser logo incubados com os espermatozoides. Ocorrida a fecundação, o embrião é mantido num ambiente de estufa até à transferência ou até à criopreservação.

Os métodos de analgesia utilizados não parecem interferir com as taxas de gravidez alcançadas (Kwan, I. et al., Cochrane Review – 2005).

(5) Métodos de preparação do endométrio para a transferência

Nas transferências de embriões congelados, não é feita estimulação ovárica prévia nem é indispensável a preparação do endométrio. Alguns centros preferem otimizar as condições uterinas na altura da transferência, defendendo a sua vantagem.

(6) Transferência intra tubária de gâmetas (GIFT)

Em cada ciclo liberta-se em regra um único ovócito proveniente do folículo melhor desenvolvido. Segue-se a “captação” desse ovócito pela trompa de Falópio, que é o local habitual da fertilização. No procedimento conhecido por GIFT, o óvulo e o espermatozoide são introduzidos numa das trompas por laparoscopia, aguardando-se que a fecundação ocorra naturalmente.

(7) Terapêuticas facilitadoras, suporte luteínico e novas abordagens

O efeito secundário mais reportado na estimulação hormonal do ovário, é o chamado «síndrome de hiper estimulação ovárica» (OHSS), que é lesivo da saúde materna e favorece gravidezes múltiplas e de alto risco (ESHRE - Hum Reprod. 2009).

A supressão da GnRH e a aspiração das células foliculares durante a colheita de ovócitos podem inibir a luteinização e a produção da progesterona. Nos tratamentos com FIV é aconselhável dar um suporte luteínico porque favorece a evolução da gravidez. Vários centros têm associado outros adjuvantes tais como, drogas vaso ativas (nitroglicerina por exemplo), corticosteroides, aspirina ou mesmo outros anti inflamatórios não esteroides. O anti inflamatório piroxicam, dado na véspera da transferência embrionária, foi o único que revelou aumentar de forma significativa os índices de gravidez, quando comparado com um placebo (Moon, H.S., Park, S.H., et al. - 2004). Algumas mulheres, acima dos 40 anos responderam

positivamente à administração de corticosteroides ou de hormona de crescimento e algumas portadoras de síndrome do ovário poliquístico beneficiaram da adição da metformina (antidiabético oral) (Harper, K. et al., Cochrane Reviews 2003), (Poustie, V.J., et al. – 2007) e (Boomsma, C.M., et al. – 2007).

Uma preocupação mantida é a relação entre a PMA e o risco aumentado de neoplasias, tanto na mulher infértil que se submete aos tratamentos como na sua descendência. Alguns estudos apontam para um risco de carcinoma do ovário até três vezes superior, nas mulheres que fizeram hiper estimulação ovárica, mas os casos são de qualquer maneira muito raros (Potashnik, G. et al. – 1999). Uma meta análise de 2004 concluiu que as mulheres inférteis têm um risco aumentado de cancro do ovário, relativamente às mulheres férteis independentemente dos tratamentos de infertilidade (Kashyap, S. et al – 2004).

Num contexto diverso das questões que enunciámos, estão as atuais possibilidades de criopreservação de tecido ovárico, em doentes jovens com neoplasias e estas técnicas muito promissoras já são realizadas em Portugal desde 2007.

2.2.3.3 – Intervenção terapêutica no ciclo reprodutor masculino

A reprodução natural, na vertente masculina, integra as seguintes etapas:

- Produção de esperma em quantidade adequada e com espermatozoides com mobilidade e vitalidade suficientes que permitam a longa viagem até à trompa de Falópio.
- Uma interação química complexa entre o espermatozoide e o ovócito de forma a permitir a fertilização.

As situações que afetam estas duas etapas, reduzem as possibilidades de fertilização e podem manifestar-se de forma transitória ou definitiva. Uma redução ligeira ou moderada do número de espermatozoides, conhecida por oligospermia, pode permitir uma inseminação intra uterina ou uma FIV mas, a azoospermia [ausência total (ou quase) de espermatozoides] impõe uma ICSI ou constitui uma impossibilidade

procriativa. Passa-se o mesmo com as situações de astenospermia (falta de vitalidade) ou teratospermia (morte dos espermatozoides).

É possível proceder a uma estimulação hormonal masculina, com o objetivo de melhorar a produção espermática mas o seu uso não está generalizado. Os homens com hipogonadismo hipogonadotrófico de instalação pós-pubertária mas sem criptorquidia⁴⁶, quando submetidos a tratamento com gonadotrofinas podem, tal como as mulheres, reagir com aumento da produção de gâmetas, melhorando significativamente a fertilidade (evidência de nível 3)⁴⁷.

A intervenção da PMA no organismo masculino é muito menor do que no feminino e habitualmente faz-se sentir apenas a dois níveis (NICE Clinical Guidelines, No. 11):

- a) **Colheita de esperma** – pode ser feita de forma direta, ou através de procedimentos cirúrgicos de que é exemplo a punção do epidídimo, realizada em homens vasectomizados, ou em situações em que só se encontram espermatozoides inviáveis no sémen.

Em casos de ejaculação perturbada ou retrógrada e patologia neurológica por exemplo, pode recorrer-se a métodos de vibração ou electroestimulação para conseguir a emissão duma amostra de sémen, que pode ser recolhida da urina. Não existem estudos aleatorizados, relacionando os efeitos destes procedimentos com o êxito da PMA ou com a evolução do embrião.

- b) **Preparação do esperma para a fertilização** - A ICSI é o método de eleição na abordagem da infertilidade masculina mas não está preconizada na ausência de patologia. Tem sido relatado um recurso excessivo a esta técnica embora não esteja provado que os resultados sejam superiores aos dos métodos mais clássicos da FIV (Verhulst, S.M., et al. Cochrane Reviews – 2006), (Van Rumste, M.E, et al. Cochrane Reviews – 2003).

⁴⁶ Criptorquidia ou Criptorquia (de Cripto que significa caverna e orquis que significa testículo) designa a condição em que o testículo não desceu completamente desde a cavidade abdominal até ao escroto. O testículo ectópico também permanece na cavidade abdominal mas em posição anómala fora do trajecto habitual.

⁴⁷ Evidência de nível 3 de acordo com o Oxford Centre for Evidence-based Medicine Levels of Evidence (Maio 2001). Ver também pág 31.

Na anorquia (ausência de testículos) ou perante a falta total de células germinais, a única hipótese para uma gravidez, reside na doação heteróloga de sémen. O último relatório da ESHRE inova os anteriores porque inclui dados sobre a origem autóloga ou heteróloga do sémen utilizado na fertilização. É uma questão sensível e nem todos os países fornecem este tipo de informação, mesmo que os dados se tenham tornado públicos e estejam anonimizados em relação ao casal progenitor.

2.2.3.4 - Fertilização assistida e crescimento embrionário.

Na FIV ou inseminação artificial a junção de ovócitos e espermatozoides é feita em meio laboratorial. Numa placa de cultura, colocam-se os gametas (fração *swim-up*) numa concentração aproximada de 50.000 espermatozoides por folículo ou por ml e espera-se que a junção das células ocorra espontaneamente. Esta união pode ser facilitada pelas técnicas de ICSI e IMSI.

No seu início, o embrião humano possui uma grande plasticidade e desenvolve-se numa variedade de meios de cultura embora os requisitos nutricionais da fase pré implantatória difiram dos da fase de blastocisto. A descoberta deste facto levou ao desenvolvimento de meios sequenciais de crescimento, mantendo rigorosas características físicas e microbiológicas (Gardner, D.K, Lane, M., 2012). No passado chegou a usar-se soro humano da futura mãe, ou mesmo sangue de cordão umbilical, mas tais práticas foram descontinuadas. Atualmente todos os meios são enriquecidos em glucose, aminoácidos, macromoléculas (maioritariamente albumina recombinada), EDTA e cálcio. Apesar deste enriquecimento nutricional elaborado por equipas multidisciplinares, nunca até hoje se conseguiu garantir, o desenvolvimento extrauterino dum embrião para além de seis ou sete dias.

Há meios de cultura que proporcionam maior estabilidade (Ben-Yosef, D., Amit, A., et al. – 2004), (Quinn P, Cooke S., - 2004) e alguns estudos animais já demonstraram que as várias composições comerciais (*Vitrolife*, *Cook® medical* e *FIV online medium* entre outros) têm diferentes repercussões, a longo prazo, nomeadamente sobre o peso ao nascer.

Há poucos estudos que relacionem os meios de cultura com a evolução embrionária mas os efeitos desta interação precoce justificam estudos mais aprofundados, devido à sua importância atual (Ménézo, Y. – 2013). Recentemente a equipa de Carlijn G. Vergouw (Vergouw, G.C., et al. – 2012) veio reafirmar o facto de existirem poucos estudos comparativos, e sublinhou as preocupações existentes acerca dos efeitos colaterais dos meios de cultura sobre aspectos mais subtis do desenvolvimento futuro das crianças assim concebidas.

2.2.3.5 - Composição dos meios de cultura

Nunca foi possível recriar uma evolução dinâmica dos meios de cultura, semelhante ao que a natureza faz *in vivo*. A melhor alternativa são os meios sequenciais e esta área do conhecimento está em permanente evolução. Após a escolha do meio entre várias opções, é necessário otimizar as fórmulas, trabalho esse que é feito por equipas multidisciplinares. Todos os aspectos bioquímicos e biofísicos são importantes e, tanto a temperatura como o Ph dentro das câmaras de incubação, exigem limites muito estreitos.

Ph e gases - O Ph endógeno do organismo humano é regulado por um tampão de bicarbonato, equilibrado *in vivo* através da anidrase carbónica e da concentração de CO₂ circulante. O Ph *in vitro* é mantido pela atmosfera de CO₂ associada à concentração de bicarbonato do meio de cultura.

A percentagem de gases utilizados e dissolvidos nas soluções artificiais, difere de espécie para espécie e por isso, a sua otimização não é favorecida pela experimentação animal. Sabe-se, por exemplo, que uma baixa de 5% na concentração de oxigénio, produz blastocistos com mais células do que os que seriam produzidos em meios com concentração de oxigénio próxima dos 20% (Gardner, D.K. - 2012, pág. 209) ou que a adição de ácido hialurónico ao meio de cultura, versus o uso de meios padrão, mostra alcançar, em alguns estudos, melhores índices de gravidez (Friedler, S. – 2007).

A concentração de O₂ *in vivo* difere da que é usada *in vitro*: os fluidos das trompas contêm 7 % de O₂, enquanto os embriões são cultivados em meios artificiais

com até 18% de O₂ (5 % CO₂ no ar). Há quem defenda a cultura embrionária em atmosferas com 5 % de O₂ mas tal assunto ainda é controverso. Verifica-se que há sempre libertação de radicais livres mesmo na presença de baixos níveis de O₂ e de substâncias redutoras, circunstâncias estas que não serão isentas de efeitos.

As **bases nucleares** são outras componentes fundamentais dos meios de cultura, porque são precursoras dos ácidos nucleicos cuja síntese está muito ativa na fase de ativação do genoma. O embrião em fase pré implantatária é capaz de sintetizar bases púricas e pirimídicas, que são precursoras de ADN e de ARN, utilizando o CO₂ do bicarbonato, num processo que exige elevado dispêndio de energia.

O CO₂ é necessário para a síntese das bases pirimídicas (timina, citosina e uracilo) e há etapas de transcrição e de reparação do genoma que envolvem remoção de fragmentos de ADN tanto do espermatozoide como do ovócito. Coexistem sistemas enzimáticos eficazes na reparação e na degradação dos produtos do catabolismo, para que estes não voltem a ser integrados no genoma. O meio terá portanto que fornecer os nutrientes indispensáveis.

No que respeita à **osmolaridade** esta é mantida entre 280 e 290 miliosmol por Kg e sabe-se que qualquer variação interfere no transporte de água através das membranas celulares. Tentando imitar as condições naturais, a osmolaridade de alguns meios artificiais é estabilizada em cerca de 260 miliosmois, com o objetivo de reduzir alguns efeitos nocivos dos aminoácidos. O equilíbrio é difícil de obter porque diminuindo a osmolaridade, também baixam as concentrações de alguns aminoácidos essenciais aos processos de *imprinting*.

As secreções do trato genital materno contêm todos os **aminoácidos** necessários à síntese proteica que é realizada nos 3 primeiros dias de vida e que, por sua vez, depende da tradução das moléculas de ARN mensageiro poliadenilado armazenado no ovócito. A falta dos aminoácidos essenciais impede a síntese proteica e acelera os processos de morte celular. A proporção entre os vários aminoácidos é ainda mais importante do que a quantidade, e as secreções das trompas das várias espécies animais são semelhantes relativamente a este aspeto.

Há importantes interações entre o metabolismo dos **hidratos de carbono** e o dos aminoácidos sobretudo ao nível do ciclo de Krebs. A **glutamina** é o aminoácido chave na síntese das purinas e das pirimidinas porque fornece átomos de carbono para a

síntese *de novo*. A glutamina é estável nos meios de cultura sob condições ligeiramente alcalinas, em que a sua degradação é reduzida e se produz menos amônia.

A **glicina** é o aminoácido mais abundante nas secreções tubárias e uterinas e tem um papel importante na regulação da osmolaridade endógena do embrião. A glicina além de ser um importante osmolito, pode quelar o zinco (quatro moléculas de glicina para uma de Zn^{++}) ficando disponível para ser transportado para o interior das células. O *turnover* da glicina é um dos marcadores da qualidade proporcionada aos embriões humanos criados *in vitro*.

Os aminoácidos **cistina** e a **metionina** contêm enxofre e desempenham um papel importante na metilação e no *imprinting*. O *imprinting* ocorre a seguir à fertilização e, se esta fase for desorganizada, pode prejudicar o desenvolvimento pré e pós implantação. Nos modelos animais, os alelos silenciosos são expressos com erros e são pouco metilados se crescerem em meios de cultura pobres em aminoácidos. A metionina, é classificada como um “aminoácido essencial” e é o maior efetor da metilação pela via da S-acetil-metionina (SAM). A metionina não pode ser excessiva e tem de estar em equilíbrio com os restantes aminoácidos porque a sua afinidade para as moléculas de transporte celular é tão elevada, que reduz a captação dos outros aminoácidos. A metionina também entra na composição como precursor das poliaminas designadas espermina e espermidina. Estas proteínas ligam-se ao ADN, neutralizam as cargas acidófilas e desempenham um papel importante na divisão celular. A SAM e outros agentes que efetivam a metilação, tais como as vitaminas do grupo B, são reguladores epigenéticos importantes, capazes de afetar a estabilidade do ADN, a metilação das histonas e o *imprinting*.

Outro aminoácido crucial para a divisão celular é a **homocisteína**, reciclada nos processos celulares e reguladora da metilação. As **vitaminas do grupo B** e o **zinco** são indispensáveis para a reciclagem da homocisteína, que acaba por ser causa e consequência do *stress* oxidativo, e representa um elo entre este e as etapas do *imprinting*.

Para além dos componentes dos meios de cultura, o **volume de incubação** é outro aspeto determinante. Os embriões de mamífero, em fase pré implantatária, produzem factores de crescimento que promovem o seu próprio desenvolvimento e até o de outros embriões incubados na proximidade. No meio natural os fluidos são escassos, e nos meios de cultura artificiais tendem a ser elevados, criando riscos de diluição de **factores autócrinos** produzidos pelo embrião em desenvolvimento.

A **temperatura** também é um aspeto crucial para os aminoácidos que têm grande labilidade térmica, podendo degradar-se e libertar amónia, o que impede o desenvolvimento embrionário (Gardner, D.K. - 2012).

Nos meios de cultura iniciais, os iões de **ferro** (Fe^{3+}) e de **cobre** (Cu^{+}) são capazes de reduzir o crescimento embrionário, sendo benéfica a utilização de substâncias tais como a penicilina ou o EDTA (Etileno di-amino- tetra- ácido acético), que são **agentes quelantes** dos catiões tóxicos bivalentes que se formam.

O **Zinco** é um oligoelemento essencial ao desenvolvimento dos mamíferos e atua como cofator para cerca de 200 enzimas, incluindo a anidrase carbónica (gerando HCO_3). O zinco está envolvido na regulação dos processos de metilação e na redução do *stress* oxidativo. É o segundo oligoelemento mais frequente, a seguir ao ferro, e previne a toxicidade causada pelo ferro e pelo cobre, embora nem sempre seja adicionado aos meios de cultura. O zinco tem pouca bio disponibilidade exceto no estado quelante.

A via metabólica da pentose fosfato gera as moléculas de ribose-5-P e de NADPH⁴⁸: uma mole de glucose-6- P origina 1 mol de ribose-5-fosfatase mais 2 moles de NADPH. O NADPH é necessário para a maioria das reações anabólicas incluindo a síntese de lípidos e de ácidos nucleicos, e também para a regeneração do glutatião, a célula universal de proteção contra os radicais livres. O **glutatião** dos ovócitos é indispensável

⁴⁸ NADPH é a forma reduzida da NADP ou seja da coenzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato ou fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADP) Esta molécula recebe electrões nas reações da via das pentoses-fosfato e na transformação de malato em piruvato, havendo redução de NADP^+ para NADPH. É importante na síntese dos ácidos gordos e do glicerol. Em <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/NADPH>

para as transformações do espermatozoide após a fertilização. O NADPH medeia a reciclagem da metionina a partir da homocisteína que como vimos, interfere na metilação. Por esta via o NADPH também interfere nos processos de *imprinting*. Em conclusão, as **hexoses** são indispensáveis na fase de desenvolvimento pré implantatário, mas o equilíbrio entre os hidratos de carbono e os restantes metabolitos é de superior importância.

O **metabolismo lipídico** do embrião tende a ser menos valorizado porque a solubilidade dos lípidos *in vitro* não é fácil de obter e a sua análise é complexa, sobretudo a dos ácidos gordos. Contudo, a beta oxidação dos lípidos é indispensável ao metabolismo dos ovócitos na fase pós fertilização e, em termos energéticos os ácidos gordos (palmitato) fornecem três vezes mais energia (ATP) do que as moléculas de glucose.

Os **triglicéridos** são os principais lípidos dos embriões. Logo a seguir à fertilização, os embriões conseguem sintetizar **fosfolípidos** e **colesterol**. As mitocôndrias participam no metabolismo dos lípidos usando a **carnitina** como molécula catalisadora. *In vitro* porém, a situação é complexa porque devido à falta de algumas enzimas, a adição de lípidos requer a adição suplementar de carnitina. Quando a carnitina é adicionada aos meios de cultura embrionária, há aumento da formação de blastocistos.

O papel das **vitaminas**, nas fases precoces do desenvolvimento não é muito claro. As vitaminas lipo solúveis, tais como a A e a E, são anti oxidantes importantes, mas são pouco solúveis nos meios de cultura. A vitamina C que é hidrossolúvel e o anti oxidante natural do fluido folicular pode, em meio de cultura, tornar-se pro-oxidante e contribuir para a desnaturação das proteínas. As vitaminas do grupo B sobretudo a B2, a B6, a B9 e a B12 são indispensáveis na reciclagem da homocisteína assim como o ácido fólico. O ovócito humano também tem elevada densidade de recetores e de moléculas transportadoras de folato o que revela o papel importante desta vitamina.

Macromoléculas – a albumina sérica é uma macromolécula que contem 610 aminoácidos e, juntamente com a transferrina, é a proteína mais abundante e que possui ações anti oxidantes associadas. A albumina devido à sua fácil ligação aos lípidos,

exerce uma ação detergente e é capaz de reduzir a adesividade dos embriões aos instrumentos utilizados nas técnicas da PMA. A albumina consegue penetrar diretamente no embrião, levando consigo muitas pequenas moléculas tais como catecolaminas, aminoácidos e péptidos com papel importante na nutrição embrionária.

A adição de **factores de crescimento** aos meios de cultura é outro assunto controverso. Muitos factores de crescimento e **interleucinas** estão presentes no trato genital feminino e existem recetores para estas moléculas na superfície das células embrionárias. As células em cultura conjunta também secretam interleucinas e factores de crescimento, mas a sua concentração tem de estar em equilíbrio, para ser eficaz. A junção de um único fator de crescimento é muito questionável porque, se for capaz de reduzir a apoptose, pode igualmente impedir os mecanismos reguladores, que são indispensáveis para a destruição das células com defeitos cromossómicos.

Conclusão: na PMA, a percentagem de sucesso entre a colheita dos ovócitos e o nascimento é da ordem dos 5% e podemos afirmar que, este elevadíssimo teor de perdas ainda pode ser agravado pela insuficiente qualidade dos meios de cultura. De facto, podemos afirmar que nunca chegaremos a substituir a natureza e estamos muito longe de conhecer as funções de todos os nutrientes e factores de crescimento, para os podermos dosear e misturar com total segurança!

2.2.3.6 – Processos de transferência embrionária

A seguir ao número e robustez dos embriões disponíveis, a decisão sobre o momento da sua transferência é de crucial importância. Tanto as manipulações a que o embrião é submetido, como o momento em que as mesmas ocorrem, influenciam o seu desenvolvimento e as taxas de gravidez. Sendo impossível reproduzir as condições naturais, tem-se procurado reduzir a permanência embrionária nos meios de cultura, evitando a acumulação de danos biológicos.

Durante mais de 20 anos, a transferência embrionária era feita entre o 1º e o 3º dia. Com os meios de cultura atualmente disponíveis já é possível diferir a transferência para a fase de blastocisto que ocorre no 5º dia de desenvolvimento.

Permanece no entanto a dúvida sobre se será melhor uma transferência precoce ou uma mais tardia. A consciência destes factos favoreceu o aparecimento crescente de bibliografia sobre os riscos a que o embrião está sujeito *in vitro* e a proposta de inúmeros protocolos (Ménézo, Y. – 2013).

Atualmente tem-se vindo a optar pela criopreservação ou pela transferência precoce logo nas primeiras fases de clivagem mas, se a transferência for muito precoce, nos estádios de 2 a 8 células, ainda não é possível identificar os embriões mais viáveis. A transferência tardia na fase de blastocisto (dias 5 e 6) enfrenta a redução do número de embriões disponíveis e aumenta os casos de gemelaridade monocoriónica (Glujovsky D. et al. – 2013); contudo, um atraso programado, pode trazer outras vantagens porque terão sobrevivido menos embriões mas os sobreviventes poderão ser mais resistentes ou portadores de qualquer vantagem adaptativa (Schwarze J.E., et al. – 2012).

Uma transferência intratubária de zigotos (ZIFT) pode constituir uma alternativa, mas protelar a transferência embrionária, tal como referimos, afeta sempre os resultados. Outra questão é a necessidade de sincronizar o estágio embrionário com o meio materno uma vez que um organismo feminino demasiado estimulado também não é vantajoso.

25% dos ovócitos são aneuploides e esta percentagem aumenta com a idade materna. São portanto muito numerosos os embriões que não evoluem devido a alterações cromossómicas. Quando as transferências são feitas tardiamente, muitos embriões deficientes já sucumbiram e há menor risco de anomalias e futuras perdas precoces, causadas pelo aumento da contractilidade uterina. Pelas razões apontadas, uma implantação mais tardia costuma ser melhor sucedida (Cochrane review. Brown J.A. et al. – 2007) e o papel do profissional envolvido nas etapas de decisão e seleção também é crucial importância.

A par da seleção e incubação dos embriões a transferir, há que decidir não só o número mas também o momento mais adequado do ciclo ovárico da futura mãe. A sincronização entre a fase biologicamente mais adequada para o início da gravidez, e a realização da transferência, bem como a escolha de quais e quantos embriões deverão ser transferidos, pode determinar todo o êxito ou insucesso de um percurso que, não raro, exigiu anos de empenhado investimento.

Um estudo oriundo do conhecido centro de PMA de Nottingham e publicado na “*Reproductive Medicine on-line*” (Campbell A., et al. 2013) descreve uma nova técnica, baseada no registo de imagens de embriões em desenvolvimento (fotografados com *zoom* de alta resolução). Os autores destas novas tecnologias de imagem, aplicadas à PMA, pensam poder revolucionar a seleção e quase triplicar o número de embriões saudáveis que são transferidos. A possibilidade de analisar os embriões em fase de pró núcleos, permite escolher os mais promissores.

Chegado o momento oportuno, a **transferência do embrião** pode ser feita com embriões colhidos a fresco ou criopreservados que são introduzidos na cavidade endométrica através do colo uterino, com a ajuda dum fino cateter. Alguns autores identificaram vantagens em proporcionar um período de incubação antes da transferência, traduzido por uma maior percentagem de nascimentos.

Segundo a revisão Cochrane de 2007 (Brown J.A. et al. – 2007) o controle ecográfico, durante a transferência, aumenta significativamente os índices de sucesso (fig. 7). Também se preconiza uma irrigação prévia da cavidade uterina com solutos específicos ou antibióticos, visando reduzir a contaminação bacteriana, mas ainda há pouca evidência da vantagem destes métodos.

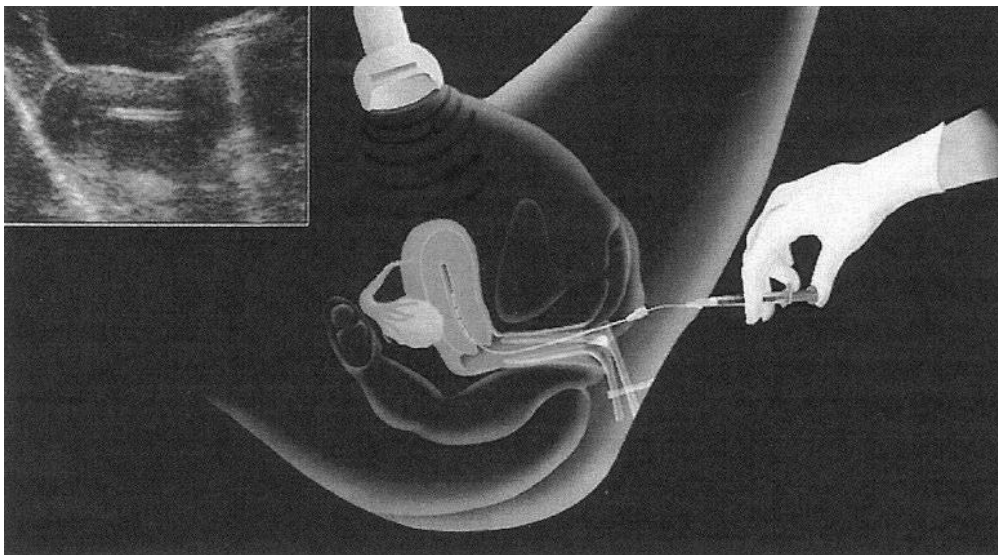


Fig. 7 – Esquema da técnica de transferência de embriões com controle ecográfico ⁴⁹

⁴⁹ <http://procriacaomedicamenteadassistida.blogspot.pt/2012/01/fases-da-fertilizacao-in-vitro.html>

Num estudo sobre resultados da PMA em função da idade do embrião no momento da transferência (Schwarze JE et al – 2012), os autores recorreram à criopreservação na fase de blastocisto, como estratégia para melhorar os resultados e reduzir o número de embriões excedentários. Verificaram que esta opção reduz drasticamente o número de embriões disponíveis para criopreservação, mas garante até 40% de gestações, o que é um «bom resultado» no âmbito da PMA e pode ser compensador.

Os resultados da transferência na fase de zigoto são idênticos aos que decorrem da transferência ao 3º dia. Os blastocistos permitem um melhor descongelamento mas os embriões em fase inicial de clivagem são os que proporcionam mais sucesso na transferência. Como já tínhamos referido, há vários aspectos a considerar mas a transferência de um embrião de 5 dias (blastocisto) conduz a mais nascimentos do que a transferência precoce realizada ao 3º dia, sobretudo nas situações de previsível melhor prognóstico.

Nas situações de doação de ovócitos, a transferência de blastocistos é a forma de abordagem mais eficaz (Myers, E.R. et al. – 2008)⁵⁰. As dadoras costumam ser mulheres jovens e férteis, e os ovócitos doados são com frequência de qualidade elevada.

Relativamente ao **número de embriões** há cada vez mais tendência para transferir no máximo dois. Segundo o relatório internacional de 2009 da ESHRE, e com grandes variações entre países, em 20% dos ciclos de PMA foi feita a transferência dum único embrião, dois embriões em 56,1%, três embriões em 21,5% e quatro em apenas 2,3% dos casos. Foram utilizados embriões congelados em 24,6% das situações. A transferência de dois embriões é a opção preferida e, em alguns países, não são autorizadas transferências de maior número, para evitar o já elevado risco de gravidez múltipla. A lógica da quantidade, que sancionou alguns dos exageros cometidos, e que imperou até há poucos anos, levou a muitas situações que hoje seriam consideradas como má prática médica.

⁵⁰ Effectiveness of Assisted Reproductive Technology, pág. 215. Em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK38540/>

2.2.3.7 - Diagnóstico pré-implantatório

O diagnóstico pré-implantatório consiste numa biópsia do embrião, realizada até 48 horas após a fecundação. Este tipo particular de diagnóstico genético foi desenvolvido em Inglaterra a partir de 1990 e, no relatório da ESHRE de 2009 as etapas de «*Screening*» (rastreamento) e de diagnóstico pré-implantatório já estavam incluídas nos procedimentos da PMA.

Nos estádios iniciais todas as células são pluripotenciais e, se se retirarem uma ou 2 das oito células (blastómeros) dum embrião em fase inicial de crescimento, as restantes garantem o seu desenvolvimento.

Existem essencialmente dois métodos para realizar a análise genética dos embriões: o FISH (fluorescente “in situ” hibridização) e o método da PCR (polymerase chain reaction). O método FISH é usado para detetar alterações do número de cromossomas ou translocações e o método da PCR é utilizado para rastrear doenças monogénicas. A análise do material biológico obtido, permite o rastreamento de algumas doenças hereditárias que, caso se confirmem, irão condicionar a transferência para o útero. Os embriões conseguem sobreviver a estes procedimentos mas não se pode garantir que não ocorra qualquer tipo de dano.

As técnicas de diagnóstico genético pré-implantatório têm limitações e, sob o ponto de vista bioético levantam numerosas questões (Basille C et al. -2009), (Bredenoord A. et al. – 2009). A título de exemplo, evocamos uma série tornada pública em que cerca de 25% dos embriões biopsados exibiam anomalias e em que se verificou que a realização de tais testes de diagnóstico causou uma redução sensível, quer do número de gravidezes quer do de nascimentos (Staessen C. et al. – 2004), (Mastenbroek S. et al – 2007).

De acordo com os princípios éticos praticados na generalidade dos países, é legalmente proibida qualquer seleção de embriões, que não seja justificada por razões estritamente médicas, estando interdita a seleção com base no sexo ou em características étnicas⁵¹.

⁵¹ Lei n.º 32/2006 de 26 de Julho - Procriação medicamente assistida

Em Portugal já é tecnicamente possível desde 2002, a congelação de ovócitos fecundados no estágio de dois pronúcleos. Alguns profissionais (SEMER – 2011)⁵² dizem-se mais tranquilos com a possibilidade de investigação na fase de pronúcleos, «na medida em que, nesta fase, os núcleos dos dois gâmetas ainda não se encontram fundidos i.e., na sua interpretação trata-se de um ovócito fecundado e não de um embrião» e encaram a criopreservação de ovócitos fecundados como «...a solução para os dilemas éticos da congelação de embriões».

As potencialidades destas novas tecnologias vieram alterar de tal forma o que parecia definitivo e imutável, e são tão suscetíveis de originar dilemas ético-jurídicos, que conduziram a que muitas sociedades se defendessem impondo sérias restrições a mais avanços nesta controversa matéria.

2.3.3.8 - Criopreservação biológica

2.3.3.8.1 – Aspectos gerais

Apesar das técnicas básicas de criopreservação serem conhecidas há muitos anos, a Criobiologia⁵³ é uma ciência nova que estuda a preservação de material biológico a muito baixa temperatura. A criopreservação aplicada à Medicina da Reprodução ganhou consistência a partir de 1947, altura em que se conseguiu congelar e posteriormente descongelar embriões de mamíferos em estado pré-implantatório, sem que tal procedimento impedisse a sua transferência e futuro desenvolvimento uterino (Oliveira D.C.A. – 2000).

As taxas de integridade embrionária após os procedimentos de congelamento/descongelamento mantiveram-se muito baixas até 1983 mas, a partir dessa altura, conseguiu-se uma melhoria significativa dos índices de implantação dos criopreservados. Entre os raros êxitos das tentativas pioneiras e os resultados muito positivos da atualidade, mediou uma longa evolução.

⁵² Aniversário do SEMER: há 25 anos a investigar e a aplicar na área da PMA. Women's practice n° 14 janeiro/fevereiro 2011, p. 30-31

⁵³ A palavra *crio* provem do grego *krýos*, que significa frio.

Os embriões obtidos em cada ciclo de FIV/ICSI, são com frequência, em número superior aos que podem ou é aconselhável transferir. A escassez de componentes epigénicos nos meios de cultura, não permite, como vimos, que os embriões sobrevivam para além de 6 ou 7 dias fora do útero e, todos estes factos favoreceram o desenvolvimento das técnicas de preservação.

Muitos dos riscos imputados à PMA decorrem dos índices elevados de gemelaridade e de prematuridade mas, com a tendência crescente para a transferência dum único embrião e a criopreservação dos restantes, reduziram-se os problemas e aumentaram-se as hipóteses de êxito. Quando não surge gravidez, mas existem embriões preservados duma FIV anterior (só em cerca de 20% dos casos surgirá tal oportunidade)⁵⁴ pode repetir-se facilmente a transferência.

Recorrer a embriões criopreservados evita uma nova estimulação hormonal da mulher (Bankowski B.J., et al. - 2005) o que já é um ganho significativo além de viabilizar vidas humanas, o que legitima muitos dos procedimentos inerentes. Haverá sempre riscos mas é um facto que tem havido uma grande evolução (Carvalho, A.A., Faustino, L.R. et al., - 2012). O recurso a estas tecnologias tem sido crescente não só no âmbito da PMA humana mas igualmente na reprodução animal, onde se junta a importante recuperação de espécies ameaçadas e a conservação de células estaminais pluripotenciais.

Tanto a criopreservação tradicional como a inovadora técnica de **vitrificação**⁵⁵ que se baseia num arrefecimento muito rápido e intenso, recorrem ao azoto líquido que permite alcançar temperaturas da ordem dos 160 a 196 graus Celsius negativos. Estas temperaturas extremas são capazes de suspender a atividade biológica de muitos organismos vivos (embrionários ou outros) o que permite armazená-los por tempo indeterminado (Perry, S.F. – 1998).

⁵⁴ <http://www.pro-criar.com.br/tratamentos/congelamento-de-embrioes>

⁵⁵ Cryobiology. (ip+ja) unesco/iubs/eubios living bioethics dictionary version 1.3, pag 115

2.3.3.8.2 – Micromanipulação e congelamento de gâmetas e embriões

A descoberta da possibilidade de congelamento por tempo indeterminado, de gâmetas e embriões em fase pré-implantatória, veio permitir a sua utilização futura contribuindo para a viabilização de muitas vidas. Através do congelamento, é mantido o potencial de desenvolvimento, o qual pode ser retomado após um aquecimento controlado.

Apesar da crescente segurança das técnicas de criopreservação é necessário um controle rigoroso da velocidade e do grau a que o arrefecimento e o aquecimento se processam.

Os embriões destinados à criopreservação, na sua maioria de 1 a 3 dias, são revestidos previamente com uma substância crio protetora. O glicerol é um dos crio protetores mais usados antes da imersão no azoto líquido e, tem como função permitir uma dessecação celular controlada (extração da humidade), impedindo as lesões fatais que ocorreriam, se houvesse formação de cristais de gelo. Após esta etapa, segue-se a desidratação e o armazenamento a muito baixa temperatura. Alguns hidratos de carbono promovem a liofilização e podem ser associados aos crio protetores, já que umas substâncias preservam mais o meio intracelular e outras o meio extracelular.

O descongelamento também tem de ser muito rápido, de forma a prevenir a recristalização, e diminuir o tempo de contacto das estruturas celulares com os nocivos cristais de gelo. Mesmo com os meios mais sofisticados pode ocorrer recristalização (a partir de 120° C negativos) e surgirem lesões de descongelamento (*thawing damage*). Quando a criopreservação é realizada com temperaturas mais altas, o período de sobrevivência celular também é mais curto.

Tanto o sémen como os ovócitos criopreservados conseguem ser fecundados numa percentagem elevada de casos e atualmente mais de 70% dos embriões congelados sobrevivem após aquecimento controlado, porque as novas técnicas reduzem a ocorrência de danos celulares.

Com o inovador recurso à vitrificação, iniciou-se uma nova era da FIV, ainda causadora de alguma apreensão mas que se revela promissora. A técnica de vitrificação de embriões é semelhante à que é utilizada para os gâmetas, mas os resultados são menos garantidos.

A generalidade dos autores⁵⁶ indica um período de 15 a 20 anos para a sobrevivência, tanto dos ovócitos como dos embriões criopreservados mas estes períodos são meros indicadores. Nos países que não interditam estas técnicas, provou-se que a atividade metabólica e o potencial de desenvolvimento podem ser suspensos por um período de tempo muito mais alargado do que o que referimos. Nos países cuja legislação não permite a criopreservação embrionária, como por exemplo a Alemanha, a vitrificação de ovócitos, tem sido a alternativa encontrada para evitar a repetição de todo o ciclo de fertilização, e os custos humanos e materiais que lhe são inerentes.

Com a evolução constante deste segmento da Medicina, tem surgido legislação atualizada e tendencialmente restritiva na maior parte dos países. Portugal é desde 1997, um dos 30 países subscritores dos relatórios periódicos publicados pela ESHRE que visam regulamentar muita da atividade existente. Alguns aspectos que tinham ficado definidos no relatório ESHRE de 2009 só foram reconhecidos em França no fim de 2010, altura em que "*l'Agence de Biomédecine*" que é o organismo regulador francês, autorizou a vitrificação dos embriões, em alternativa ao processo de arrefecimento lento. Esta legislação francesa que citámos a título de exemplo, foi revista em junho de 2012 e introduziu mais atualizações em novembro de 2013⁵⁷.



Fig. 8 - Criopreservação de embriões. Os tanques de criopreservação são coletivos e existem sistemas mais seguros do que outros⁵⁸

⁵⁶ http://inseminacaoefertilizacao.blogspot.pt/2009_08_01_archive.html

⁵⁷ <http://www.agence-biomedecine.fr/Procedes-et-techniques-d-AMP?lang=fr>

⁵⁸ Em <http://jus.com.br/revista/texto/22778/a-personalidade-juridica-dos-embrioes-excedentarios-e-a-dignidade-da-pessoa-humana>

Tanto as **técnicas de criopreservação** como as de **micromanipulação** evoluíram bastante nos anos mais recentes, o que motivou uma significativa melhoria dos procedimentos tradicionais da FIV. Referimo-nos concretamente a um conjunto de novas técnicas em que se destacam:

- IMSI (técnica de melhoria do procedimento habitual da FIV com micromanipulação).
- Eclosão assistida no âmbito da FIV, com micromanipulação.
- Cultura embrionária prolongada em meio definido, com ou sem micromanipulação.
- Seleção de espermatozoides vivos antes da FIV.
- Vitrificação dos gâmetas (técnica que como vimos pode suplantar os métodos de congelação previamente utilizados).
- Vitrificação de zigotos e embriões.
- Remoção do glóbulo polar⁵⁹ (técnica que visa melhorar os resultados da FIV com ou sem micromanipulação e cuja permissão, nomeadamente em França só teve lugar em novembro de 2013)⁶⁰

Numa recente publicação (Sifer, C., et al. - 2012), os autores relatam o primeiro nascimento ocorrido em França após vitrificação embrionária. Neste relato são descritos dados relativos à evolução biológica e clínica, partindo dum estudo observacional e prospetivo, em que embriões de boa qualidade, em fase inicial de clivagem, foram vitrificados e depois aquecidos. Ao serem comparados estes resultados com os de outras séries, em que os embriões tinham sido submetidos a arrefecimento lento, concluiu-se que a sobrevivência dos embriões vitrificados foi superior e também houve melhores taxas de gravidez. Por razões desconhecidas, os índices de gravidez obtidos com a fertilização de ovócitos previamente vitrificados é inferior aos valores obtidos a partir duma transferência de embriões congelados.

⁵⁹ Na divisão meiótica da gametogénese feminina o citoplasma das 2 células-filhas é repartido de forma desigual. Forma-se um óvulo cheio de nutrientes e um **glóbulo polar** que é uma célula pequena destinada a sucumbir. Na maioria das fêmeas de mamíferos, a 2ª divisão da meiose só ocorre quando o gâmeta é fecundado. Sendo assim, **o verdadeiro gameta é o ovócito de tipo 2**, pois é ele que se irá fundir com o gameta masculino.

⁶⁰ <http://www.agence-biomedecine.fr/Procedes-et-techniques-d-AMP?lang=fr>

Existem riscos potenciais e desconhecidos decorrentes das técnicas e dos crioprotetores utilizados na vitrificação. As concentrações e associações utilizadas são diferentes das que têm sido usadas nas técnicas de arrefecimento lento e que se têm revelado seguras. O facto de ser necessário recorrer a produtos diferentes e em doses menos testadas, constitui outro motivo de preocupação (U.B. Wennerholm U.B. et al. - 2009). O dimetilsulfóxido (DMSO) que é muito utilizado como agente anti congelamento no caso dos embriões, pode segundo alguns autores e a título de exemplo, exercer efeitos tóxicos.

Os avanços e os resultados da PMA são inquestionáveis mas levantam inúmeras questões já que dão origem a novos seres que podem ser tragicamente excedentários e excluídos dum projeto parental ou favorecem procedimentos cuja segurança é questionável.

2.3.3.9 - Recursos e resultados nacionais da PMA

Existem em Portugal 28 centros que realizam ciclos de PMA, e 27 de entre eles possuem recursos para realizarem FIV clássica e ICSI. De acordo com o Conselho Nacional de Procriação Medicamente Assistida⁶¹ (CNPMA) a Medicina da Reprodução em Portugal está atualizada e dispõe da totalidade das técnicas conhecidas e descritas no texto ⁶²:

- a) Inseminação artificial intra uterina e fertilização in vitro (FIV).
- b) Injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI/IMSI).
- c) Transferência de embriões, gâmetas ou zigotos.
- d) Diagnóstico genético pré-implantação.

⁶¹O Conselho Nacional de Procriação Medicamente Assistida (CNPMA) foi criado pela Lei n.º 32/2006, de 26 de Julho e é a entidade reguladora da prática da PMA, competindo-lhe pronunciar-se sobre as questões éticas, sociais e legais que envolvem a aplicação destas técnicas.

⁶² http://www.cnpma.org.pt/Docs/RELATORIO_ACTIVIDADE_PMA2011.pdf

e) Outras técnicas laboratoriais de manipulação ou criopreservação gamética ou embrionária, equivalentes ou subsidiárias.

Cerca de 80% dos ovócitos aspirados têm maturidade para permitirem a FIV, mas as taxas de fecundação são baixas e um número tão elevado como 70 a 80% dos embriões humanos artificialmente concebidos, possuem anomalias genéticas. Paralelamente, as **taxas de gravidez** também são muito inferiores aos índices de fertilização e variam com as características do próprio embrião.

A percentagem de gestações conseguidas após transferência intrauterina de embriões humanos, avaliada em mulheres com menos de 39 anos de idade, é a seguinte:

- Embriões de D1: ovócitos fecundados, embrião de 1 célula ou zigoto – 6%.
- Embriões de D2 – 19%.
- Embriões de D3 – 27%.
- Embriões de D4 – 35%.
- Embriões de D5 – 42%.

Muitas das gestações iniciadas não progridem e depois dos 39 anos de idade materna, segundo a análise que foi feita⁶³, há uma redução de 10-15% sobre os valores acima indicados. Os índices de sucesso medidos não somente pelas taxas de gravidez, mas também pelo número de gestações que prosseguem, não dependem apenas das condições maternas: o **potencial evolutivo** dos embriões também varia consideravelmente de acordo com a altura em que é feita a transferência.

O número de dias de incubação e o estágio de desenvolvimento dos embriões também fazem oscilar as já reduzidas taxas de êxito da PMA:

- Embrião 12-18h pós-inseminação ou após ICSI, estágio de pronúcleos ou zigoto com 1 única célula em D1, dá origem a 70% de embriões com bom potencial evolutivo.
- Embriões com 2 - 4 blastómeros (em D2) mostram que 60% têm bom potencial evolutivo.

⁶³ Idem

- Embriões com 6 -12 blastómeros (em D3) 50% têm bom potencial evolutivo.
- Embriões com 64 blastómeros ou mórula (em D4) 40% têm bom potencial evolutivo.
- Embriões com 250 células ou blastocisto (em D5) 30% têm bom potencial evolutivo.
- Embriões em fase de blastocisto eclodido (em D6) 25% têm bom potencial evolutivo.

A partir do final da 1ª semana e com os recursos atualmente disponíveis, cessa a possibilidade de evolução ou duma transferência bem-sucedida.

Relativamente à realidade portuguesa houve uma significativa evolução mas, segundo os dados do Centro de Genética da Reprodução da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, entre 1997 e 2003, dum total de 3000 ciclos ovulatórios, só 196 (7%) conduziram à crio preservação de embriões (382 embriões) e, em 63% desses ciclos, os embriões foram reutilizados no 1º ano e os restantes até 3 anos⁶⁴. O responsável Alberto Barros⁶⁵ lembra que a taxa de gravidez, obtida após crio preservação, é 10-15% inferior à obtida com a transferência a fresco mas esta desvantagem é compensada porque, *“do ponto de vista científico não há limites de prazo máximo para a congelação de embriões (sic.)”*.

O registo nacional da atividade da PMA consolidou-se a partir de fevereiro de 2011 e o que existe de mais atual é o relatório de 2013, proveniente da análise e do esforço concertado dos vários centros portugueses.

Na VI Reunião Anual da CNPMA com a Sociedade Portuguesa de Medicina da Reprodução (SPMR) ocorrida em Maio de 2013, foram apresentados os dados nacionais e *«em termos gerais a percentagem global de gestação clínica por ciclo iniciado de FIV*

⁶⁴ O registo dos dados portugueses é da responsabilidade de Prof. Dr. Carlos Calhaz-Jorge do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Santa Maria.

⁶⁵ Especialista, Membro do CNPMA e dono de uma clínica de PMA no Porto. Divulgado no Jornal Público, a 25 de Março de 2008 e referente à 11ª Acta da CNPMA de 9 de Maio de 2008

foi de 29,7% e de ICSI foi de 25,6% e a percentagem de parto por ciclo iniciado de FIV foi 24,0% e de ICSI foi 18,1%».

No ano de 2011, houve 1288 partos de crianças artificialmente concebidas. Nesse ano, houve 16,1% de transferências TEC bem-sucedidas que contribuíram para 11,49% do total dos partos da PMA. Em relação aos anos mais recentes, verificou-se um aumento do número de transferências de embriões criopreservados (TEC) tendo havido 661 ciclos em 2009, 777 ciclos em 2010 e 921 em 2011.

Embora com desvantagem significativa relativamente à procriação natural, houve um acréscimo de 22% dos nascimentos da PMA entre 2009 e 2010, o que se atribui ao aumento da capacidade dos centros públicos. Em 2011, voltou a haver uma redução com menos 241 nascimentos do que em 2010, o que pode ser explicado por um menor número de ciclos iniciados ou por piores resultados. Contudo, em 2010 a percentagem de crianças nascidas com recurso a PMA correspondeu a 1,5% do total de nascimentos nacionais e em 2011 correspondeu a 2,1%, aumento este que pode ser considerado muito significativo (1757 crianças a que se somam 250 nascidas após transferência intra uterina de espermatozoides).

Voltando ao ano de 2013 em que se iniciou uma nova era de informação com a publicação do relatório relativo a 2011, verificou-se que os resultados conseguidos após transferência de embriões criopreservados foram os seguintes: 918 embriões deram origem a 148 partos (16,1%) e a pelo menos 174 nascimentos.

Em obstetrícia «parto» e «nascimento» não são a mesma coisa porque um parto pode dar origem a um ou mais nascimentos. Daqueles 148 partos, 123 foram simples, 24 foram gemelares, 1 foi triplo e pelo menos dois perderam-se para o *follow-up*.

Muitas das crianças integradas no estudo que realizámos, nasceram em 2011. Naquele ano a percentagem de partos após FIV/ICSI com transferência a fresco foi de 25,9%⁶⁶.

No âmbito da PMA em Portugal tem havido um aumento dos partos gemelares que rondam 20-25% e ultrapassam as recomendações internacionais que indicam

⁶⁶ http://www.cnpma.org.pt/cnpma_documentacao.aspx#

valores desejáveis abaixo dos 20%. A gemelaridade pode ser reduzida se se transferir preferencialmente 1 único blastocisto ou então 1 a 2 embriões de D2 ou de D3 no máximo. A maior parte dos centros transfere apenas 1 ou 2 embriões e é raro serem transferidos 3. Em 2011 houve uma única transferência de 4 embriões, o que é bastante desaconselhável.

Em Portugal, 25,7% dos nascimentos dos embriões criopreservados ocorreu antes das 37 semanas de IG que marca o início da fase de termo da gravidez (quadro 2):

Total de partos l		Idade gestacional (semanas)					
		20-27	28-33	33-36	37-41	=>42	Desc.
Únicos	123	1	1	15	102	0	4
Gemelares	24	0	2	13	8	0	1
>=Triplos	1	0	0	1	0	0	0
Total	148	1	3	29	110	0	5

Quadro 2 – Resultados nacionais relativos à IG em que ocorreram os partos após transferência de embriões criopreservados (TECs provenientes de FIV/ICSI – ano de 2011). Notar que o actual limite de viabilidade para a vida extra uterina situa-se nas 24 semanas de IG.

Os protocolos mais atuais preconizam, que o sucesso da PMA se meça pelo número de gravidezes bem-sucedidas (Christopher, A. J, Christensen, A.L, et al., - 2011). A percentagem de nascimentos é sempre muito inferior ao número de ciclos, apesar dos índices de gemelaridade na PMA serem superiores aos da procriação natural.

Existem algoritmos para que os candidatos a futuros pais possam calcular as suas hipóteses de sucesso e avaliem os riscos incluindo a gemelaridade, uma vez que os custos são elevados e são necessárias em média cinco tentativas, até se conseguir uma gravidez. Face ao carácter invasivo dos procedimentos, às elevadas percentagens de insucesso e aos custos materiais e humanos, é exigido que os candidatos a pais deem o seu consentimento, de forma expressa e por escrito, antes de iniciarem os tratamentos.

O seguinte exerto foi retirado da atual legislação: «(...) *após terem sido devidamente informados sobre os benefícios e riscos conhecidos resultantes da utilização destas técnicas, bem como das suas implicações éticas, sociais e legais (artigo 14.º da Lei n.º 32/2006, de 26 de julho) (...)* ».

Dando resposta a esta necessidade, a CNPMA aprovou novos modelos de consentimento informado em maio de 2012, que já contemplam as atuais exigências⁶⁷.

Apesar de se manterem reduzidos índices de sucesso, e de existir uma generalizada escassez de embriões com boas condições de transferência, não estão esgotadas as questões sobre a conservação e o destino a dar aos excedentários, a que se juntam as crescentes dúvidas sobre os efeitos biológicos exercidos por toda esta tecnologia.

No quadro 3 apresentamos o número de embriões criopreservados e acumulados, só em Portugal, entre 2009 a 2013⁶⁸.

ANO	2009	2010	2011	2012	2013
TOTAL de embriões criopreservados	11251	11440	16781	16358	19406
Embriões doados a casais	45	26	19	13	32
Doados para investigação	0	0	0	0	0
Embriões descongelados e eliminados	510	315	189	79	398

Quadro 3 – nº de embriões criopreservados e acumulados em Portugal entre 2009 a 2013

⁶⁷ http://www.cnpma.org.pt/cnpma_documentacao.aspx#

⁶⁸ idem

2.4 –IMPORTÂNCIA DO MEIO AMBIENTE NO DESENVOLVIMENTO HUMANO

2.4.1 – Origem genética e meio ambiente

Citando António Coutinho ⁶⁹

«...todos os seres vivos neste planeta, apesar da sua extraordinária diversidade, são feitos exatamente dos mesmos átomos ... A vida é feita de átomos vulgaríssimos no planeta, mesmo se alguns nos chegaram vindos do infinito distante: a todos nos corre nas veias pedaços de estrelas, até há pouco tempo, pensávamos que um homem era feito de moléculas “de homem” e um sapo de moléculas “de sapo”, mas hoje sabemos que as moléculas que fazem homens e sapos são praticamente as mesmas...»

Podemos afirmar que, ao nascer, já um longo passado condicionou as nossas células e determinou o nosso futuro. Após a fertilização há um ciclo celular em que o genoma do zigoto é ativado e este período é extremamente crítico e vulnerável aos factores ambientais.

Na fase mais precoce do desenvolvimento embrionário, as exigências metabólicas são garantidas pelas reservas maternas. Os metabolitos necessários para as primeiras divisões celulares provêm do ovócito mas, em pouco tempo, esgotam-se as reservas de ARN transcrito e poli adenilado, dando lugar a moléculas de ARN mensageiro já processadas pelo embrião. Durante estas primeiras etapas de clivagem, ocorre uma divisão celular sem crescimento, em que a transcrição do ARN é mínima, mas a replicação do ADN é intensa. É um ciclo longo em que ocorrem perto de 2 milhões de episódios de reparação do código genético (ADN) sendo possível a ocorrência de um ou outro erro.

⁶⁹ In «a célula património da vida», CNECV, Ciência e Ética – Da célula ao embrião, pag 16-17, Lisboa 2001

Qualquer atraso no período fundamental que tem lugar na fase entre 4 e 8 células no caso humano, pode provocar uma redução crítica do nível de ARN mensageiro e o embrião pode deixar de se desenvolver (fig. 12).

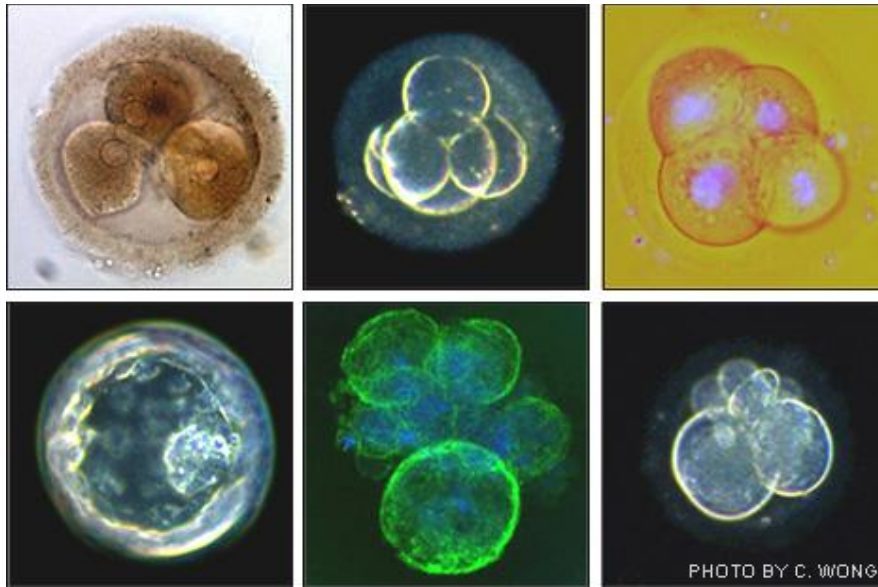


Fig. 9 – Blastocisto de 4 células (fotografia de C. Wong)

Vários estudos, envolvendo factores preditivos, têm revelado que o ambiente em que crescemos, percorre e marca a nossa existência, e pode ser responsável por doenças surgidas longos períodos após uma exposição. Este passado refere-se à abundância ou à escassez na vida dos nossos pais, ao bem-estar existente no útero materno, acarinhado ou perturbado pela eficácia da placenta que serviu de interface entre mãe e filho, e a todas as agressões ambientais ocorridas.

Aspectos como a subnutrição, ocorridos em períodos críticos do desenvolvimento fetal, podem causar alterações permanentes da estrutura e da função do organismo humano, aumentando os índices de morbilidade em fases mais tardias da vida. Um conhecido estudo holandês que mantém o acompanhamento de indivíduos nascidos de gravidez única e de termo, ocorrida numa época marcada pela fome, durante a segunda guerra mundial («*The Dutch Famine Birth Cohort*») já vai na 3ª geração e tem sido usado como referência de estudo sobre os efeitos ambientais e a genética das populações (de Rooij SR, Roseboom TJ, - 2013). A população deste estudo

é constituída por 2414 homens e mulheres, e tem ajudado a pôr em evidência algumas relações causais entre as condições do desenvolvimento mais precoce e a evolução posterior e senescência.

A nutrição e as condições ambientais durante o desenvolvimento intrauterino, podem manifestar-se no próprio, numa parte da descendência ou ser transportadas pelos gâmetas, que as perpetuam. Uma subamostra de 150 indivíduos daquela população holandesa, foi avaliada aos 68 anos de idade altura em que foi medido o declínio cognitivo, a ocorrência de alterações da substância branca cerebral, a presença de micro hemorragias (através de estudos com ressonância magnética), a incidência de fracturas, a força e o desempenho motor, a acuidade visual e a ocorrência de cirurgia às cataratas entre outras patologias. Partindo da mesma amostra, os autores do estudo, propuseram-se avaliar o comprimento dos telómeros⁷⁰, o *stress* oxidativo e o estado inflamatório, como possíveis indicadores de mecanismos subjacentes. A hipótese levantada pelos investigadores, era se a subnutrição no início da gestação estaria a influenciar os processos tardios de envelhecimento, mediante uma redução da capacidade funcional, duma reparação somática perturbada e de sistemas de anti oxidação vulneráveis com processos anti inflamatórios crónicos. Verificaram que o comprimento dos telómeros se relacionou com a regulação do envelhecimento celular, bem como com a esperança média de vida.

Experiências animais também demonstraram que a restrição proteica em gestantes, origina uma descendência cujos telómeros são mais curtos no tecido renal, na artéria aorta e nos ilhéus pancreáticos, o que em parte explica a menor esperança de vida destes indivíduos.

As pessoas que são mais pequenas ao nascer (não por nascerem prematuramente) apresentam maior risco de má progressão de peso durante a infância, doença coronária e enfarte do miocárdio. Estas correlações são independentes dos factores resultantes do estilo de vida, os quais se "somam" aos efeitos da vida intrauterina (Barker D.J.P. – 1997). Tais indivíduos primordialmente subnutridos também possuem menor massa muscular em idades avançadas.

⁷⁰ Os telómeros são sequências repetidas de ADN existentes na extremidade dos cromossomas. Perdem um comprimento previsível, a cada divisão celular mas também perdem dimensão quando submetidos a *stress* oxidativo. Quando o tamanho dos telómeros se torna criticamente pequeno, a célula perde capacidade de se replicar e entra em senescência.

Num modelo de estudo em que foi medido o *stress* oxidativo (Desai, M., Gayle, D.A., et al. - 2009) com o bio marcador urinário F2- IsoP⁷¹ e se avaliou a lesão do ADN celular (a nível dos leucócitos), verificou-se que uma restrição da ordem dos 50% nas necessidades nutricionais da grávida, leva a um estado inflamatório basal, mas com uma reduzida capacidade de resposta à inflamação por parte da descendência.

Quando há um desequilíbrio entre a produção de substâncias capazes de reagir com o oxigénio [*reactive oxygen species* (ROS)]⁷² e a habilidade do organismo para neutralizar essas substâncias, ocorre *stress* oxidativo que causa lesão oxidativa de células, tecidos ou órgãos e também pode causar um encurtamento dos telómeros, independentemente do número de divisões celulares. O *stress* oxidativo tem sido associado, a numerosas doenças relacionadas com a idade tais como o cancro, a diabetes e as doenças cardiovasculares ou neuro degenerativas.

Restrições importantes do crescimento intrauterino também têm sido associadas com níveis aumentados de proteína C reativa basal (PCR)⁷³. Num estudo populacional verificou-se que a diminuição de 1 Kg de peso médio ao nascer, estava associada a um aumento médio da PCR sérica da ordem dos 11%, avaliada entre os 30 e os 59 anos (Sattar, N., et al. 2004). Noutro caso avaliado e que envolveu 5000 pessoas (Canoy, D., - 2009) a contagem total de leucócitos avaliada aos 31 anos, mostrou ser superior nos indivíduos nascidos com menor peso. Tanto a medição da PCR como a contagem total de leucócitos são importantes indicadores de inflamação.

Alguns destes estudos ainda decorrem, mas já permitem afirmar que factores ambientais, como a subnutrição em períodos críticos do desenvolvimento fetal, podem causar alterações permanentes da estrutura e da função do organismo humano, e consequentemente aumentarem os índices de morbilidade em fases mais tardias da vida.

O conjunto de conclusões sobre a forma como as circunstâncias intra uterinas determinam a suscetibilidade às doenças ao longo da vida, é conhecido como «*Teoria da programação intra uterina*» ou «*Hipótese de Barker*» porque teve em David Barker (1994) o seu investigador original (Barker, D.J.P. – 1998), (Bateson, P., et al. – 2004).

⁷¹ O F2-Isoprostano (F2-IsoP) é um biomarcador para o *stress* oxidativo comum a todo o organismo que pode ser produzido pelas membranas fetais na presença de determinados estímulos. É um prostanóide derivado do ácido araquidónico e é especialmente útil como marcador *in vivo* da peroxidação dos lípidos.

⁷² ROS - são subprodutos naturais do organismo resultantes do metabolismo normal do oxigénio

⁷³ Proteína C reactiva basal (PCR) é um factor inflamatório major na idade adulta.

As evidências propostas por Baker, têm vindo a aumentar com estudos de outras áreas. Ou seja, as agressões do passado poder-se-ão repercutir no futuro do indivíduo e no da sua descendência, originando alterações transgeracionais.

Estudos mais recentes, inspirados na «*Hipótese de Barker*», sugerem que as condições de desenvolvimento intrauterino têm um papel importante na origem de muitas das principais doenças, tais como hipertensão, diabetes e o próprio envelhecimento. Determinadas carências prévias ou concomitantes à gravidez, nomeadamente em oligoelementos, também têm sido relacionadas com alterações do neurodesenvolvimento fetal.

O exemplo mais conhecido da influência dos factores ambientais e da programação epigenética, foi aquele que David Barker (Barker D.J.P. – 2004) divulgou, ao constatar que fetos privados de suplemento nutritivo, tendiam a tornar-se hiperabsorventes quando dispunham de teores alimentares adequados e, conseqüentemente, a tornarem-se obesos ou portadores de síndrome metabólica. Vários estudos inovadores da década de 60 (Dorner, G., Staudt, J. - 1969) também se debruçaram sobre a influência do meio hormonal precoce, tentando relacioná-lo com a orientação sexual tardia dos indivíduos submetidos a situações de *stress* e, embora não se possam considerar conclusivos relativamente aos objetivos, alargaram horizontes para a investigação da influência do meio sobre o desenvolvimento.

Ernst Haeckel (1834-1929) definiu o conceito de ecologia⁷⁴ ao estabelecer que “*o conhecimento biológico nunca é completo quando o organismo é estudado isoladamente*” contudo, este médico e biólogo alemão estava longe de imaginar os riscos decorrentes da privação das condições naturais. No âmbito da PMA a somar aos factores pessoais dos progenitores e às causas da infertilidade, há um conjunto de interferências sobre a evolução da vida humana.

Está já provado, que as características da dieta de que as mães beneficiaram na sua própria infância, a exposição química a certos agentes (alteradores endócrinos ou medicamentos como citostáticos ou o antiepiléptico valproato de sódio por exemplo)⁷⁵,

⁷⁴ Ecologia - palavra composta pelos vocábulos gregos *oikos* que significa «o lugar onde se habita» e *logos* que significa «estudo»

⁷⁵ Na espécie humana foi relatado um aumento de malformações congénitas (que incluem, defeitos do tubo neural, hipospadias, dismorfia facial, malformações cardiovasculares e dos membros entre outras) nos filhos de grávidas epiléticas medicadas com valproato de sódio, em comparação com outros antiepilépticos.

In http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=9663&tipo_doc=fi

os traumas psicológicos (ex. *stress* pós traumático e depressão), as doenças alérgicas, a diabetes, o tabagismo ou a própria constituição física e idade materna, são tudo factores que terão influência no novo ser.

Os hábitos de vida dum indivíduo podem alterar a sua biologia, marcar a sua existência e afetar o seu futuro, confirmando a importância dos factores externos ou artificiais na expressão genética. O nosso epigenoma é constantemente dependente, quer do ambiente atual quer do ambiente precoce, porque há efeitos que se revelam irreversíveis e podem exercer o efeito transgeracional, de que já falámos.

2.4.2. – Factores epigenéticos e ciclo vital

Quanto mais jovens forem os organismos, mais vulneráveis são às ações ambientais e a fase embrionária é o paradigma dessa vulnerabilidade. Embora a reserva oocitária seja muito importante para o desenvolvimento do embrião, são as condições de cultura que, como vimos, viabilizam ou comprometem a evolução subsequente.

Nos ecossistemas primitivos e artificialmente criados pela PMA existe uma sinecologia⁷⁶ entre todos os elementos vivos e não vivos, e de todos entre si. Os embriões constituem os componentes bióticos enquanto os factores físico-químicos dos meios de cultura são os componentes abióticos (luz, composição do meio de cultura, temperatura, oxigênio, etc.). Admite-se como dissemos, que a permanência de vários embriões colocados em conjunto poderá imprimir diferenças, ainda desconhecidas, relativamente às situações em que existe um único embrião.

Após a fertilização, a reprogramação epigenética começa com o apagamento alargado dos locais de metilação do ADN paterno, contido nos espermatozoides, ao mesmo tempo que se atenuam as condições de *imprinting* próprias dos progenitores. Algumas tecnologias da PMA usadas em etapas precoces do desenvolvimento podem alterar os mecanismos reguladores do *imprinting* (Skora D. - 2012). Convém recordar

⁷⁶ Área da ecologia que estuda as relações entre as comunidades de organismos vivos e o ambiente. In Infopédia: Porto Editora, 2003-2014. Disponível em [www: <URL: http://www.infopedia.pt/lingua-portuguesa-aa/sinecologia>](http://www.infopedia.pt/lingua-portuguesa-aa/sinecologia).

que os efeitos das várias tecnologias se fazem sentir, não só ao nível dos loci de *imprinting* genómico mas também nos loci que lhe são externos, o que poderá explicar alguns dos efeitos mais subtis que têm sido presumidos em modelos animais. Estes modelos têm uma crescente importância na análise dos mecanismos de reprogramação epigenética, mas a sua investigação em humanos encontra-se muito limitada por razões éticas.

Durante a embriogénese os padrões epigenéticos modificam-se de forma dinâmica, conferindo aos embriões uma enorme capacidade de diferenciação. As interações entre células vizinhas promovem a utilização de certos genes do genoma, deixando outros inativos, e todas as alterações ocorridas propagam-se através da divisão celular, podendo persistir mesmo quando o agente modificador é removido.

As mutações do ADN ficam definitivas no início da embriogénese e, embora permaneçam possíveis, são raras depois da formação do zigoto, ao contrário das mudanças epigenéticas que são permanentes (Mark A. – 2009) (fig.10).

Ao longo do desenvolvimento tudo se revela interligado: genoma, epigenoma e até o microbioma que nos habita e funciona quase como um genoma acessório, indispensável à nossa sobrevivência. A ontogénese progride dando origem a órgãos e aparelhos, que se irão desenvolver sob os efeitos da dieta, dos tóxicos ambientais e até da própria realidade psico social.

O epigenoma irá manter-se dinâmico e dependente tanto do ambiente passado como do atual, permitindo que se exerçam efeitos transgeracionais. As gerações vindouras terão os seus próprios epigenótipos, partindo da sua própria herança genética que depois será modificada pela realidade circundante, nas várias fases do ciclo vital.

O conhecido adágio de que «somos aquilo que comemos» revela-se verdadeiro e sugere como é difícil, ou mesmo impossível, anular ou compensar as faltas sofridas ou os erros cometidos no passado. A má nutrição numa criança altera a neuro transmissão e afeta o desempenho cognitivo. Se houver correção precoce e dentro do período crítico, poderá manter-se um fenótipo saudável porém, mesmo que uma normalização ulterior possa compensar parcialmente a privação nunca poderá reverter a totalidade, porque ocorreu numa fase irrepitível do desenvolvimento.

Na diabetes por exemplo, mesmo após o controle da glicémia, os efeitos adversos sobre o endotélio vascular mantêm-se por muitos anos.

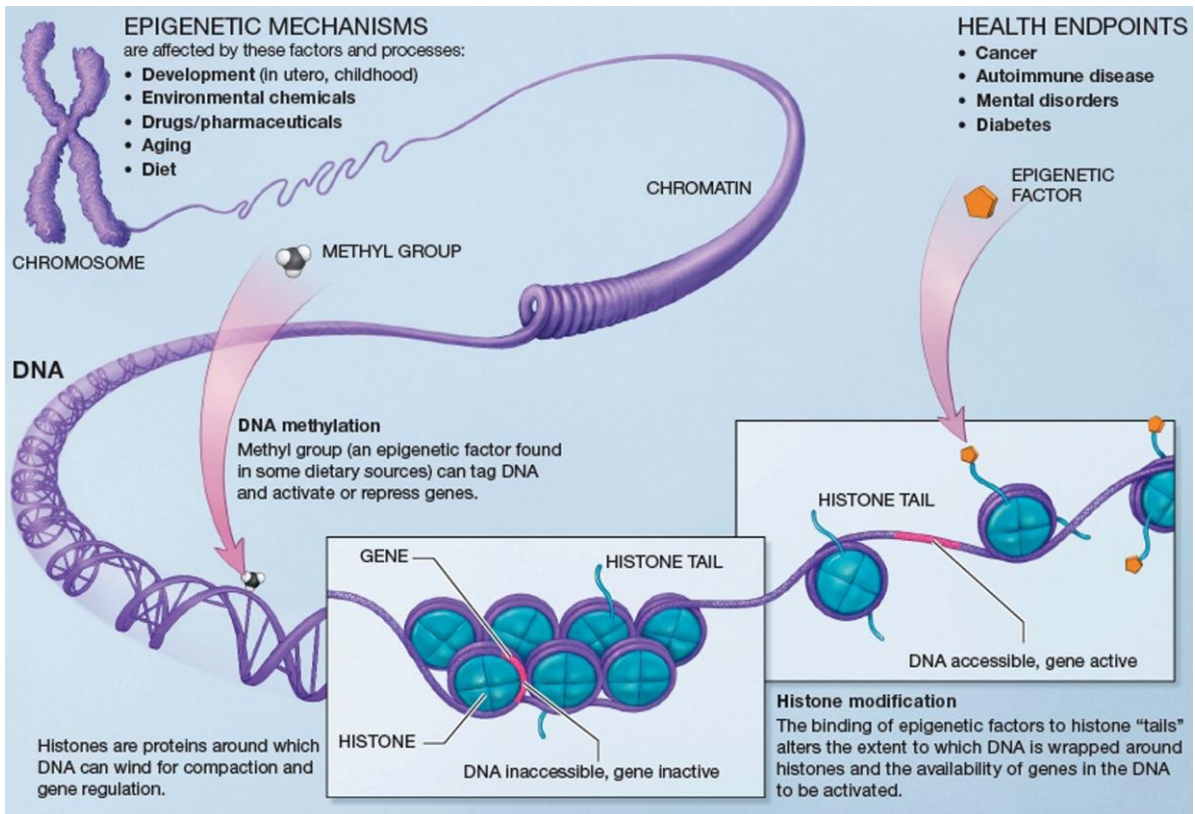


Fig 10 – Mecanismos epigenéticos (Powledge, T.M. Bioscience; 61:588-592. 2011)

A este fenómeno chama-se memória metabólica e, estudos animais levam a suspeitar que a causa é uma alteração epigénica nas células endoteliais dos vasos. (Siebel et al. – 2010).

Existem áreas recentes de investigação focadas nos mecanismos ambientais capazes de desencadear mudanças da biologia molecular que por sua vez modificam o funcionamento das células cerebrais. Ou seja, factores ambientais podem ser determinantes do comportamento (*Behavioral epigenetics*) e no conceito de ambiente engloba-se tudo aquilo a que a célula pode estar sujeita desde a nutrição, as hormonas, a exposição a tóxicos ou às próprias experiências sociais que ocorrem tanto na vida pré-natal como pós natal e tardia. Na génese da aprendizagem e da memória, e consequentemente do comportamento geral do indivíduo, estão envolvidos muitos destes mecanismos epigenéticos.

A noção de epigenética dos cuidados parentais emergiu há cerca de duas décadas quando se demonstrou (Meaney, M. - 2001) que a qualidade dos cuidados maternos precoces era capaz de influenciar a resposta dos ratos adultos ao *stress*, devido aos efeitos sobre recetores de glucocorticoides no hipocampo.

Experiências em ratos revelaram que bloqueando a acetilação das histonas, se interferia na génese de algumas memórias nomeadamente memórias de medo induzidas experimentalmente. Um exemplo conhecido é o disruptor endócrino bisfenol A, que altera a metilação do ADN e promove alterações significativas em animais sobretudo ao nível da memória, da aprendizagem e do comportamento. Sob a ação desta substância, as crias tornam-se mais ansiosas e receosas de novas experiências e as suas mães revelam-se piores cuidadoras. Quando os machos eram submetidos ao Bisfenol A bem como a outras toxinas, também surgiam alterações comportamentais na descendência mesmo que a exposição tivesse sido anterior ao acasalamento. A exposição dos ratos machos ao álcool por exemplo, gera descendentes com menor orientação espacial, mais agressivos e mais ansiosos do que os descendentes de animais sem tal exposição. Ratos expostos à cocaína têm filhos com cérebros mais pequenos, défices de atenção e menor memória de trabalho. Os machos que foram expostos a tóxicos durante o seu próprio desenvolvimento embrionário, transmitem defeitos associados às mudanças epigenéticas sobretudo relacionados com a metilação do ADN.

Alguns investigadores, nomeadamente do laboratório de Frances Champagne na Universidade de Columbia em Nova Iorque, demonstraram que as experiências sociais podem induzir mudanças epigenéticas. A descendência das mães melhor cuidadoras revelou menos distúrbios de ansiedade em vários estudos e, num dos artigos consultados sobre este tema, a autora diz com sentido de humor e muito a propósito do nosso trabalho que: «*If research on epigenetics is in its infancy, research on behavioral epigenetics is in embryo*» (Powledge, T.M. – 2011).

Concluimos reforçando que as experiências precoces podem modelar o comportamento animal e até a vulnerabilidade às doenças na idade adulta e esta relação poderá ser devida às mudanças génicas induzidas pelos mecanismos epigenéticos (Curley, J.P, Jensen, C.L. – 2011). O recurso crescente à PMA pode vir a alterar irreversivelmente características humanas, porque os seres vivos e o ambiente interagem entre si. Tal facto, legítima e valoriza a nossa preocupação e investigação sobre os

riscos a que são submetidas as crianças artificialmente concebidas. O conhecimento de alguns factores que hoje nos parecem negligenciáveis, poderá vir a revelar-se crucial com o avanço da Ciência e permitirá antever e alterar algumas condições futuras. (Saul, R.A. – 2013).

Tal como a circunstância de os homens nascerem iguais, nos parece meramente filosófica, também sentimos que a hipótese de se poderem vir a conhecer e controlar todos os factores epigenéticos decorrentes das tecnologias da PMA é muito pouco promissora!

2.4.3 – PMA e desenvolvimento infantil – conhecimentos actuais

2.4.3.1 - Introdução

Quando numa FIV se consegue a indispensável junção dos gâmetas, já houve um longo percurso e inúmeras interferências nos mecanismos naturais que podem influenciar os resultados. Os embriões humanos, em fase pré implantatária, são muito vulneráveis às condições artificiais a que estão submetidos (ERSHE - 2009) e das quais realçamos: a idade e os tratamentos hormonais a que a mãe foi submetida, os meios de cultura utilizados, ter havido ou não criopreservação, o tipo de aquecimento e de micro pipetas utilizadas entre muitos outros factores (Rato M.L., et al.- 2012). Os efeitos das diversas condições laboratoriais sobre o metabolismo embrionário, mereceriam mais investigação mas há razões técnicas e até bioéticas que dificultam tal abordagem:

- Há poucos embriões disponíveis para investigação.
- Não existem modelos *in vivo* que sejam equiparáveis, porque os modelos animais, embora semelhantes, não permitem extrapolar conclusões porque simplesmente não são humanos.
- Cada embrião é muito diminuto, possuindo apenas 55 – 60 nano grama de substância seca, o que impõe dificuldades técnicas.

Embora saibamos que irão ser necessárias várias gerações para se conhecerem os efeitos tardios da PMA no organismo humano, pode antecipar-se que no curto prazo e para todos os parâmetros avaliados, há um aumento da morbidade e da mortalidade comparativamente aos indivíduos concebidos naturalmente. No que respeita aos efeitos tardios e tendo presente a teoria da origem precoce das doenças adultas, já anteriormente citada como hipótese de Barker (Barker, D.J., - 2007), (Calkins, K., Devaskar, S.U. – 2011), impõe-se uma estreita vigilância e prudência relativamente às novas tecnologias.

Na demanda bibliográfica em que nos envolvemos, chamou-nos especialmente a atenção, um ambicioso projeto de investigação de origem norte americana (The National Children's Study Research Plan: A Review)⁷⁷ pelo seu carácter prospetivo planeado para as próximas décadas. O grupo multidisciplinar que projetou o estudo, propôs-se analisar as interações entre genes e ambiente, numa amostra de grandes dimensões. Como metodologia, o grupo de trabalho pretende acompanhar a saúde e o desenvolvimento de cerca de 100 mil crianças norte americanas de diversas origens, desde a conceção até aos 21 anos, tentando identificar factores ambientais, físicos, étnicos, biológicos, culturais e psico sociais que possam ser preditivos da saúde e desenvolvimento futuros.

Os autores do projeto estão a prever avaliar o impacto das condições pré concepcionais, acompanhando futuras mães e prosseguindo com a análise dos seus filhos. Entre os factores de impacto relacionados com a gravidez e designados «*pregnancy outcomes*», incluíram as tecnologias da PMA. O grupo de trabalho valorizou o contributo da Medicina da Reprodução e previu analisar a sua relação com os índices de prematuridade, com a restrição de crescimento intrauterino e com as alterações do desenvolvimento, revelando a atenção que estes aspectos suscitam. Os autores justificam o seu interesse, com o facto de a PMA ser responsável pelo nascimento de 1 a 5 por cento dos indivíduos na população que vão estudar, e poder vir a contribuir para evoluções desfavoráveis, de grupos populacionais específicos.

Nos Estados Unidos, à semelhança da generalidade dos países (incluindo Portugal), também se tem verificado um registo insuficiente dos dados clínicos, de

⁷⁷ The National Children's Study Research Plan: A Review, in <http://www.nap.edu/catalog/12211.html>

acordo com a opinião do grupo de investigadores. São exemplos desse facto as seguintes lacunas informativas:

- Ausência duma referência sistemática às perdas fetais ou ao número de embriões implantados, o que permitiria calcular o índice de sucesso das técnicas de PMA utilizadas num determinado caso.
- A convicção de que não irá ser possível avaliar o impacto das drogas promotoras da fertilidade, porque o seu uso muitas vezes não é revelado.
- A escassez de dados relativos às características das instituições e dos profissionais envolvidos, bem como dos factores individuais.

Entre os temas desta investigação, existirá uma área referente à hipótese, bibliograficamente bem suportada, de que uma exposição adversa, em períodos críticos da gravidez ou da primeira infância, pode interagir com o genótipo, causando ou modulando problemas de comportamento na infância (*Exposures to adverse psychological, chemical, and physical environments and other stressors during vulnerable periods of pregnancy and early childhood can interact with genotype to cause or modulate behavioral problems in childhood...*).

Os autores daquele ambicioso estudo reconheceram, que estabelecer metodologias que relacionem os efeitos das técnicas da PMA com o neurodesenvolvimento infantil, requer uma avaliação abrangente e por vezes difícil de quantificar. Há uma multiplicidade de factores envolvidos no desenvolvimento infantil, aos quais só é possível aceder de forma parcial e, desse facto, também tivemos profunda noção no decorrer da investigação que realizámos.

2.4.3.2 - Efeitos da PMA na embriogénese

A PMA estabelece importantes diferenças relativamente à fecundação natural, e este processo terapêutico tem início muito antes da concretização da FIV. A subfertilidade parental está identificada como fator de pior prognóstico em todos os estudos (Pinborg A. – 2009) e acresce que aqueles que recorrem à Medicina da

Reprodução também diferem da média da população, sobretudo no que respeita à idade, o que necessariamente afeta os resultados.

Sendo a hereditariedade um fator de risco independente para o crescimento embrionário, acredita-se que a elevada percentagem de insucesso da PMA derive mais dos tratamentos do que dos factores hereditários. Tal distinção é no entanto difícil de estabelecer e os resultados tanto poderão refletir a qualidade dos gâmetas de pais sub férteis, como serem resultado das técnicas usadas ou do somatório destes factores.

A somar às diferenças impostas pelos tratamentos, há etapas importantes da concepção natural que são ultrapassadas e que estabelecem diferenças a ter em conta. No caso feminino há sempre uma estimulação hormonal prévia, a que se segue uma colheita cirúrgica que expõe os ovócitos à luz visível, às flutuações de temperatura, bem como às micromanipulações e aos componentes dos meios de cultura artificial.

Com frequência os ovócitos também são submetidos à ICSI o que constitui nova e importante agressão mas, ao mesmo tempo, elimina algumas dificuldades que a natureza impõe aos gâmetas e que poderiam ter um papel importante na seleção dos mais aptos. A FIV por exemplo, priva os espermatozoides da travessia do trato genital feminino, e da competição pela entrada no ovócito, que são etapas determinantes no meio natural. (Cortessis K.V. et al. – 2012).

Uma elevada percentagem de **anomalias congénitas** ocorre nas gestações que não evoluem e, questiona-se, se algumas patologias aparentemente aumentadas no âmbito da PMA, não serão somente atribuíveis às características genéticas dos progenitores. A análise sobre se a PMA aumenta de facto o risco de malformações, poderá levar o tempo de uma ou duas gerações e nunca menos de 25 anos (Hansen et al., 2005), (Rimm et al., 2012) porque o que se está a avaliar é o aumento dum risco que, na origem, é pequeno.

Foi publicada uma revisão oriunda da Universidade de Kyoto, no Japão (Shiota, K., Yamada, S., - 2009), onde foram comparados estudos animais e humanos sobre a evolução de gestações artificialmente concebidas e se discutiram os riscos de «*imprinting*» genético ocorridos em fases muito precoces. A manifestação de certas patologias depende, como sabemos, do estado de metilação dos cromossomas e a infertilidade e as tecnologias de fertilização já tinham sido associadas a uma maior incidência de doenças raras de *imprinting* genético devidas às alterações do ADN por si induzidas (Amor e Halliday – 2008). Para algumas situações até já existem testes de

rotina e um dos exemplos mais citados é o das deleções, que estão na origem tanto do Síndrome de Prader-Willi como do Síndrome de Angelman, as quais são distintas mas envolvem múltiplos genes do cromossoma 15.

O Síndrome de Prader-Willi tem origem paterna e ocorre quando existe uma deleção na região de *imprinting* herdada do pai mas a região materna correspondente, beneficiou dum *imprinting* normal, isto é, foi silenciada. O Síndrome de Angelman ocorre quando há uma deleção da região de *imprinting* do cromossoma materno e, na região homóloga herdada do pai houve *imprinting* normal.

Outra doença rara causada por este tipo de mecanismos e mais frequente na descendência de casais que recorreram à PMA, é o Síndrome de Beckwith-Wiedemann. Nesta doença, há uma falha no *imprinting* do gene que codifica o fator de crescimento 2, idêntico à insulina, que não é suprimido nem metilado. Surge uma desregulação que permite que os alelos maternos e paternos se expressem em simultâneo, originando um crescimento excessivo (macrossomia) no portador da anomalia. Além destas três doenças têm sido identificadas outras, que igualmente se revelam mais frequentes na descendência de progenitores submetidos a técnicas de fertilização.

De entre as patologias mais conhecidas relacionadas com mecanismos epigenéticos e anomalias de *imprinting*, e conseqüentemente mais vezes encontradas na descendência de progenitores submetidos a PMA, incluem-se: o Síndrome de X frágil, algumas situações do espectro do autismo, a associação CHARGE, a duplicação 15q11-13 de origem materna, a síndrome metabólica, o síndrome de Rett, o síndrome de Silver Russel, o síndrome de Turner, o coloboma, algumas doenças cardíacas congénitas, situações que decorrem com atresia das coanas, anomalias genitais, malformações do pavilhão auricular e de perda auditiva ou outras com atraso mental e estatura ponderal. Por razões ainda mal conhecidas, muitos dos genes implicados nestas anomalias, codificam proteínas que regulam quer o crescimento, quer o comportamento humano. Em ratos já foram identificados mais de 1300 destes genes e suspeita-se que o seu papel seja ainda mais determinante do que aquilo que atualmente conseguimos comprovar (Dulac, C. – 2010). Em humanos conhecem-se cerca de 100 genes ligados ao *imprinting* e muitos deles possuem uma expressão fundamental no funcionamento cerebral. Um exemplo dramático destes efeitos sobre o crescimento, o metabolismo e o

armazenamento de gordura fetal, foi publicado em janeiro de 2011 quando foi identificado o «*growth factor receptor-bound protein 10 (Grb10)*⁷⁸».

Provou-se que se o alelo materno do Grb10 estivesse silenciado, as crias seriam maiores e mais pesadas. A questão sobre se estas alterações epigénicas são transmitidas de forma estável (e mantidas ao longo das divisões celulares) ou se são repostas a seguir à mitose, mediante outra fonte informativa ainda desconhecida, permanece um assunto de intenso debate.

⁷⁸ Gene ID: 2887 - codifica um factor de crescimento que interage com os receptores da insulina e das moléculas *insulina-like*. Se houver produção excessiva há inibição da tirosina quinase e supressão do crescimento. Este gene sofre imprinting tecidual e possui várias isoformas. No tecido cerebral as proteínas são exprimidas a partir do alelo paterno mas ao nível da placenta prevalece o alelo materno, existindo outras variantes em diferentes tecidos. Em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2887>

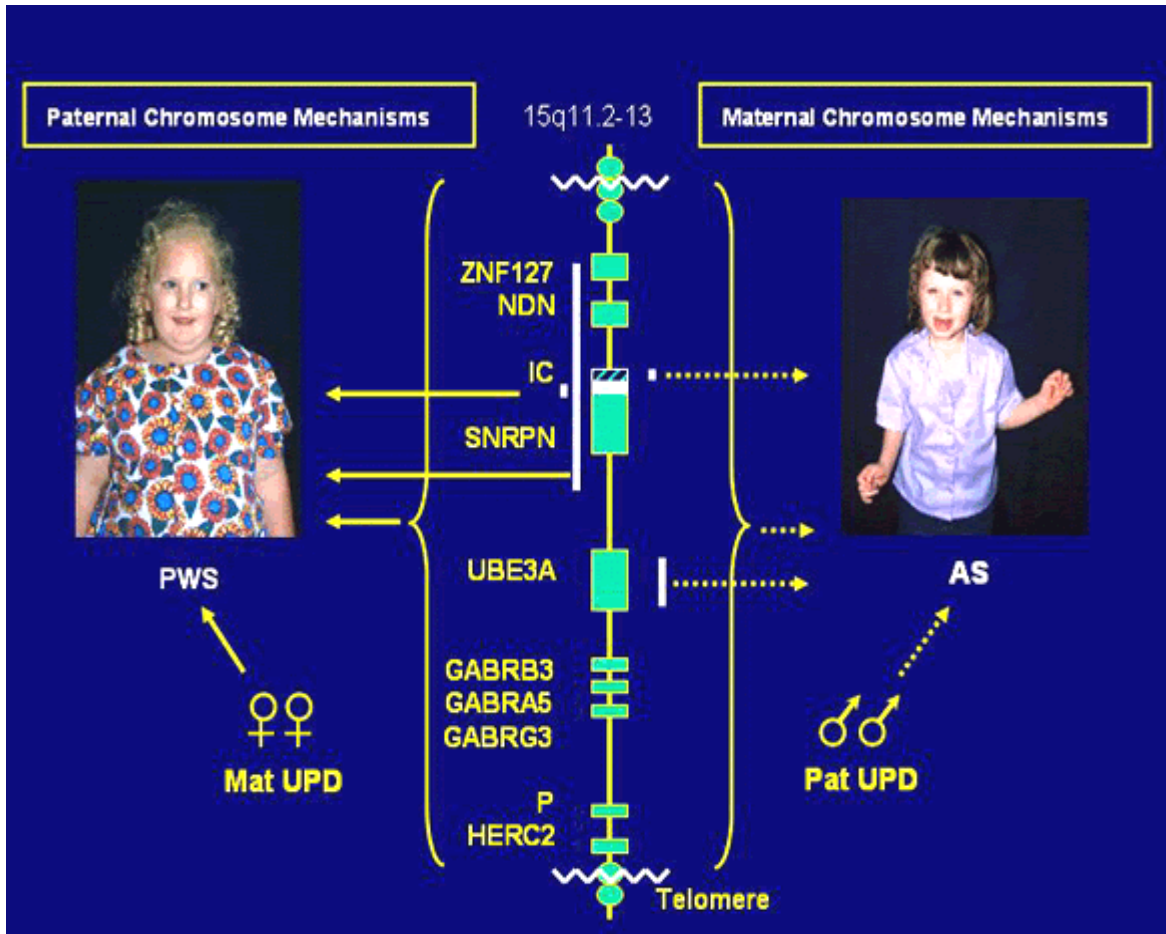


Fig. 11 - O síndrome de Prader-Willi (SPW) é determinado pelo pai e o Síndrome de Angelman (SA) tem origem materna. Clinicamente as diferenças são enormes: os doentes com SPW são obesos e hipotônicos e os doentes com SA tendem a ser magros, hiperativos com grave atraso mental e ausência de linguagem. A alteração do ADN ocorre na mesma região do cromossoma 15 mas há um contraste, conforme a origem do gene mutado é materna ou paterna, sendo que o SA é bastante mais grave⁷⁹.

⁷⁹ Em <http://dhsgenetics.wikispaces.com/Sex>

A comparação entre gémeos constitui um bom modelo de investigação porque os gémeos monozigóticos partilham à partida um genótipo igual. Como a gemelaridade, só por si, não se associa a anomalias de *imprinting genético*, o estudo destes casos permite isolar muitos dos factores ambientais. Há situações aparentemente inexplicáveis, de gémeos univitelinos (monozigóticos) com mutação para doenças autossómicas dominantes ou recessivas, com penetrância completa, que mostram fenótipos diferentes. Sabe-se hoje que os casos de gémeos monozigóticos fenotipicamente divergentes, são o resultado do meio envolvente sobre os factores epigenéticos, que afetam a expressão do genótipo (Ollikainen, M., Craig, J.M. – 2011), (Loke, Y.J., Novakovic, B., Ollikainen, M., et al. – 2013). Uma situação idêntica é a que ocorre com a metilação em alguns genes supressores de diversos tumores, em que há uma expressão fenotípica alterada, em células cujo genótipo era inicialmente igual.

Após a fertilização, os embriões são mantidos em meios artificiais e hipoteticamente vantajosos, onde prosseguem um breve desenvolvimento. A incorporação celular duma molécula exige menos dispêndio de energia do que a sua síntese mas, mesmo em condições pretensamente otimizadas, o metabolismo embrionário *in vitro* fica reduzido e surge uma aceleração do *turnover* proteico e uma diminuição da função das mitocôndrias. Por mais que se tente equilibrar e enriquecer os meios de cultura, seja em açúcares, aminoácidos, lípidos ou outros nutrientes, nunca se consegue igualar a composição ou a qualidade dos meios de transporte naturais. Sabendo que os meios de crescimento, sejam eles naturais ou artificiais têm ação direta sobre a transcrição e a tradução do ADN, podem inferir-se as consequências destas alterações do equilíbrio natural.

Após um período de crescimento *in vitro*, os embriões que sugerem possuir vantagens biológicas são selecionados para a transferência, estabelecendo-se deste modo um processo de seleção que é totalmente artificial. Sendo as condições da FIV tão facilitadoras, seriam de esperar melhores resultados mas a verdade é que o sucesso é reduzido quando comparado com a reprodução natural (Jones, C.A. – 2011).

Há poucas publicações sobre os efeitos dos meios laboratoriais no desenvolvimento embrionário, mas há factos muito curiosos. A determinação do sexo por exemplo, não é igual em todas as espécies e, em alguns répteis, a temperatura a que

os ovos são incubados, determina o sexo dos descendentes. Alguns peixes também mudam e reverterem de género, conforme as condições ambientais mas na espécie humana o sexo é determinado geneticamente.

O **ratio macho/fêmea** é de 100 fêmeas para 107 machos ao nascer (48,3% versus 51,7%)⁸⁰ com valores praticamente constantes em todo o mundo. No artigo de Maalouf W.E., et al. publicado no «Journal of Fertility and Sterility» em 2014 e reportando dados da análise de 100 mil crianças nascidas no Reino Unido com PMA, entre 2000 e 2010, verificou-se que na FIV clássica, a proporção de machos é de 52,1%, enquanto na ICSI o valor desce para 49,3%. Mais surpreendente é que o momento da transferência também afecta estes valores e, se a mesma for feita no estadio de blastocito, tanto na ICSI como na FIV, o número de machos aumenta 6%. Estas diferenças poderão ter impacto a longo prazo (Glujovsky D., - 2014) porque, existe e tem sido bem documentada, uma desvantagem do sexo masculino, em relação à sobrevivência e à morbilidade perinatal. Não se conhecem os mecanismos biológicos da desvantagem masculina ou da vantagem feminina. Esta seleção natural pode funcionar contra o sexo masculino ou a favor do sexo feminino (o segmento populacional mais importante para a procriação e manutenção da geração seguinte) e, a verdade é que a natureza parece compensar os nascimentos masculinos com uma vantagem numérica (Cunningham, F.G., MacDonald, P.C., et al., - 1997).

Relativamente à influência de factores precoces sobre outros aspectos da evolução, um estudo holandês (Dumoulin, J., et al. 2010) veio confirmar que pelo menos nos fetos únicos, a composição dos meios de cultura afeta, entre outras características, o peso ao nascer. Os autores verificaram que o peso médio dum grupo incubado num determinado meio de cultura, superou em 250 gramas o peso de outro grupo, em que se usou um meio diferente, sendo esta diferença estatisticamente significativa.

Na busca de mais respostas para as dúvidas existentes, têm surgido importantes estudos em publicações de grande impacto científico, Em janeiro de 2013 foi publicada uma meta análise de origem australiana (Hansen, M., Kurinczuk, J., - 2013) que avaliou 45 estudos seleccionados e de *coorte*, provenientes de vários países e oriundos de bases

⁸⁰ De acordo com o Banco Mundial

de dados reconhecidas, em que os autores também concluíram que as malformações congênitas são significativamente mais frequentes quando há PMA. De acordo com estes estudos, a incidência de malformações superou em 32% a das crianças naturalmente concebidas e o risco é maior nos fetos únicos em que chega a atingir 36%.

É importante salientar que a verdadeira incidência de alterações é impossível de quantificar, porque muitos embriões transferidos não evoluem e a gemelaridade monozigótica também é frequente, quando a transferência é precoce. O que se tem observado é que na PMA existe um aumento das doenças ligadas aos processos de *imprinting*, tanto de origem materna como paterna, embora ainda não se saiba se os defeitos moleculares encontrados são maioritariamente de origem genética ou epigenética.

Aos efeitos dos tratamentos, junta-se a herança genética e a patologia subjacente dos progenitores, o que favorece a dúvida sobre se serão determinados fenótipos que causam alterações específicas, ou se serão determinados factores ambientais que causam alterações epigenéticas, que depois originam diferentes fenótipos. Uma exceção a esta dificuldade de estabelecer causalidade, relaciona-se com a passagem comprovada de factores epigenéticos dos espermatozoides para as células somáticas da placenta e do embrião no Síndrome de Prader-Willi ligado à dissomia paterna.

Além das perdas embrionárias precoces, há um aumento dos problemas gestacionais e das malformações fetais, ainda que a maioria das crianças concebidas artificialmente seja aparentemente saudável, e não se tenha provado que todas as alterações encontradas sejam consequência das tecnologias da PMA (Skora, D. - 2012). Terão de ser feitos mais estudos focados não apenas no *imprinting* genómico mas também nos erros induzidos em loci não *imprinted*, para que se possam avaliar alguns efeitos do ecossistema.

São necessários mais estudos que permitam isolar a relação entre a PMA e os problemas encontrados nas crianças assim concebidas e compará-los com as características e o estado epigenético dos que foram concebidos naturalmente, e também possuem as mesmas alterações. (Lee et al. - 2012).

2.4.3.3 - Implantação natural do embrião

A implantação é o processo pelo qual o zigoto adere ao endométrio e é independente da intervenção médica (fig.12). No caso do embrião humano, esta fase tem início no 7º dia após a fertilização e conclui-se por volta do 14º dia. Se houver transferência ao 3º dia, os embriões desenvolver-se-ão na cavidade uterina até ao 8º dia, altura em que irão penetrar na espessura do endométrio e prosseguir o seu desenvolvimento (APF)⁸¹.

Num estudo em que se investigou a influência dos meios de incubação após o aquecimento, na sobrevivência dos blastocistos criopreservados, verificou-se que períodos mais curtos de incubação estavam associados a maiores índices de implantação.

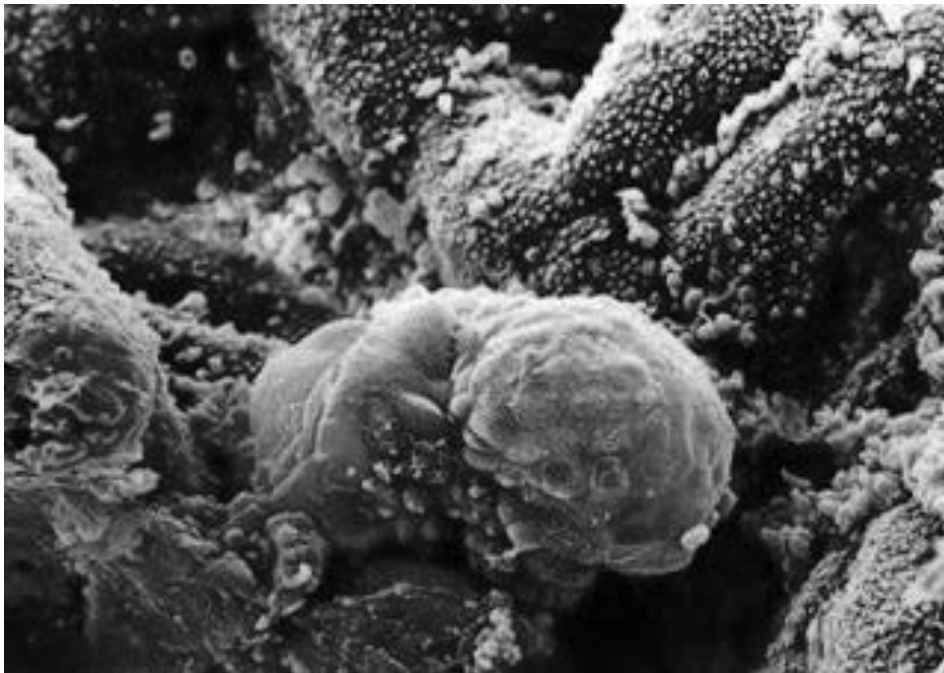


Fig. 12 – Embrião de 5 dias ou blastocisto (em fase pós transferência e pré implantação)⁸²

⁸¹ <http://www.apfertilidade.org/web/tecnicas-de-reproducao/134-fecundacao-in-vitro-fiv>

⁸² <http://procriacaomedicamenteadministrada.blogspot.pt/2012/01/fases-da-fertilizacao-in-vitro.html>

Comparando as exigências técnicas da PMA com a magnífica simplicidade da natureza, não podemos deixar de nos interrogar sobre se toda esta perturbação dos mecanismos naturais não irá afectar a integridade dos seres humanos assim concebidos, bem como os seus futuros descendentes acabando deste modo, por ter custos futuros que envolverão toda a sociedade.

2.4.3.4 - Efeitos da PMA na nidação, placentação e crescimento fetal

Sabe-se que as maiores complicações ocorrem no início da gravidez e o número de perdas chega a atingir 25 a 30% em todas as gestações (Gray RH, Wu L.Y., - 2000), (Schieve LA, Tatham L., - 2003) ainda que muitos destes problemas não cheguem sequer a ser diagnosticadas. Depois da presença de anomalias cromossómicas, a implantação do embrião é um dos passos mais críticos na evolução da gravidez porque os riscos relacionados com a nidação e a placentação, são determinantes (Edwards RG – 2006), (Vitiello D, Patrizio P. – 2007).

Não existe uma relação bem estabelecida entre os procedimentos da PMA e determinadas complicações, deixando que muitas hipóteses permaneçam em aberto. Sabe-se porém que as mulheres submetidas a tratamentos de infertilidade desenvolvem mais complicações relacionadas com a implantação embrionária, tais como a pré eclâmpsia, a placenta prévia, o descolamento de placenta ou um deficiente crescimento fetal. Mesmo que sejam feitos ajustes dos cálculos para a idade materna e paridade, surgem mais problemas nas grávidas em que houve recurso à PMA bem como um maior número de malformações e de encefalopatia nos seus filhos (Helmerhorst et al., - 2004), (Jackson et al., - 2004), (McGovern et al., - 2004), (Mcdonald et al., - 2009), (Kallen et al., - 2010 a, b, c), (Sazonova et al., 2011 a). Também se verificou que a estimulação ovárica cautelosa e as transferências mais seletivas (feitas de preferência com embriões únicos) conduzem a melhores resultados, embora as desvantagens em relação à gravidez espontânea se mantenham (Finnstrom et al., - 2011).

Tal como acontece na procriação natural, entre as crianças concebidas artificialmente também se estabelecem assimetrias e, para melhor sistematização, podemos dividir os efeitos adversos da PMA em 2 grandes grupos:

- Defeitos congénitos ocorridos durante a fertilização e fase pré implantatária.
- Alterações da nidação, placentação, crescimento intrauterino e eventos perinatais.

Na FIV clássica e com fetos únicos há mais prematuridade do que com ICSI (criopreservados ou não) e os resultados foram estatisticamente significativos em pelo menos um estudo (Ombelet et al. – 2005). O trabalho de Wang et al. – 2005, também revelou melhor evolução na descendência de casais com infertilidade de origem masculina tratados com ICSI, comparativamente àqueles com infertilidade de origem feminina tratados com FIV clássica, demonstrando que a saúde reprodutiva do elemento feminino é determinante para os resultados. Note-se que, nos casos de ICSI, as mães são quase sempre saudáveis.

Partindo do pressuposto de que tanto as causas da infertilidade, como o período de tempo decorrido até ser conseguida uma gravidez parecem afetar a evolução pré e pós natal (Basso e Olsen – 2005), (Zhu et al., - 2006), (Zhu et al., - 2009), foi realizada uma comparação entre irmãos, em que um deles tinha sido naturalmente concebido e o outro não. Este estudo isolou os factores de prognóstico e evidenciou que há desvantagens para as crianças artificialmente concebidas, nomeadamente em relação ao risco de prematuridade (Aaris Henningsen et al., - 2011).

Na recente meta análise tão aguardada pela comunidade científica e realizada por Anja Pinborg e pela sua equipa nórdica (Pinborg A., et al. de 2013), as principais etapas da PMA foram analisadas e relacionadas entre si sendo os resultados comparados com os da procriação natural. Além da avaliação do impacto dos meios de cultura sobre as características embrionárias, foi estabelecida a relação dos resultados gerais com o dia da transferência intrauterina e o número de embriões transferidos.

Através duma meta análise foram comparados fetos únicos de FIV/ICSI transferidos na fase de blastocisto (dia 5) versus fetos únicos de FIV/ICSI transferidos na fase de clivagem (dia 2) tendo-se comparado vários subgrupos da PMA com a população geral de acordo com os seguintes princípios:

- 1) Resultados gerais de fetos únicos de FIV/ICSI (de ciclos a fresco ou criopreservados) versus fetos únicos da população geral.
- 2) Efeitos da subfertilidade e do tempo de espera pela gravidez em diversas situações:
 - a) fetos únicos com tempo de espera superior a um ano, versus fetos de gestação espontânea de mães férteis com tempo de espera igual ou inferior a 1 ano.
 - b) fetos de FIV/ICSI, versus fetos de gestação espontânea de mães sub férteis com tempo de espera superior a 1 ano.
 - c) pares de fetos sucessivos, em que um nasceu com PMA e outro de forma espontânea.
- 3) Efeitos da estimulação ovárica controlada sobre os fetos únicos, mediante a comparação de:
 - a) fetos nascidos após estimulação ovárica e/ou inseminação intrauterina ou FIV/ICSI versus fetos de gestação espontânea de mães férteis, com tempo de espera igual ou inferior a 1 ano.
 - b) fetos nascidos após estimulação ovárica ligeira (estimulação ovárica controlada) ou ciclo natural modificado, versus fetos únicos de gestação espontânea de mães sub férteis, com tempo de espera superior a 1 ano.

Os autores deste importante trabalho de análise referiram, entre várias outras questões, que existem poucos estudos que associem a evolução perinatal, com a dose de gonadotrofinas usadas na estimulação ovárica ou com o número de ovócitos assim obtidos. Um dos estudos integrado na revisão americana, avaliou fetos únicos e gémeos e encontrou uma associação desfavorável entre a hiperestimulação ovárica e a evolução perinatal (avaliada pelos índices de prematuridade e de baixo peso) mesmo após ajuste dos factores de enviesamento. Porém, o síndrome de hiperestimulação ovárica não se associou a pior evolução de forma estatisticamente significativa, no caso dos fetos únicos.

Um estudo integrado nesta meta análise e proveniente da Austrália, mostrou ter encontrado mais defeitos congénitos major originados durante a blastogénese, e com

uma incidência que variava conforme tivesse havido ou não criopreservação (Halliday et al., 2010). A preocupação sobre se **os meios de cultura utilizados e a duração da criopreservação** estarão a ter impacto negativo nas crianças assim concebidas mantém-se, mas nas situações em que houve apenas indução farmacológica da ovulação, também houve um aumento de prematuridade, o que levanta renovadas questões.

A estimulação ovárica dá origem a mais do que um corpo lúteo e, esse facto, tem implicações endócrinas porque interfere nas etapas precoces da implantação e da placentação. As transferências de embriões criopreservados oferecem maior semelhança com os ciclos naturais, ao contrário do que acontece nas transferências a fresco, em que é feita estimulação ovárica. Aquele menor risco deriva do facto de ocorrer uma fase lútea que se assemelha ao ciclo natural, e a qual vai exercer efeitos favoráveis quer sobre o endométrio quer sobre a fase precoce de implantação.

Relativamente à prematuridade não existem evidências suficientes sobre se as características do meio ou o tempo de cultura influenciam a sua ocorrência. Em estudos multicêntricos alargados, as transferências feitas na fase de blastocisto pareceram acarretar maiores índices de prematuridade e de baixo peso quando comparadas com os resultados obtidos após as transferências em fase de clivagem (Kalra S.K., - 2012).

A relação entre o **número de embriões transferidos** e os resultados da PMA, foi avaliada do seguinte modo:

- Fetos únicos de transferência seletiva dum único embrião, versus fetos únicos em que houve transferência de dois embriões (transferidos a fresco ou criopreservados) versus fetos únicos da população em geral. Permaneceu a dúvida sobre um aumento de prematuridade nos fetos únicos em que houve transferência dum único embrião relativamente à população em geral e do risco aumentado de prematuridade nos fetos únicos em que houve transferência de dois embriões.
- Fetos únicos resultantes da morte de um gémeo (*vanishing co-twin*) versus fetos únicos desde início. Todos os estudos reportam piores resultados quando há morte de um dos gémeos (evidência A).

Nas páginas seguintes e ainda com base nesta meta análise de 2013, fazemos uma súmula dos conhecimentos atuais, sobre alguns efeitos da PMA na embriogénese e desenvolvimento infantil. Estudos ainda mais recentes de origem dinamarquesa sobre a evolução da Medicina da Reprodução ao longo dos últimos 20 anos (CoNARTaS group – 2015), reafirmaram uma melhoria progressiva dos resultados, traduzida por uma menor incidência de prematuridade e de gemelaridade monozigótica, apesar de permanecerem as desvantagens relativas à procriação natural.

2.4.3.5 – Efeitos conhecidos da criopreservação embrionária

A partir de 1984 conseguiram-se os primeiros casos bem-sucedidos de criopreservação embrionária humana e a possibilidade de manter por tempo indeterminado embriões gerados mas não utilizados. Apesar das enormes vantagens, verifica-se contudo, que tanto a criopreservação como o descongelamento podem induzir importantes alterações celulares. Numerosos estudos com embriões de mamíferos evidenciaram riscos objetiváveis ainda que muitos só se manifestem tardiamente (Dulioust et al., 1995).

Nos estudos pioneiros de Wennerholm U.S. et al. (1997) e Aytöz et al. (1999) não se identificaram diferenças relativamente aos índices de prematuridade, restrição de crescimento ou morte intrauterina, entre crianças cuja fecundação ocorreu naturalmente ou em que houve FIV com transferência a fresco ou criopreservação. Estudos posteriores, muitas vezes envolvendo os mesmos grupos de investigação, mas alargando as amostras e os períodos estudados, identificaram diferenças de resultados. Na Dinamarca (Pinborg A., - 2009) país com grande experiência e onde a PMA é responsável por 3,5% do total de nascimentos, realizou-se um estudo que avaliou o neurodesenvolvimento pediátrico a partir dos registos nacionais de saúde infantil. Foram incluídas 957 crianças nascidas de gravidez única, entre 1995 e 2006 e cujos embriões estiveram criopreservados. A análise limitou-se às taxas de prematuridade e baixo peso, malformações congénitas, morbilidade major e mortalidade. O resultado mais relevante e inesperado, decorreu do facto dos indivíduos cujos embriões estiveram criopreservados (na amostra analisada) terem tido melhor evolução (relativamente aos

parâmetros estudados) do que aqueles cujos embriões foram transferidos a fresco, embora fosse inferior aos resultados das crianças concebidas naturalmente.

Num conhecido estudo multicêntrico realizado na Bélgica (Belva et al. – 2008) foram comparadas crianças nascidas com recurso a ICSI e a FIV, em que umas foram submetidas a criopreservação e outras não. A análise retrospectiva de registos clínicos envolveu 937 crianças anteriormente submetidos a criopreservação e divididas em dois grupos sendo um relativo à ICSI (entre 1993 e 2006) e outro à FIV clássica (entre 1986 e 2006). Os resultados foram depois comparados com os de 2889 crianças cujos embriões foram transferidos a fresco após ICSI (1991-1999) e com os de 2995 crianças após FIV clássica (1983-1999) recrutadas a partir de estudos similares (Bonduelle e tal., 2002a,b). Repare-se no espaço de tempo abrangido neste estudo e na sua enorme dimensão. O período de tempo alargado pode ter conduzido a comparações entre realidades distintas. Os autores compararam os resultados referentes à evolução neonatal das crianças nascidas por ICSI e por FIV clássica, versus outras de transferência a fresco. Ou seja Belva et al. compararam os resultados e a evolução, incluindo a análise dos cariotipos de ambos os grupos. Nestas populações estudadas, ultrapassado o risco de aborto do primeiro trimestre, verificaram-se os seguintes diferenças:

- A criopreservação associou-se a menos partos a pior evolução geral, o que poderá refletir efeitos negativos da técnica ou menor seleção dos embriões (relativamente à seleção feita nas técnicas a fresco) mas a evolução dos fetos únicos com criopreservação não foi inferior à dos fetos cujos embriões foram transferidos a fresco.
- Nos gémeos do grupo da ICSI e criopreservados houve menos casos de baixo peso e de prematuridade do que nos nascidos após FIV clássica.
- Os recém-nascidos de embriões transferidos a fresco tiveram valores antropométricos inferiores aos dos grupos crio-ICSI e crio-FIV que foram comparáveis entre si. Esta diferença pode ser explicada por haver mais gémeos nas transferências a fresco (os gémeos são em média mais leves e mais pequenos do que os fetos únicos).

- Foi encontrado um número de malformações major duas vezes superior no grupo crio-ICSI, quando comparado com o grupo crio-FIV ou com o grupo ICSI de transferência a fresco. Ou seja, a evolução após uma ICSI foi idêntica à ocorrida após uma FIV, exceto por se ter encontrado um número superior de malformações no grupo crio-ICSI.
- Houve mais anomalias cromossômicas *de novo* nos grupos criopreservados, tanto ICSI como FIV, mas sobretudo na ICSI embora essa diferença não fosse estatisticamente significativa.
- Pode concluir-se que os grupos criopreservados evoluíram pior o que contrariou estudos publicados anteriormente.

Os autores belgas fizeram análises bibliográficas exaustivas neste estudo de dimensão considerável e recorreram a amostras homogêneas o que lhe conferiu robustez. Porém, dispuseram duma relativa escassez de dados, porque a maior parte dos estudos não vai além do registo das malformações, e dos aspectos mais gerais da saúde infantil até aos 6 meses. Verificámos assim que mesmo em estudos desta envergadura, se registam insuficiências metodológicas tais como a análise indistinta dos gémeos e não gémeos e uma avaliação superficial do desenvolvimento infantil, indo pouco além dos aspectos gerais e das “sequelas neurológicas” inespecíficas. Os autores justificaram e concluíram, à semelhança de muitos outros, que é necessário aprofundar a investigação e manter a vigilância sobre as consequências tardias das técnicas de criopreservação e descongelamento.

Em revisões mais recentes e focadas nos resultados da PMA, também prevalece a escassez de dados relativos à evolução (*outcomes*) e tal facto constitui uma preocupação muito real. A revisão de Wennerholm, U.B. et al. - 2009 citada anteriormente e que constituiu um notável trabalho de análise de centenas de artigos registados na PubMed, Cochrane e Embase entre 1984 e 2008, foi reveladora das dificuldades existentes na avaliação dos resultados sobre desenvolvimento infantil. Os autores desta revisão, selecionaram estudos com resultados de criopreservação oocitária ou embrionária. Os estudos sobre criopreservação em fases de clivagem, só eram incluídos se fossem feitos com grupos controle. No entanto, casos clínicos ou estudos publicados em inglês sobre criopreservação de blastocistos ou vitrificação de ovócitos e

respetivos embriões em fases de clivagem, foram todos incluídos, o que se justifica pela escassez de publicações sobre vitrificação. Dos 437 artigos selecionados sobre criopreservação na fase inicial da clivagem, só 21 é que possuíam os critérios mínimos de inclusão. Dos 990 artigos com casuística de criopreservação de blastocistos ou ovócitos só se encontraram 12 com critérios suficientes para integrarem a revisão. A maioria dos estudos rejeitados tinha falhas no seguimento infantil (*follow-up*), ou possuía dados partilhados por outras revisões, o que podia enviesar os resultados. Wennerholm, U.B. et al. concluíram que «*To date (2009), there are no follow-up studies of the growth and long-term health of children born after slow freezing/vitrification of blastocysts and oocytes*».

Tentando facilitar a comparação dos principais resultados citados, elaborámos um quadro remissivo (quadro 4) com os 12 principais estudos incluídos nesta revisão, dada a importância de que também se revestiram para a nossa investigação. Nas páginas seguintes apresentamos então os principais estudos incluídos na revisão de Wennerholm U.B. et al. – 2009, publicados entre 1984 e setembro de 2008 e registados na PubMed, Cochrane e Embase.

Ref. Bibliog.	Design do estudo e data	Crítérios	Áreas avaliadas e resultados	Comentário
SART (7 publicações de 1993 a 2000), USA	Estudos a partir de registos populacionais 1991-97	Nº de partos Criopreservados : 1719 (% únicos: entre 73 e 79) FIV fresco: 7353 (% únicos: entre 60 e 70) ICSI fresco: (1995-97) 4949 (63% únicos)	Defeitos congénitos em maior número	Sem referência aos métodos de criopreservação utilizados
Wada <i>et al.</i> (1994), Reino Unido	Estudo retrospectivo - amostra hospitalar, 1985-91	185 crio únicos, 86 crio gémeos, 12 crio trigémeos, 592 FIV fresco únicos, 288 gémeos FIV (144 partos), 81 trigémeos Fiv fresco	Parto pré termo, baixo peso, mortes fetais e perinatais e malformações major em maior número	Inclui transferência de blastocistos e embriões em fase inicial de clivagem. Glicerol e propanediol como crioprotectores
Sutcliffe <i>et al.</i> (1995a,b), Reino Unido	Estudo retrospectivo - amostra hospitalar, nascidos em 1989-94	68 crio únicos, 20 crio gémeos, 3 crio trigémeos, 83 controles (81 únicos e 2 gémeos de fecundação natural) <i>Follow-up</i> 1-5 anos	Prematuridade e desenvolvimento mental e neurológico Defeitos major e minor	Grupo controle sem indicar idade paterna e gemelaridade. Métodos de criopreservação não referidos
De Mouzon e Lancaster (1997)	Estudo a partir dos registos populacionais 1995	Crio: 2005 crianças FIV a fresco 19869 crianças ICSI a fresco: 3325	Malformações congénitas	Omitidos os índices de gemelaridade por técnica de PMA e a referência à criopreservação
Wennerholm <i>et al.</i> (1998), Suécia	Estudo retrospectivo a partir de amostra hospitalar , nascidos em 1990-95	Crio FIV 158 únicos e 97 gémeos FIV a fresco 160 únicos e 95 gémeos 156 concebidos naturalmente 156 únicos e 96 gémeos, <i>follow up</i> aos 18 meses	Crescimento e morbidade	Dados neonatais e congénitos do artigo de Kallen <i>et al.</i> (2005b). Embriões em fase inicial de clivagem. Usado propanediol (de Wennerholm <i>et al.</i> , 1997)
(Cont.)				

Westergaard <i>et al.</i> (1999) Dinamarca	Estudo baseado em registos populacionais 1994-95	Total 2245 crianças FIV (1913 FIV, 180 ICSI, 105 crio, 47 doação de oócitos, 2245 controlos de concepção natural)	Defeitos congénitos	Gémeos omitidos. Referido pretermos, baixo peso e mortes perinatais nos RNs PMA. S/detalhes da criopreservação
Schieve <i>et al.</i> (2002), USA	Estudo baseado em registos populacionais 1996-97	Total 42 463 (8,9% crio, 78,0% FIV a fresco sem doação de ovócitos, 18 408 únicos, 18 399 gémeos, 5127 trig.	Baixo peso ao nascer	Muito baixo peso analisado só para o total de nascidos com PMA. Sem detalhes da criopreservação
Nakajo <i>et al.</i> (2004), Japão	Estudo retrospectivo de coorte com questionário, nascidos em 1995-2003	105 crio (74 únicos, 28 gémeos, 3 trigémeos), 406 ICSI (217 únicos, 165 gémeos, 24 trigémeos) 120 FIV (64 únicos, 44 gémeos, 12 trigémeos). 73,4% de respostas. Follow-up em 3,6,9,12,18 e 24m	Crescimento	Somatometria ao nascer mas sem IG. Desenv. mental e defeitos congénitos, só avaliados na PMA Sem detalhes da criopreservação
Wang <i>et al.</i> (2005), Austrália	Estudo retrospectivo de coorte, 1996-2000	17724 RNs (5120 crio, 12 604 FIV a fresco) 11 556 únicos, 5513 gémeos, 657 trigémeos	Prematuridade e baixo peso ao nascer	Sem detalhes da criopreservação
Kallen <i>et al.</i> (2005a, 2005b e 2005c), Suécia Comunicação pessoal EpC (2009)	Estudo baseado em registos populacionais, 1982-2001	Total 16 280 lactentes (1055 crio FIV, 419 crio ICSI, 10 228 FIV fresco, 4545 ICSI fresco) 10 088 únicos, 3006 gémeos, 147 trig. Mediana <i>follow up</i> 5A1/2 nos FIV	Prematuridade e baixo peso ao nascer Defeitos congénitos e Cancro (2005c)	Mortalidade sem distinguir gémeos. Complicações sem distinguir crio ou fresco e por isso excluídas no estudo. Sem detalhes da criopreservação
Olson <i>et al.</i> (2005), USA	Estudo retrospectivo de coorte, 1989-2002	Total 1462 lactentes de PMA (236 FIV, 476 ICSI, 335 crio, 415 ZIFT), 8422 casos controle concebidos naturalmente e 343 de inseminação intrauterina	Defeitos congénitos major avaliados com 1 ano de idade	Não gémeos. Não compara concebidos naturalmente ou com inseminação intrauterina Sem detalhes da criopreservação
Desai <i>et al.</i>	Estudo	11 partos	Defeitos	Amostra de

(2007), USA	retrospectivo baseado em amostra hospitalar, 2002-2006		congénitos	embriões de 3 dias vitrificados. Crio proteção com DMSO, etileno glicol e sucrose
Shih <i>et al.</i> (2008), Austrália	Estudo Retrospectivo a partir de registos, 1978-2005	3708 FIV e ICSI com crio, 4406 FIV e ICSI a fresco	Prematuridade, baixo peso ao nascer, Z score, morte perinatal e defeitos congénitos	Subanálise de primogénitos e únicos PMA. Tem dados de Wang <i>et al.</i> (2005). Criop. em D2 (raramente D3 ou D6). Usado propanediol
Belva <i>et al.</i> (2008), Bélgica	Estudo retrospectivo baseado numa amostra hospitalar, 1983-2006	547 crio ICSI (29.3% de gémeos, 0.5% trigémeos) 390 crio FIV (25.7% gémeos, 1.5% trigémeos) 2840 ICSI frescos (43% gémeos, 4.0% trigémeos) 2955 FIV fresco (42.3% gémeos e 4.9% trigémeos, 4 quadrigémeos) <i>Follow-up</i> até 2M	Prematuridade, baixo e muito baixo peso ao nascer, morte fetal e perinatal, defeitos congénitos e anomalias cromossómicas	Comparação entre crio ICSI (1993–2006) e crio FIV (1986–2006) com ICSI fresco (1991–1999) e FIV fresco (1983–1999) Crio de D1 a D6. c/propanediol, DMSO ou glicerol (embriões C/5-6d)
Rama Raju <i>et al.</i> (2008), Índia	Estudo retrospectivo baseado numa amostra hospitalar, 2005-07	89 lactentes crio FIV/ICSI (50 únicos, 36 gémeos, 3 trigémeos) 216 FIV/ICSI a fresco (118 únicos, 92 gémeos e 6 trigémeos)	Defeitos congénitos	Prematuridade, baixo peso, complicações, ÍA e admissão UCIRN S/distinguir únicos e gémeos Vitrificação em D3 com crio-ansa e etilenoglicol
Balaban <i>et al.</i> (2008), Turquia	Estudo retrospectivo, 2006-7	8 partos (6 únicos e 2 gémeos)	Saúde em geral	Vitrificação com crio-ansa. Criopreservação em D3 com etilenoglicol e propanediol

DMSO: dimetilsulfoxido;

Quadro 4 - Quadro remissivo dos 12 principais estudos incluídos na revisão de Wennerholm U.B. et al. – 2009, publicados entre 1994 e setembro de 2008 e registados na PubMed, Cochrane e Embase.

Quando se comparam resultados entre gestações naturalmente concebidas e aquelas em que houve criopreservação embrionária, surgem grandes dificuldades para justificar as diferenças. Tendo em consideração o que se passa com determinadas populações animais, submetidas a criopreservação embrionária e em que surge um aumento dos casos de macrossomia fetal e de malformações, incluindo anomalias placentares e polihidramnios (aumento da produção de líquido amniótico) verifica-se que as situações da PMA em humanos não mostram ter tantas complicações. Os autores duma revisão de 2009 (Grace, K.S., Sinclair, K.D. – 2009) atribuíram as diferenças observadas após a criopreservação, à existência de alterações epigenéticas subtis, ocorridas em fases pré implantatórias, em loci não *imprinted* e que poderão manter-se silenciosas até à idade adulta.

São pouco conhecidos os mecanismos responsáveis pelas modificações epigenéticas, ou pelas alterações da expressão do genoma induzidas pela criopreservação e os resultados dos estudos já realizados, são por vezes controversos.

A possibilidade de alguns meios de cultura, promoverem um crescimento excessivo, é uma hipótese tanto em humanos como em animais. Outra possível explicação para algumas diferenças relaciona-se com o assincronismo entre a fase hormonal do endométrio e o momento da chegada do embrião à cavidade uterina, sendo que tal facto poderia condicionar alterações precoces que se manteriam. Este efeito causal perder-se-ia nas transferências a fresco, devido à estimulação ovárica e à alteração das hormonas esteroides.

Um achado curioso e referido no estudo dinamarquês, que comparou irmãos (nascidos de gestação única) em que um esteve criopreservado e outro foi transferido a fresco, foi o facto da criopreservação se associar a mais peso, mesmo entre os irmãos e ajustando-se os resultados para a idade materna e ordem de nascimentos (Aaris et al. – 2011). Este facto comprova que factores diversos das características maternas influenciam o peso dos fetos únicos dos grupos com criopreservação. Se assim for, é porque as técnicas utilizadas induzem mudanças no desenvolvimento, em estádios precoces da vida embrionária, que se refletem no crescimento. Em grau elevado, esta tendência para maior peso pode determinar macrossomia, e esta conduz, como se sabe, a

mais complicações (Henriksen – 2008) e eventualmente a um risco aumentado de cancro infantil tal como foi sugerido por um outro autor (Kallen et al – 2010 e).

Há estudos comparativos envolvendo fetos únicos, uns nascidos após FIV/ICSI (a fresco ou criopreservados) e outros concebidos naturalmente em que não se encontram diferenças relativas ao baixo peso e à prematuridade mas há outros em que os resultados são exatamente o contrário. Num estudo finlandês, os resultados apontaram para melhores resultados nos grupos submetidos a criopreservação embrionária (Pelkonen et al., - 2010) e outras publicações voltaram a evidenciar que os fetos de embriões criopreservados tendem a ser maiores e mais vezes «grandes para a IG», quando comparados com fetos de embriões transferidos a fresco ou nascidos de gravidez espontânea (Pinborg et al – 2011), (Sazonova et al 2012).

A evolução das crianças em que houve criopreservação, superou a das transferidas a fresco para os parâmetros de *follow-up* avaliados por Maheshwari, A. et al. – 2012. Várias hipóteses têm sido colocadas para esta aparente supremacia dos resultados da criopreservação sobre a transferência a fresco. Mais uma vez foi posta a hipótese da estimulação hormonal, usada nos ciclos a fresco, poder ser responsável por alguns efeitos desfavoráveis, embora nunca se possam excluir razões inerentes aos próprios embriões da amostra ou às dadoras dos ovócitos. Também se pode admitir a hipótese dos embriões que sobreviveram ao congelamento e ao aquecimento, poderem ser, *a priori*, mais robustos do que os embriões frescos, que foram selecionados entre os muitos facilmente disponíveis.

Na meta análise de Pinborg, A. et al. – 2013, o estudo de Belva et al. - 2008 constituiu, como já referimos, uma exceção entre os analisados, porque foi o único a reportar mais casos de baixo peso nos fetos com criopreservação embrionária.

Relativamente às técnicas de vitrificação de gâmetas e de embriões ainda há pouca bibliografia mas os resultados globais parecem ser promissores (U.B.Wennerholm et al. - 2009). Num estudo em que se comparou a evolução dum grupo de crianças nascidas após vitrificação de blastocistos, versus dois grupos em que houve transferência de blastocistos a fresco, ou criopreservação lenta em fase de clivagem (Wikland et al., - 2010), os autores não encontraram diferenças significativas nos índices de prematuridade, baixo peso ou mortalidade. Houve mais RCIU no grupo

dos fetos únicos com transferência de blastocistos a fresco, quando comparado com o grupo dos blastocistos vitrificados resultados estes que são idênticos à maioria dos observados na criopreservação tradicional.

O nosso estudo não incluiu casos de vitrificação embrionária, porque essa tecnologia ainda estava pouco divulgada, na altura da fertilização da população da nossa amostra.

2.4.3.6 – Influência da PMA na evolução perinatal e tardia

Tem-se vindo a evidenciar uma crescente preocupação com os efeitos precoces da PMA e com algumas das suas consequências tardias, que ainda não tenham sido inequivocamente provadas (Wennerholm and Bergh - 2000). Numerosas publicações (Nygren et al. – 2007) têm alertado para um número aumentado de malformações, prematuridade e problemas associados à gemelaridade monozigótica mas sem uma caracterização precisa desses riscos. As amostras populacionais estudadas são muito pequenas, impedindo a análise discriminada das várias técnicas (Porta Ribera, R., Trémols, V. et al – 2009). Em muitas situações, talvez na maioria, há omissão de resultados (Carson, C. et al. – 2010 e 2011) e só são analisados dados de somatometria e de mortalidade perinatal por serem de mais fácil acesso. Aspectos do neurodesenvolvimento infantil tendem a ser menos investigados, apesar de serem cruciais para oportunas mudanças.

De entre os vários estudos que consultámos, houve dois de origem britânica que constituíram uma exceção, por terem incluído o desenvolvimento mental e a avaliação neurológica com inclusão de diagnósticos por regra omitidos, tais como estrabismo e défices auditivos (Sutcliffe et al. – abril e dezembro de 1995). Estes dois estudos controlados despertaram-nos maior atenção, devido à semelhança com a nossa própria investigação. Recorrendo às Escalas de Desenvolvimento Mental de Ruth Griffiths, o mesmo instrumento psicométrico que utilizámos, os autores avaliaram o desenvolvimento de 91 crianças em que houve criopreservação e o de 83 concebidas naturalmente, aos 25 e 29 meses respetivamente. Os escassos resultados publicados,

evidenciam poucas diferenças e, para estes autores, «*o desenvolvimento geral das crianças com criopreservação, não era motivo de preocupação*». Na nossa opinião, esta conclusão é pouco objetiva e pode ter perdido atualidade, devido à evolução das técnicas de PMA ao longo dos mais de 20 anos que nos separam dos primeiros nascimentos, em que houve criopreservação embrionária. Como limitações do estudo britânico, identificámos o facto de não ter havido paridade dos grupos controle relativamente a variáveis importantes. A semelhança entre os 2 grupos limitava-se apenas à idade, sexo e classe social de origem (de acordo com a classificação de Graffar descrita no anexo 1)⁸³ o que é insuficiente para se obterem conclusões mais rigorosas. Aspectos muito importantes como sejam a prematuridade, a idade dos pais, a paridade, a gemelaridade e o tipo de parto, não foram tidos em conta e tal omissão pode ter influenciado os resultados.

Numa meta análise envolvendo publicações de 1996 a 2008, (Hvidtjorn, D., Schieve, L., et al. -2009) onde se pretendeu relacionar os tratamentos da PMA com a ocorrência de paralisia cerebral, patologia do espectro do autismo e atraso de desenvolvimento, os resultados foram inconclusivos e os autores acabaram por divagar mais sobre as dificuldades metodológicas deste tipo de estudos, do que sobre os resultados que buscavam e não obtiveram.

Num levantamento que envolveu 334 628 nascimentos e óbitos fetais da região americana de Massachusetts, foi feita uma comparação entre filhos de mulheres férteis e a descendência das mães que tiveram dificuldade em engravidar, embora sem terem chegado a recorrer à PMA. Neste gigantesco estudo populacional e longitudinal, a partir dos nascimentos ocorridos entre 2004 e 2008, separaram-se os nascimentos únicos dos gemelares e analisaram-se quatro aspectos: prematuridade, baixo peso ao nascer, restrição de crescimento intra-uterino e mortalidade. Foi feita regressão logística para a comparação primária entre os nascimentos com PMA e este sub grupo de mulheres pouco férteis mas não tratadas. Verificou-se que entre os nascidos com PMA havia maior risco de prematuridade e de baixo peso quando comparados com a descendência

⁸³ A Classificação de Graffar é um método de classificação usado internacionalmente para avaliação do bem estar sócio económico. Foi estabelecida pelo Professor Graffar de origem belga e adaptada para Portugal (F. Amaro - 1990) . Baseia-se em cinco critérios - profissão, nível académico, rendimentos familiares, qualidade do alojamento e do bairro onde se habita.

do grupo subfertil. Nos gémeos o risco de mortalidade era significativamente mais baixo no grupo da infertilidade do que no grupo das mães férteis e subférteis (*odds ratios* ajustados de 0,55 e 0,15 respetivamente). Os autores encontraram índices mais altos de prematuridade e baixo peso entre os fetos únicos da PMA quando comparados com os filhos das mães sub férteis mas não tratadas. Tais diferenças foram no entanto menores do que as encontradas entre mulheres férteis e mulheres que recorreram à PMA. Como se a subfertilidade determinasse valores intermédios de risco, muito embora tal conclusão careça de mais estudos (Declercq E., Luke B., et al., - 2013). Há algumas evidências de que a PMA, só por si, contribui para piores resultados perinatais e que tais efeitos são independentes das características dos progenitores mas, é muito difícil marcar a fronteira entre a influência dos factores genéticos, a estimulação ovárica ou o impacto das tecnologias.

A **prematuridade** é definida por um nascimento que ocorre antes das 37 semanas de gestação, é sempre patológica e é um dos principais riscos perinatais porque condiciona toda a evolução. Na PMA, o período pós fertilização pode variar e não é contabilizado para efeitos de determinação da idade fetal. A IG é contada a partir da transferência embrionária, enquanto nas restantes situações é determinada pelo tempo de amenorreia ou pela avaliação ecográfica dos valores biométricos fetais que são parâmetros menos rigorosos.

Nos registos nacionais mais precisamente no relatório de 2011⁸⁴, verificou-se que 25,7% dos recém nascidos cujos embriões estiveram criopreservados, nasceram antes das 37 semanas. É um valor muito elevado quando comparado com os 10% de casos de prematuridade ocorridos nas gestações espontâneas. Os valores variam muito de país para país, e de década para década, sendo que a incidência de partos pré termo nos Estados Unidos aumentou de 9% em 1981 para 11,8% em 1999, altura em que já se fazia sentir a influência do crescente número de nascimentos com PMA. (Mattison D.R., Wilson S., - 2003).

⁸⁴ http://www.cnpma.org.pt/Docs/RELATORIO_ACTIVIDADE_PMA2011.pdf

O peso ao nascer associado ou não a **restrição de crescimento intrauterino (RCIU)** também é determinante da evolução posterior embora menos do que a duração da gravidez.

O **tipo de parto**, nomeadamente nos fetos imaturos, afeta a evolução perinatal porque o trabalho de parto dá origem a flutuações do fluxo sanguíneo cerebral que podem causar lesão neurológica e hemorragia. A cesariana pode revelar-se protetora em algumas situações, pelo que as suas taxas deverão ser tidas em consideração, na avaliação de resultados.

A **gemelaridade** é um risco obstétrico e perinatal porque, entre outros factores, aumenta os índices de prematuridade quer espontânea quer por decisão médica. Tanto os gémeos como os fetos únicos da PMA têm em média menor peso e maior risco de prematuridade, facto que ficou demonstrado numa meta-análise com grupos controle (McDonald et al. 2009 e 2010). Uma recente análise de 16 000 nascimentos com PMA, confirmou o aumento daqueles riscos nos fetos únicos mas não nos gémeos. No caso dos fetos únicos após os tratamentos de infertilidade, o risco de prematuridade ultrapassava o dobro, o que é estatisticamente muito significativo. (D'Angelo et al.-2011), (Cortessis K.V., Duncan C., et al. – 2012).

Desconhecem-se as razões para o facto inesperado dos gémeos terem melhor evolução mas, admite-se que os resultados da indução hormonal, sobre o ovário ou o endométrio, e a idade em que foi feita a transferência embrionária, possam ter influência.

Outro fator importante e a ter em conta é o impacto da morte de um gémeo no desenvolvimento do gémeo sobrevivente. As situações de «vanishing twin» ocorrem em 10% das gestações FIV de feto dito único, obtidas após transferência de dois embriões. Os fetos únicos com pior evolução poderiam ser, em muitos casos, «gémeos sobreviventes» e não verdadeiros fetos únicos. Diversos autores lembram a necessidade de mais estudos sobre esta realidade (Pinborg A, et al. – 2013)

Na gravidez gemelar a incidência de prematuridade e de baixo peso é semelhante nas gestações espontâneas e nas assistidas, ao contrário do que acontece nas gestações de feto único, em que a evolução é pior após PMA. As causas, como já referimos, não são facilmente explicáveis nem totalmente conhecidas. As gestações de feto único, após PMA, também têm uma maior incidência de **complicações perinatais**

e **tardias** (Sebastiani, G., Pertierra Cortada, A., et al - 2009), (Declercq E., Luke B., et al., - 2013). Alguns autores encontraram mais hospitalizações durante a infância, nos fetos únicos com PMA, o que poderá ter múltiplas causas.

Chegou a ser sugerido um aumento do risco oncológico infantil mas, esta relação causal, não ficou provada no relatório da ESHRE de 2005 (ESHRE, Hum Reprod. - 2009). Na revisão de Wennerholm U.B. - 2009 e no estudo por si citado, pertencente a Kallen *et al.* da Suécia (Kallen *et al.* - 2005a, 2005b e 2005c), entre as 16 280 crianças nascidas após FIV e com um *follow-up* médio de 5 anos e meio, foram identificadas 1474 crianças submetidas a criopreservação embrionária e destas houve 3 que tiveram cancro (2 neoplasias do sistema nervoso central e uma histiocitose). A previsão estatística de ocorrências oncológicas, para aquele número de crianças, era de 1,94 casos. Não há evidências suficientes sobre estas matérias que integram demasiados factores de enviesamento na sua análise.

Num estudo feito em Barcelona (Sanchis Calvo, A., Marcos Puig B., et al. - 2009) também foram comparados gémeos e fetos únicos nascidos com e sem FIV (1,61% de PMA no total de nascimentos) e encontraram-se diferenças significativas relativamente a outros estudos semelhantes. Na PMA houve uma percentagem mais elevada de malformações mas surpreendentemente não se encontraram mais casos de prematuridade ou baixo peso, o que afasta os resultados da média de estudos semelhantes. Neste estudo catalão houve 5,3% de malformações detetadas na altura do parto dos nascidos após FIV, comparativamente a 1,1% dos concebidos naturalmente ($p < 0.002$) sendo de 4,83% o valor corrigido do risco relativo de malformações (95% CI, 2,14 - 10,83).

Um estudo alemão reportou também piores resultados nas crianças concebidas com ICSI, quando comparadas com as de FIV clássica (El-Chaar D, Yang Q, et al. - 2008) e, em duas revisões da mesma altura, uma americana e outra canadiana (Reefhuis, J., Honein, M.A., et al. - 2009), foi igualmente observado um aumento de malformações no grupo da PMA. Estes autores relacionam as diferenças encontradas, com possíveis efeitos dos tratamentos ou com as causas subjacentes à infertilidade ou ao somatório de todos estes factores (Halliday et al., 2010).

Relativamente à patologia do sistema nervoso central, carece de prova que os tratamentos de infertilidade aumentem a sua incidência entre os descendentes dos casais

tratados. A evidência disponível sobre as capacidades de aprendizagem e outros aspectos mais subtis do desenvolvimento cognitivo e neurossensorial, mantêm-se sob investigação sentindo-se que são necessários mais estudos (Yue-hong Lu, Ning Wang, Fan Jin – 2013).

A meta análise de Pinborg, A. et al. – 2013 que foi muito aguardada pela comunidade científica, ajudou a pôr alguma ordem em tanta controvérsia mas confirmou que as características parentais, incluindo a sub fertilidade, podem condicionar os resultados a curto prazo.

Após o nascimento, a evidência disponível não mostrou aumento significativo da morbidade no grupo da PMA a não ser a que decorre da prematuridade, do baixo peso ao nascer e das condições dos progenitores. Os fetos únicos após FIV/ICSI e criopreservação embrionária, revelaram maior risco de prematuridade quando comparados com os fetos únicos de gestação espontânea, mas mostram melhores resultados, quando comparados com aqueles em que houve transferência embrionária a fresco (evidencia A).

Mais uma vez comprovámos, que mesmo naquela meta análise que integrou estudos feitos ao longo de 20 anos (1982- 2012) e que englobaram milhares de crianças, a análise dos resultados raramente foi além da prematuridade e dos aspectos antropométricos. O **neurodesenvolvimento** foi pouco analisado por insuficiência de dados, o que é uma dificuldade recorrente. A possibilidade de existirem riscos a longo prazo não deve contudo ser desvalorizada, porque o primeiro nascimento ocorreu apenas em 1978 e é prematuro avaliar efeitos tardios.

A infertilidade é, como temos afirmado, causa frequente de sofrimento o que leva os indivíduos afectados a submeterem-se a protocolos terapêuticos muitas vezes longos e frustrantes. Os tratamentos mesmo no circuito público de saúde, envolvem custos que não estão ao alcance de todos, e não são cobertos pelas companhias seguradoras. Esta realidade faz com que os beneficiários da Medicina da Reprodução tenham habitualmente uma situação socio económica mais estável e uma capacidade de resiliência superior à média.

Relativamente aos aspectos emocionais associados à parentalidade nestas condições difíceis, verificou-se através de diversos estudos que, nos casos de feto único,

não existiam diferenças psicológicas significativas, incluindo as competências parentais, comparativamente àqueles que tiveram uma gravidez espontânea (ESHRE - 2009). As diferenças encontradas, apontaram apenas para um relativo melhor desempenho das mães submetidas a tratamentos de infertilidade, embora os pais obtivessem piores resultados em algumas escalas de avaliação psicológica.

Em estudos epidemiológicos, é válido testar hipóteses mas qualquer associação encontrada não pode ser interpretada como causalidade. As situações de gravidez gemelar são um bom exemplo do que acabámos de dizer, porque aumentam de forma significativa o cansaço e os sintomas depressivos, sobretudo nas mães de crianças portadoras de incapacidades. Uma vez que a gemelaridade e a prematuridade aumentam a morbidade e são mais frequentes na PMA, é natural que os progenitores destas crianças apresentem um risco aumentado, embora enviesado, para tais sintomas.

Relativamente à **idade materna** os resultados conhecidos são contraditórios. A maioria dos autores descreve riscos obstétricos e perinatais aumentados nos limites do período fértil feminino, mas é difícil separar as causas atribuíveis à imaturidade das que poderiam derivar das questões fisiológicas maternas. Entre as adolescentes existe um risco aumentado de aborto, menor ganho ponderal, distúrbios hipertensivos e nascimento de filhos com menor peso. As mulheres com mais de 34 anos que constituem o principal grupo utilizador da PMA, são naturalmente mais propensas a sofrer de doenças crónicas ou a gerarem filhos portadores de aneuploidia. Estas diferenças decorrentes das características maternas, podem enviesar alguns estudos que não incluam factores de correção para a idade (Ozalp S, Mete Tanir H, et al. – 2003).

No estudo que realizámos não foi incluída nenhuma mãe adolescente mas poderão existir crianças concebidas a partir de ovócitos preservados ou provenientes de uma mãe adolescente.

A **vigilância** médica da gravidez relaciona-se com um melhor prognóstico materno e fetal. As diferenças geográficas e sociais interferem de tal forma, nos cuidados médicos disponíveis e no bem-estar das populações, que permitem superar alguns factores biológicos desfavoráveis quando existe acesso a melhores cuidados de saúde (Weerasekera D.S., Udugama S.G. - 2003). Nas gestações da PMA há sempre uma garantia de vigilância médica, que funciona como fator de proteção e que pode contrabalançar os maiores índices de prematuridade e alguns riscos perinatais.

A FIV já favoreceu o nascimento de mais de 4 milhões de crianças em todo o mundo, superando muitos casos de esterilidade e envolvendo recursos técnicos em permanente atualização. Verifica-se porém, que há pouca investigação com grupos controle e há dificuldades intransponíveis, impostas quer por questões éticas quer pela atualização das técnicas, que impedem o prolongamento dos modelos de estudo e a sua generalização a vários centros.

2.5 - ASPECTOS BIOÉTICOS E JURÍDICOS DA PMA E DA CRIOPRESERVAÇÃO EMBRIONÁRIA

2.5 - ASPECTOS BIOÉTICOS E JURÍDICOS DA CRIOPRESERVAÇÃO EMBRIONÁRIA

2.5.1 – A importância da PMA na origem da Bioética e do Biodireito

Ainda que os Princípios e os novos ramos da Ética filosófica só se tenham afirmado a partir da segunda metade do século XX, assentam em fundamentos intemporais que evocam a consciência e o altruísmo de homens e mulheres de todas as épocas. Há como que um legado ancestral que converge na justamente designada «The Golden Rule/ A regra de ouro»⁸⁵ presente em todas as culturas e religiões. Mesmo na ausência duma Ética global, esta regra universal atribuída, entre outros, a Moisés⁸⁶ e evocada por Jesus Cristo, no Sermão da Montanha quando disse: «*Portanto, tudo o que vós quereis que os homens vos façam, fazei-lho vós também, porque esta é a lei e os profetas*» (Mateus 7:12), constitui um ponto de partida e o princípio mais universal da Ética.

Na cultura dita ocidental, sobressaem a tradição de Aristóteles (384 a.C. – 322 a.C.) bem representada na célebre frase «*O bem que cada um obtém e conserva para si é suficiente para se dar a si próprio por satisfeito; mas o bem que um povo e os Estados obtém e conservam é mais belo e mais próximo do que é divino.*» (Aristóteles, *Ética a Nicómaco*, 1094b1- 2004,) e a herança judaico cristã como referências fundacionais. Após séculos de algum silêncio, evidenciou-se Immanuel Kant (1724-1804) como um dos mais marcantes filósofos e pensadores da Ética. Nas suas obras «*Crítica da Razão Pura*», «*Crítica da Razão Prática*» e «*Fundamentação da Metafísica dos Costumes*», Kant torna-se intemporal quando explicitamente afirma que:

⁸⁵ Encyclopedia of Philosophy in <http://www.iep.utm.edu/goldrule/> No Budismo - *Não atormentes o próximo com o que te aflige* – (Udana – Varga 5:18); No Confucionismo - *Não façais aos outros aquilo que não quereis que vos façam* – (Confúcio); No Hinduísmo - *Esta é a suma do dever: não façais aos outros aquilo que, se a ti for feito, te causará dor* – Mahabharata (5:15:17); No Islão - *Nenhum de nós é um crente até que deseje a seu irmão aquilo que deseja para si mesmo* – (Sunnah); No Judaísmo - *O que é odioso para ti, não o faças ao próximo. Esta é toda lei, o resto é comentário.* Talmude - Shabbat 31^a; No Zoroastrismo - *Aquela natureza só é boa quando não faz ao outro aquilo que não é bom para ela própria* - Dadistan-i-Dinik 94:5

⁸⁶ Livro do Levítico

*"No reino dos fins, tudo tem um preço ou uma dignidade. Quando uma coisa tem um preço, pode pôr-se, em vez dela, qualquer outra coisa como equivalente; mas quando uma coisa está acima de todo o preço, e portanto não permite equivalente, então ela tem dignidade" ... e ainda... "age de tal modo que trates a humanidade, tanto na tua pessoa como na do outro, sempre e ao mesmo tempo, como um fim e nunca simplesmente como um meio" "*⁸⁷

Após mais de um século em que a Ética pareceu ter sido proscrita da sociedade humana, envolvida em trágicas guerras durante décadas, heis que surge a proclamada Declaração Universal dos Direitos do Homem em 1948. O documento mais marcante do século XX permanece vivo e atual, sempre que é evocada a dignidade humana muito embora nas últimas décadas tenham surgido outras correntes de pensamento inovador que originaram uma verdadeira revolução. (...) *Este facto está na origem da estruturação das designadas "éticas aplicadas", cada uma vocacionada para uma diferente área específica, e entre as quais sobressai a Bioética* (Patrão Neves, M. C. - 2001).

Na afirmação de novos ramos oriundos da Ética filosófica, surgiu em 1970 e pela primeira vez⁸⁸, o termo «**Bioética**» que foi um feliz neologismo criado pelo oncologista Van Rensselaer Potter II (1911-2001) ao tentar traduzir, de forma eloquente, o novo conceito estruturado nas palavras gregas *bios* (vida) e *ethos* (relativo à Ética).

O legado científico de Potter ultrapassou as questões ambientais e relacionou esta nova disciplina com as ciências médicas, numa abordagem que poderíamos designar por Ética clínica.

⁸⁷ Immanuel Kant, *Fundamentação da Metafísica dos Costumes* (1785), Edições 70, Brasil, 1991, p.69.

⁸⁸ Van Rensselaer Potter II (1911-2001), um oncologista americano que criou e usou pela primeira vez o termo Bioética em 1970 num artigo intitulado «Bioethics: The science of survival». A sua obra «*Bioethics: Bridge to the future* » de 1971, ligou-o definitivamente a esta designação.

A palavra bioética terá sido usada num texto alemão da primeira metade do século XX, mas nessa altura não teve grande impacto.

Muitas das correntes de pensamento oriundas da Ética filosófica, surgiram da necessidade de limitar as práticas abusivas, tantas vezes realizadas em nome da Ciência, estabelecendo Declarações e Códigos de conduta, que defendem a integridade da pessoa humana e promovem a responsabilidade da sociedade em relação às gerações do futuro. Como figura marcante nesta evolução sobressaiu o Obstetra e Fisiologista, Andre Hellegers contemporâneo de Potter e ligado à Medicina da Reprodução⁸⁹.

Em poucos anos, este novo ramo da Ética conheceu um desenvolvimento exponencial potenciado pelo facto da Medicina, do Direito e das Ciências Sociais carecerem e não disporem de instrumentos para as situações criadas pelas novas tecnologias. A Bioética tornou-se rapidamente “*uma nova transdisciplina*” (Archer, 1996, p. 462) nas palavras de Luís Archer que, também viria a reafirmar (Archer, L. 2006, p.142-143) que “*a Bioética pretende desenvolver um diálogo transdisciplinar sobre as tecnologias que convêm ou não a cada sociedade, na perspectiva dos valores que queira salvaguardar. Consciente de que o progresso científico não é um absoluto, a bioética pretende contribuir para a felicidade genuína e sustentável dos indivíduos e da sociedade*”.

Esta realidade em que « (...) exige-se que a Ética manifeste capacidade para intervir em todas as áreas da atividade humana, (...)» (Patrão Neves, M., e Osswald, W., - 2007) igualmente favoreceu o desenvolvimento de outras ciências híbridas, nomeadamente o **Biodireito**, que em poucos anos se impuseram à comunidade científica, gerando uma atitude que “*permite ao Homem participar na evolução biológica, preservando a harmonia universal*” (Patrão Neves, M.C., - 1996).

De facto, a Bioética foi-se revelando indispensável como atitude de reflexão mas insuficiente na praxis já que não é sua missão impor condutas. Foi neste pressuposto que surgiu o Biodireito, mais voltado para a criação de uma legislação que salvaguarde o ser humano da arbitrariedade da ciência.

Evocando marcos importantes, recordamos que entre 1974 e 1978, um grupo de profissionais da área clínica e da Ética tradicional, denominado “*National Commission*

⁸⁹ Andre Hellegers (1926-1979) Obstetra e Fisiologista holandês que fundou o célebre “The Joseph and Rose Kennedy Institute for the Study of Human Reproduction and Bioethics” em Washington.

for the Protection of Human Subjects of Biomedical and Behavioral Research⁹⁰, elaborou o **Relatório Belmont** (*Belmont Report*) feito a pedido do Congresso norte-americano e publicado em 1978. Ficaram definidos os direitos inalienáveis da pessoa humana perante a prática e experimentação médica. A progressiva adesão das nações aos princípios deste relatório, verdadeiro marco histórico de natureza ético-jurídica, levou a uma nova atitude em toda a atividade científica. Por esta altura, chegaram ao conhecimento público pela comunicação social, verdadeiros atentados da dignidade humana, cometidos em nome da ciência (fig. 13).



Fig. 13 - Denúncia dum polémico e bem conhecido estudo que envolveu experimentação humana, iniciada em 1932 com 600 afroamericanos⁹¹.

⁹⁰ Refere-se à «*National Commission for the Protection of Human Subjects of Biomedical and Behavioral Research*» (Comissão Nacional para a Proteção da Pessoa Humana e Pesquisas Biomédicas e Comportamentais) criada em 1974 e que foi o primeiro órgão americano de supervisão ética. http://bioethics.georgetown.edu/pcbe/reports/past_commissions/

⁹¹ In <http://www.popfi.com/wp-content/uploads/tuskegee2.jpg>

O Relatório Belmont legou-nos aqueles que são hoje considerados os **Princípios fundamentais da Bioética** e que são:

Beneficência: Corresponde ao princípio hipocrático de fazer o bem (do latim *bonum facere*). Os autores Tom Beauchamp e James Childress (1989) definem beneficência como a ação feita em benefício alheio, e estabelecem o dever moral de agir em benefício dos outros.

Princípio da **Autonomia** – implica o respeito pela Pessoa Humana e exige o consentimento livre e informado, para se realizar qualquer intervenção ou investigação, salvaguardando esse direito quando não há auto determinação do indivíduo. Recorde-se que relativamente à Medicina, já o Papa Pio XII havia afirmado em 1952, que os únicos direitos que os médicos têm sobre os doentes, são somente aqueles que estes lhes conferem, o que contempla a mesma ordem de pensamento.

Justiça: este princípio refere-se à imparcialidade. O relatório veio defender a equidade no tratamento de cada pessoa, conforme as suas necessidades e de acordo com o seu mérito e contribuição à sociedade.

Esta enunciação de princípios tem a sua máxima aplicação no âmbito da saúde mas é extensível a muitas outras áreas e, aos três princípios nucleares da Ética, juntaram-se outros considerados subsidiários e onde se destaca o **Princípio da não-maleficência**. O conceito de não maleficência provem da máxima da Ética médica: *primum non nocere* (primeiro não ferir, do latim) e é complementar do princípio da beneficência quando institui a obrigação de não causar dano intencional.

O **Princípio da alteridade** por sua vez, é definido pela relação entre as pessoas e simboliza o respeito devido aos outros (Oliveira Ascensão J., *et al* – 2005) sendo materializado numa **Ética de reciprocidade**, tão bem traduzida em todas as épocas e religiões, pela já mencionada e justamente designada «Regra de ouro».

Ainda em 1978, o Instituto Kennedy da Universidade de Georgetown nos USA que é de orientação jesuíta, fez publicar a primeira Enciclopédia de Bioética em quatro

volumes, dirigida pelo teólogo católico Warren Reich e onde se define a Bioética como o "estudo sistemático do comportamento humano na área das ciências da vida e da saúde, visto à luz dos valores e dos princípios morais".

Alguns membros da comissão que redigiu o relatório Belmont, oriundos de diferentes correntes filosóficas, reformularam os princípios e publicaram em 1979 a obra "Principles of Biomedical Ethics", uma verdadeira obra-prima da Bioética (Beauchamp, T.L., e Childress, J.F. -1979)⁹² paradigma da teoria conhecida como "Princípioalismo"⁹³, que relaciona teorias éticas distintas, ajudando a distinguir as fundamentações (ou fundamentos) dos princípios. Segundo os seus autores que sofreram algum confronto no plano teórico, não deverão existir conflitos de princípios mas, a existirem, todos os princípios deverão ser considerados deveres *prima facie*, isto é, princípios orientadores que admitem exceções justificáveis (Otomuro, D. - 2008).

Na evolução da Bioética houve muitos contributos teóricos para além do Princípioalismo. Entre as caracterizações éticas mais citadas, incluímos a de John Rawls, um crítico contemporâneo do utilitarismo, com uma fundamentação objetiva dos juízos morais ou Ética normativa, evidenciada na sua "Teoria da Justiça" de 1971; Hans Jonas, filósofo que desenvolveu uma ética da responsabilidade; Tristan Engelhardt e Peter Singer tidos como libertários e muito referidos nas áreas clínicas ou ainda Paul Ricoeur numa abordagem intelectual verdadeiramente interdisciplinar.

Actualmente os fundamentos da Bioética assentam em duas linhas do pensamento contemporâneo: a primeira, oriunda da tradição liberal que proclama os direitos da pessoa humana, como limites à ação da sociedade; a segunda, originária da primeira, apoia-se numa nova corrente filosófica que integra a ação do sujeito, não apenas no quadro das suas consequências imediatas, mas principalmente em função das suas repercussões futuras (Otomuro, Delia - 2008). Aplicando tais princípios éticos, quer os enunciados mais recentemente quer os primitivos, concluimos invariavelmente, que o

⁹² Beauchamp T; Childress J. Principles of biomedical ethics.3rd.ed. New York: Oxford University Press,1989.

⁹³ "Princípioalismo" aqui representado sobretudo pelo filósofo (utilitarista) T. L. Beauchamp e o deontologista J. F. Childress. Foram estes bioeticistas que em 1979 definiram os princípios da Bioética.

respeito pela dignidade da pessoa humana é um dever universal e um princípio com aplicabilidade *erga omnes*⁹⁴ (Loureiro J. - 2006).

Tentando fazer uma sùmula das visões mais recentes sobre o que integra hoje a Bioética na área clínica, poderíamos enunciar-lhe os seguintes atributos (Otomuro, D. - 2008):

- A prevenção dos abusos sobre a pessoa humana face à medicalização da vida e à investigação médica em seres humanos.
- A supervisão dos avanços técnico-científicos nas áreas sensíveis de diagnóstico, terapêutica e cuidados intensivos, reprodução medicamente assistida e engenharia genética.
- A crítica à heteronomia⁹⁵ de movimentos iniciados maioritariamente a partir dos anos 60 do século XX, com grupos minoritários que se foram impondo gradualmente à opinião pública existente.

Relativamente à Ética médica, os princípios da autonomia e da justiça simbolizam as preocupações mais atuais que se foram afastando duma visão paternalista para uma visão mais antropológica (Osswald, W. - 2005). O discurso da Bioética actual não conseguindo ser universal, procura ser universalista, e visa questões que envolvem a responsabilidade moral e social da ciência, sobretudo em áreas polémicas como a FIV, o diagnóstico pré-implantatório, o recurso à engenharia genética e a criopreservação de gâmetas e embriões.

Não é nossa intenção circunscrever a Bioética ao âmbito da Medicina, mas será essa a nossa perspectiva ao longo deste trabalho. Nesse pressuposto podemos afirmar que a PMA e todas as tecnologias satélite inicialmente criadas para promover nascimentos saudáveis, se tornaram os principais desafios bioéticos da atualidade.

⁹⁴ Expressão em latim (*erga* = para; *omnes* = todos) usada principalmente no meio jurídico.

⁹⁵ Heteronomia: conceito criado por Kant, para justificar as leis impostas. Pressupõe a sujeição do indivíduo à vontade de terceiros ou de uma coletividade. Fundamenta o Estado de Direito, em que os indivíduos se devem submeter à lei. Heteronomia é uma palavra de origem grega (o *heteros*, "diversos" + *nomos*, "regras") Opõe-se a autonomia em que o ente possui e pode expressar a sua vontade e à anomia que é a ausência de regras.

Os últimos anos têm sido marcados por alguns «abusos» pontuais que têm conseguido abalar os conceitos mais arreigados de maternidade, paternidade e filiação mas, nem mesmo os teóricos mais radicais ousam definir como objetos, seres que apesar de estarem privados de autonomia, são plenos de potencial e matriz humana.

Apesar de alguns autores como Tristan Engelhardt ou Peter Singer entre os contemporâneos, exprimirem opiniões que questionam o direito do embrião à dignidade humana, argumentando que *«um ente só será considerado pessoa, quando consciente, racional, livre, autónomo e responsável»* (Tristan Engelhardt - 1986), (Pessini, Loyola – 1998), um relativo equilíbrio tem prevalecido na generalidade dos países. Torna-se desejável que a par das técnicas inovadoras, surja o reconhecimento legislativo dum estatuto para o embrião, que garanta o seu direito a ser tratado sob o princípio da alteridade, no pleno respeito pela dignidade humana.

Gostaríamos de concluir esta breve introdução, afirmando a nossa esperança de que tanto os fundamentos da Ética filosófica clássica, como os de todas estas jovens éticas aplicadas que se lhe seguiram, e onde destacamos a **Neuroética** pela ligação ao nosso trabalho, possam funcionar como importantes estratégias para salvaguardar o equilíbrio e a sobrevivência da nossa espécie.

2.5.2 - Questões ético jurídicas da PMA e criopreservação embrionária

A evolução da Biologia e da Medicina da Reprodução foi tão rápida que, mudado o paradigma e desvalorizada a chancela da Moral, se tornou difícil legislar nesta área. Mesmo em países europeus que foram pioneiros em muitas técnicas, as diretivas legais tornaram-se em poucos anos contraditórias e incapazes de responder aos novos desafios. Nesta matéria, o Reino Unido foi, não apenas o protagonista dos primeiros grandes êxitos, como teve o mérito de elaborar o primeiro enquadramento legal para os novos desafios da Medicina da Reprodução.

Perante o vazio normativo e os constantes progressos científicos, surgiu em 1982, no Reino Unido, uma comissão para regulamentar as tecnologias da Embriologia e da FIV, em resposta às preocupações surgidas com o nascimento da primeira criança artificialmente concebida. A referida comissão inglesa, inicialmente dirigida pela

filósofa Mary Warnock, reconheceu os avanços tecnológicos mas privilegiou a defesa do embrião humano concebido artificialmente; Este grupo de trabalho estabeleceu princípios que foram publicados em 1984 num relatório conhecido como **Warnock Report**. Em 1990, aquela comissão deu lugar à *Human Fertilisation and Embryology Authority (HEFA)* um organismo que posteriormente originou a atual legislação (Act), que se denomina *Human Fertilization and Embryology Act*.

Apesar de toda a renovação legislativa e jurisprudência surgida na generalidade dos países após o Warnock Report, persistiram muitas questões reais que foram chegando ao conhecimento público. A possibilidade de utilizar gâmetas doados, recorrer a uma FIV, obter embriões e posteriormente poder preservá-los ou contratualizar «um ventre de aluguer», constituiu uma verdadeira revolução social que originou complexidades jurídicas nunca antes imaginadas. O relatório Warnock inspirou muita legislação impeditiva da mercantilização de gâmetas e de mães de substituição mas perante o avanço científico manteve-se um certo vazio jurídico porque as técnicas evoluem muito rapidamente.

Uma resposta ética direcionada para o impacto das tecnologias da PMA e a possibilidade de diferir a utilização de tecidos humanos para datas futuras, permanece quase totalmente em aberto. Todas as decisões que se relacionam com os períodos de tempo aceitáveis para a criopreservação, e o destino a dar aos tecidos biológicos, também estão longe de obter consenso, sobretudo quando ocorre o desinteresse, a impossibilidade ou a morte dos seus legítimos detentores.

Se a criopreservação de sémen viável, um dos produtos biológicos mais fáceis de manter por períodos superiores a vinte anos, tem motivado tantos e tão acesos debates, imaginemos os dilemas ético-jurídicos que a preservação de embriões humanos pode criar...

Voltando ao *Warnock Report* e aos seus princípios, foi determinado que os materiais biológicos só podem ser utilizados por entidade licenciada e fiel depositária, no estrito respeito pelos fins a que estavam destinados ou seja, para tratamentos de infertilidade ou para investigação científica, no caso dos gâmetas ou embriões humanos. Além das regras que recomendavam que o armazenamento não deveria exceder 10 anos no caso dos gâmetas, e 5 anos no caso dos embriões, aquele relatório também estabeleceu que seria indispensável o consentimento escrito dos dadores, para que fosse

iniciada e mantida a criopreservação. A possibilidade de compra ou venda de gâmetas ou embriões humanos ficou igualmente restringida, de forma a evitar a especulação comercial.⁹⁶

Perante o avanço da ciência e o crescente reconhecimento da Bioética e dos seus fundamentos humanistas, foi sendo sentida a necessidade de se constituírem comissões de avaliação técnico-científica, que posteriormente originaram as **Comissões de Ética**. Em 1983, surgiu em França a primeira destas comissões, a que se chamou «*Comité Consultatif National d'Éthique pour les Sciences de la Vie et de la Santé*» o qual produziu de imediato um parecer sobre «procriação artificial». Em França o direito à vida é garantido a quem quer que viva, seja nascido ou nascituro (o termo *nasciturus*, ou embrião implantado, significa o *ser destinado a nascer*) e, para as várias fases da vida pré natal, não deverá haver nenhuma diferença de tratamento. (França, G. V. – 2007).

Na Alemanha surgiu em 1985 o **Benda Report** que depois deu origem a uma lei de defesa dos embriões, lei essa que entrou em vigor em Janeiro de 1991.

Portugal esteve entre os primeiros países, a manifestar a necessidade de implementar uma comissão de Bioética a nível nacional e, em Maio de 1986, surgiu a primeira «Comissão para o Enquadramento das Novas Tecnologias» que chegou a elaborar uma proposta de lei sobre PMA, mas que não teve seguimento no plano legislativo.

O Centro de Direito Bioético da Faculdade de Direito da Universidade de Coimbra também publicou, atempadamente, um documento escrito baseado no trabalho daquela comissão e destinado a informar a opinião pública. Em 1990 foi criado o Conselho Nacional de Ética para as Ciências da Vida (CNECV) que, de certa forma, foi o herdeiro das tentativas anteriores e ao qual foi atribuída a competência de "*analisar sistematicamente os problemas morais suscitados pelos progressos científicos nos domínios da biologia, da medicina e da saúde em geral*" (Patrão Neves M. - 2001), (Lei nº 14/90, art.2º, nº1, alínea a). O CNECV produziu um Relatório-Parecer sobre a PMA em 1993.

⁹⁶ Cryobiology, cryogenics, cryopreservation in Pp 127 . Eubios Ethics Institute <<http://www2.unescobkk.org/eubios/index.htm>>

A lei portuguesa respeitante à PMA sofreu sucessivos adiamentos e, entre a sua elaboração e a publicação, mediaram vários anos e alguma polémica. A proposta de lei que tinha sido apresentada pelo Governo em julho de 1997, foi aprovada com emendas em plenário da Assembleia da República, mas foi vetada pelo Presidente da República (que exigiu nova apreciação).

A posição tomada pelo CNECV seguia a linha de pensamento francesa, em que o embrião é entendido como pessoa pelo menos potencial, desde o momento da conceção e devendo por isso, ser respeitado desde início; estas posições assentavam na ideia de *“o embrião não pode deixar de dar origem a um representante da espécie humana, e nunca desembocará num indivíduo de qualquer outra espécie, a vida humana merece respeito, qualquer que seja o seu estágio ou fase, devido à sua dignidade essencial”* e ainda... *“o embrião é desde o início o suporte físico e biológico da pessoa humana”*⁹⁷.

Outros países europeus seguiram o exemplo francês (com exceção do Reino Unido, Espanha e até recentemente a Alemanha), e produziram pareceres sobre aspectos da PMA embora com algumas divergências entre eles⁹⁸.

Em novembro de 1997, foi publicada a Declaração Universal do Genoma e dos Direitos Humanos que viria a ser editada pela Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO) em 2009. Esta publicação exprime uma genuína preocupação com a dignidade da pessoa humana, garantindo o direito inalienável de cada indivíduo à integridade genética, estimulando a democratização dos conhecimentos científicos, os direitos fundamentais, a autonomia da vontade dos pacientes e proibindo a clonagem de seres humanos e a comercialização de órgãos.

No fim do século XX viveu-se uma época de grande preocupação bioética causada pelos avanços tecnológicos mas, à semelhança de outros países, Portugal chegou ao século XXI sem um ordenamento jurídico ou uma legislação adequada à prática real da PMA. A legislação de muitos países é regida por teorias natalistas que apenas concedem direitos de personalidade aos indivíduos nascidos com vida. Tais regimes jurídicos falham nos princípios éticos e constitucionais da dignidade do ser

⁹⁷ Relatório-Parecer sobre a Experimentação no Embrião nº 15/CNECV/95 e 20/CNECV/1997.

⁹⁸ Para mais desenvolvimentos, *vide* Luís Archer *et al*, *Novos Desafios à Bioética*, Porto Editora, Porto, 2001, pp. 24 e segs.

humano, que são amplos e dizem respeito a todos, nascidos e por nascer, pelo simples facto de serem humanos.

No seu marcante relatório de 2003, Daniel Serrão ⁹⁹ insurgia-se contra esta ausência de regulamentação e com o facto de se permitir a criação de embriões humanos excedentários, sem se avaliar a dimensão do problema. A questão sobre «*se o embrião humano produzido por FIV e não utilizado no respetivo procedimento, é dotado de personalidade jurídica e, portanto, sujeito de direitos, passível de tutela pelo princípio constitucional da dignidade da pessoa humana*» (Andreazza, G. - 2012) permanece um importante motivo de reflexão, constantemente enriquecido com novos dados, mas sem que se tenha até hoje conseguido atingir um consenso estatutário.

Deste avanço tecnológico demasiado acelerado comparativamente à capacidade de adaptação da sociedade, resultaram numerosos embriões humanos cujo destino é incerto, tanto nas instituições públicas como privadas. Segundo a Associação Portuguesa de Fertilidade (APF), muitas clínicas portuguesas em funcionamento há mais de dez anos, perante o anterior vazio legal, aguardaram cautelosamente pela lei, mantendo os seus embriões congelados ¹⁰⁰. Como não existiam regras jurídicas, podem ter ocorrido casos de cedência de embriões humanos para adoção, para investigação ou para simples destruição, sem que nada se saiba desse destino. Também é possível que possa ter sido mantida a criopreservação de alguns embriões por tempo indeterminado e, em alguns centros, ainda se mantenha.

A muito aguardada Lei nº 32/2006, de 26 de julho veio finalmente colmatar importantes falhas criando «*o Conselho Nacional de Procriação Medicamente Assistida (CNPMA), ao qual compete, genericamente, pronunciar-se sobre as questões éticas, sociais e legais da PMA*»¹⁰¹.

⁹⁹ Livro Branco sobre “O uso de embriões em investigação científica”. Publicação do Ministério da Ciência e do Ensino Superior. Lisboa, 2003.

¹⁰⁰ Publicado originalmente no jornal Público, a 25 de Março de 2008. disponível em <http://www.apfertilidade.org/web/index.php>

¹⁰¹ http://www.cnpma.org.pt/cnpma_atribuicoes.aspx

Relativamente ao Direito, só a partir de julho de 2006 é que ficou definido o destino dos embriões excedentários¹⁰² e só em fevereiro de 2009 é que esta questão ficou devidamente regulamentada, com a promulgação da Lei vigente. Atualmente já existe proteção legislativa para o embrião humano, ainda que incompleta. Todas as clínicas públicas ou privadas que efetuem tratamentos de infertilidade, estão sujeitas a regras de funcionamento mais rigorosas do que a generalidade dos estabelecimentos de saúde. A legislação diverge porém entre nações, e a livre circulação nos países da União Europeia, tem permitido aos cidadãos explorar assimetrias legislativas e ultrapassar as leis de origem (Neves, C.I. – 2008)

A recente lei permite a criopreservação embrionária humana e estabelece um período de três anos, excepcionalmente alargado a seis anos, para a sua manutenção. Ultrapassado aquele prazo, os embriões que não tiverem sido transferidos, ou doados para adoção ou investigação, deverão ser destruídos¹⁰³.

A grande questão levanta-se com o facto de sabermos que muitos embriões permanecem viáveis durante muito mais tempo do que aquilo que a lei estipula e conservam a possibilidade prolongada duma transferência bem-sucedida para um útero materno (D. Serrão, 2003) e (CNECV/07)¹⁰⁴. Sendo assim quaisquer limites legais e prazos impostos à preservação embrionária deverão ser constantemente reavaliados¹⁰⁵. No que a esta temática diz respeito, a Lei portuguesa, também permite que os embriões inviáveis, ou simplesmente após os três anos de criopreservação legalmente determinados, sejam utilizados para investigação ou extração de células estaminais (pluripotenciais) destinadas a terapêutica.

Na nossa opinião, esta permissão de utilizar embriões viáveis para investigação, apenas porque chegaram ao fim dos três anos de preservação ou se encontram excluídos

¹⁰²Diário da República, 1.a série — N.o 143 Lei n.º 32/2006-de 26 de Julho – PMA - Artigo 9.º - Investigação com recurso a embriões e Artigo 25.º- Destino dos embriões. Pp 5245 a 5250

¹⁰³ Lei n.º 32/2006 - Artigo 9.º - Investigação com recurso a embriões e Artigo 25.º Destino dos embriões

¹⁰⁴ Ver /CNECV/07 Parecer do Conselho Nacional de Ética para as Ciências da vida sobre os Projectos de Lei n.º 126/X (que estabelece os princípios para a investigação em células estaminais e a utilização de embriões)

¹⁰⁵ A viabilidade vital dos embriões congelados é desconhecida mas supera amplamente os prazos estabelecidos por lei.

do projeto parental dos seus progenitores, implica a morte de seres vivos plenos de potencial humano e revela insuficiências do ordenamento jurídico.

À semelhança de outros autores, defendemos que as soluções de viabilidade para os embriões já existentes, e a investigação tendente à redução dos riscos inerentes à sua conservação, são eticamente mais defensáveis do que a permitida e legal destruição ou utilização em investigação científica, tanto mais que existem crianças aparentemente saudáveis, cujos embriões estiveram criopreservados por mais de dez anos (Wilson, C., Check J.H. - 2006).

Outra questão relevante e cuja discussão pública se aguarda, é a que diz respeito à gravidez sub-rogada. Alguns países, como a França, a Suíça e a Argentina, distinguem a maternidade sub-rogada da maternidade compartilhada (Odilon G. - 2010). Diz-se que a maternidade é sub-rogada, quando o embrião gerado a partir dos gâmetas de um casal é implantado no útero de outra mulher (muitas vezes pejorativamente designada por «ventre de aluguer») que gerará aquela criança e a devolverá aos pais biológicos após o parto. Na maternidade compartilhada uma mulher é inseminada com o sémen do elemento masculino dum casal, contribuindo com um ovócito seu para a fecundação e aceitando mediante contrato geralmente legal, entregar a criança no fim da gestação, ao casal ou indivíduo contratante. Esta prática (ainda) não está prevista na legislação, porque a lei portuguesa determina que a mãe é quem gera a criança, independentemente de ter produzido o gâmeta feminino que esteve na sua origem.

2.5.3 - Problemática dos embriões humanos excedentários

A possibilidade de preservar embriões provenientes duma FIV, permite reduzir os elevados custos materiais e humanos, que os tratamentos de infertilidade acarretam e contribui de forma significativa para o êxito da PMA. Contudo, da mesma maneira que este importante avanço, trouxe a inquestionável vantagem de se poder recorrer aos embriões criopreservados para futuras gravidezes, evitando a sua perda e as repetidas tentativas de fertilização com estimulações ováricas, também veio agravar o problema ético-jurídico que constitui a existência de embriões excedentários.

A prolongada indefinição da lei, tanto portuguesa como internacional, relativa aos embriões gerados mas não implantados, manteve uma indefinição das regras e limites aceitáveis. Foi graças aos princípios éticos comuns à maioria dos profissionais envolvidos, que se conservou uma frágil defesa, assente na convicção que: «*O trato com os embriões humanos deve ser norteado pelos princípios gerais da Bioética. Desta forma, será possível desenvolver um marco jurídico que atribua aos excedentários tratamento condizente com a dignidade da pessoa humana*» (Andreazza, G. - 2012). Todavia, os embriões humanos não implantados, ainda não possuem um verdadeiro estatuto moral ou seja, a qualidade que confere a uma entidade o ser tida em conta na sua realidade e nos seus interesses, sob o ponto de vista moral que é diverso do ponto de vista legal.

Reconhecemos que a desvalorização estatutária do embrião humano pré implantado, tem favorecido progressos na investigação científica, ainda que não raro se tenham cometido abusos sob o olhar complacente duma parcela significativa da sociedade, alheada das questões bioéticas que se levantam. Podemos exemplificar este paradoxo, recordando que no meio científico e não só, até os animais possuem algum estatuto moral embora com frágil estatuto legal. Até as próprias coletividades e associações, totalmente imateriais possuem estatuto legal ainda que não possuam qualquer estatuto moral [American Academy of Pediatrics (AAP), sic]. Só os embriões humanos continuam excluídos dum estatuto ou condição moral e, esta ausência de tais atributos, permite que sejam submetidos a experiências que não seriam toleradas em quaisquer animais vivos.

Um aspecto satélite à PMA mas com grande peso nas decisões legislativas respeitantes ao embrião humano pré implantado, é o valor que este material biológico gerado e facilmente desprezado têm para os centros de investigação e para a indústria farmacêutica.

A circunstância destes organismos vivos, com potencial de desenvolvimento, serem constituídos por células pluripotenciais altamente cobiçadas, coloca enormes questões. Algumas correntes de opinião, incluindo do meio científico, teimam em olhar para os embriões não como «fins em si mesmos» mas como meros utensílios. Porém, mesmo entre as correntes de pensamento mais utilitaristas, subsiste uma grande

indefinição que permite a intervenção mas, ao mesmo tempo reconhece a necessidade de serem estabelecidos limites.

Ilustrando a ambivalência relativamente ao uso científico versus a atribuição dum estatuto ao embrião e condescendendo como afirma Fernandes (1999) que, “*a vida em si mesma desconhece o seu próprio destino*”, voltamos a citar a respeitada AAP¹⁰⁶, quando declara que:

«...In a pluralistic society, minority views should be respected but should not necessarily determine policy. The development of stem cell lines through the destruction of preimplantation ex utero embryos and research on stem cell lines should be permitted...(...) Minority views can be respected, in part, by the promotion of research into ways to obtain Human Embryonic Stem Cells without destroying embryos».

A Academia Americana mostra reconhecer que é diferente utilizar embriões excedentários ou concebê-los propositadamente para investigação e defende o uso dos embriões legitimamente doados para esse fim. Também é contestado qualquer tipo de incentivo pecuniário, que promova a doação de embriões, temendo que os casais se sintam forçados a doar, por receio de serem preteridos no decurso dos seus tratamentos.

Uma realidade que permite que um embrião seja totalmente privado de direitos e até excluído do primado do ser humano, é suportada por múltiplos interesses e legitimada por um certo tipo de discurso, do qual damos um exemplo concreto e realçamos o quanto se afasta do rigor científico, manipulando a opinião pública:

«...strictly speaking, the early preimplantation blastocyst is not yet an embryo and is more properly called a pre-embryo. For this reason ethics commissions in several nations have approved research on the human pre-embryo up to 14 days because the conceptus is not yet differentiated»

(em tradução livre: «...falando em sentido estrito, o blastocisto não implantado, ainda não é um embrião e é mais adequado ser designado por pré-embrião. Por esta razão, as comissões de ética de muitas nações aprovaram a investigação no pré-embrião humano com menos de 14 dias, uma vez que tal conceito ainda não está diferenciado»).

¹⁰⁶ Academia Americana de Pediatria

Discursos deste género poderão ser considerados falaciosos pois, como outros já tão lucidamente afirmaram (Daniel Serrão, Luis Archer, Jorge Biscaia, Walter Osswald e Michel Renaud entre as nossas principais referências), uma clivagem oportunista do *continuum* do trajeto vital do ser humano, poderá ser entendida como «*uma forma de manipulação da opinião pública, à qual começa a chamar-se “política de linguagem”*» (Serrão, D. – 2003).

Não será difícil encontrar, nas incongruências de definição do que é um embrião humano, ou da eterna questão de quando começa a vida, interesses de natureza seguramente não bioética. Se existissem dúvidas, as mesmas dissipar-se-iam perante alguns escritos que ousam comparar o embrião humano vivo a uma «cultura de tecidos» («...*In this sense, the pre-embryo cells are no different from those in standard tissue cultures*»). Porém, mesmo nestes discursos impregnados de intenções veladas, surge alguma preocupação pelos abusos que uma liberalização da sua utilização poderia acarretar:

«On the other hand, it is true that a human pre-embryo could, in unscrupulous hands, be guided to develop into a human being. The protagonists against cloning maintain that by virtue of the pre-embryo’s special status, it’s wrong to carry out destructive experiments on them»¹⁰⁷

(em tradução livre: «*é verdade por outro lado, que sob mãos menos escrupulosas, poderia ser dada a hipótese a um pré-embrião de prosseguir o seu desenvolvimento humano. Os protagonistas contra a clonagem defendem, que é errado exercer experiências destruidoras sobre os pré-embriões devido a este seu estatuto especial*»).

Sejam quais forem as opções sobre o destino a dar aos embriões excluídos dum projeto parental, esta questão tornou-se uma preocupação para as sociedades que dispõem desta capacidade tecnológica. Embora legalmente só seja permitida a criação de embriões para fins estritamente reprodutivos, existe a facilidade técnica de os gerar e

¹⁰⁷ UNESCO/IUBS/EUBIOS Bioethics Dictionary, pp160 .

utilizar, fora dum contexto procriativo, dando razão às preocupações de numerosos autores:

“Não se pode olvidar que os bancos de embriões, verdadeiros orfanatos de nascituros, surgem em decorrência da fertilização in vitro, sendo em verdade um problema, não uma solução” (Pussi, W.A. - 2005)

No Encontro Anual da ESHRE em 2008, houve pelo menos quatro comunicações sobre o destino a dar aos embriões excedentários e transcrevemos os resultados de um desses estudos:

“Num estudo em França, a maior parte dos 1338 casais inquiridos, escolheu guardar os embriões para futuras gravidezes. Dos 321 que abdicaram de os usar para este fim, a destruição (57 por cento) foi o primeiro destino escolhido, seguido da investigação (29,5 por cento), em último lugar surgiu a doação a outros casais com problemas de fertilidade (13,5 por cento). A menor inclinação para a doação (cinco por cento) repetiu-se num outro estudo, australiano” (23rd Annual Meeting of the ESHRE – 2007).

Como se verifica, as novas potencialidades da PMA desafiam conceitos jurídicos tidos como adquiridos, tais como a parentalidade e o conceito de família e exigem diferentes abordagens. No que diz respeito ao Direito e à necessária reflexão ética, questões de maior complexidade deverão ser discutidas à luz duma busca coletiva de soluções por parte de todos os interessados. Citamos a este respeito o Relatório Preliminar em que Daniel Serrão defendia, já em 2003, um debate alargado sobre a necessidade de regulamentar o uso dos embriões humanos em investigação científica:

“...a caracterização do embrião humano como sobranete ou excedentário tem a óbvia conotação de que é algo de que se pode dispor livremente (...) A utilização de embriões humanos na investigação científica, da qual resulte a destruição dos próprios embriões, não foi nunca pacífica (...) A questão é: que estatuto deve ser concedido a estes embriões – chamados sobranetes, excedentários ou supranumerários – em comparação com o estatuto que é concedido aos embriões incluídos no projeto procriativo parental e que irão

desenvolver-se no útero materno, tal como os embriões resultantes do processo normal e fisiológico de fecundação?”

Voltando ao mesmo autor e à sua posição face ao embrião, com cujo conteúdo nos identificamos, este problema engloba quatro vertentes fundamentais que foram debatidas neste relatório e que são: a natureza biológica e social, a natureza do bem jurídico e a natureza transcendental ou religiosa atribuída.

Não havendo soluções ideais na PMA, porque o ideal seria sempre a sua «não necessidade», uma possível saída para dar ao embrião criopreservado algum direito à liberdade individual, poderia ser o recurso a: “(...) uma acção judicial na qual o juiz decidiria o que é melhor para a pessoa incapaz de manifestar a sua autonomia e auto determinação” (Loureiro, J.- 2006, p. 17). Tal solução, levada ao extremo, entregaria ao Biodireito toda a defesa do embrião, podendo desse modo esvaziar-se o papel da Bioética; todavia, uma vez que “*os indivíduos devem ser tratados como agentes autónomos e as pessoas com autonomia diminuída têm direito à protecção*” (Diedrich G.F. - 2001) tal papel defensivo seria sempre compartilhado com a Bioética, cujas características fundamentais também são a universalidade e a constante evolução.

São inúmeras as questões que se levantam e estamos longe de as equacionarmos todas. Repare-se que, quando se aborda a sensível questão da interrupção voluntária da gravidez, surge invariavelmente a questão do direito à auto determinação da mãe da criança por nascer. No caso dos embriões essa discussão não existe, mas os problemas relativos à tomada de decisão não diminuem, antes pelo contrário. Esta realidade levanta outras questões, como o direito a procriar e o facto de cada um dos progenitores ter contribuído «apenas» com um gâmeta e ninguém «de per si» se poder afirmar «dono» do embrião.

Legislar sobre os direitos humanos é muito diferente de legislar sobre componentes orgânicos ou órgãos para transplante. Nunca é demais recordar que, se nem os gâmetas devem ser vistos como meros «objetos» ou simples «culturas de tecidos», o que dizer dos embriões humanos que transportam consigo uma irrefutável dignidade própria? Estes seres plenos de potencial possuem um valor que é inerente à sua própria natureza e que podemos designar por dignidade humana.

No debate subjacente aos embriões excedentários, prevalece uma divergência de critérios havendo correntes genéticas, embriológicas, neurológicas e outras mais ligadas a valores de cariz jurídico ou religioso. Pode ser que o desejável reconhecimento dum estatuto para o embrião venha a gerar uma complexa espiral de novas questões, tais como: a quem pertencem se é que pertencem, ou quem se responsabiliza pelos embriões excedentários? E qual o destino a dar-lhes?

Sobre o destino a dar aos embriões há várias hipóteses que gostaríamos de referir, numa ordem de exposição que é meramente arbitrária, e não possui qualquer precedência ética:

- Promoção duma futura gravidez de acordo com o projeto parental dos pais.
- Adoção por casais inférteis ou disponíveis, estando esta opção já legalizada mas ainda pouco divulgada.
- Criopreservação prolongada, mantendo-se os embriões “*ad eternum*” como futura fonte de células tronco para a família. À luz dos conhecimentos actuais desconhecem-se outros interesses biológicos, mas é perfeitamente conceitualizável, que possam vir a surgir no futuro.
- Destruição após consenso dum parecer multidisciplinar.
- Uso não procriativo mas do interesse da sociedade, tal é o caso da investigação em células pluripotenciais humanas (atualmente esta opção já é permitida após 3 anos de criopreservação).
- Uma hipótese engenhosa e já recriada por alguns progenitores, consiste em transferir os embriões fora do período fértil. Não sendo a solução mais defensável sob o ponto de vista ético, mimetiza um fenómeno ocorrido naturalmente (muitos embriões que chegam à cavidade uterina, não completam o processo de nidação porque não chegam na «hora certa» ou porque são

eliminados espontaneamente). Promover uma transferência numa fase menos favorável «seria um subterfúgio ético para descartar os embriões congelados»¹⁰⁸.

Perante tantas e tão divergentes opções, prevalece a evidência que a capacidade de resposta da sociedade foi ultrapassada deixando os seus principais agentes muitas vezes sem solução. A título de exemplo citamos o protocolo de 2009 dos hospitais universitários da Escola de Medicina de Warwick, no Reino Unido, que sugeriam de forma bastante eclética, a seguinte e surpreendente opção aos casais seus utentes:

«Alguns grupos mais intervenientes têm-se organizado na defesa do embrião humano por vezes recorrendo a estratégias que poderíamos considerar de contra corrente na sociedade atual. A título ilustrativo, citamos a carta assinada pela coordenadora da primeira agência de adoção de embriões congelados dos Estados Unidos (2009) e endereçada a Nightlight Christian Adoptions¹⁰⁹, na qual se declara que¹¹⁰: O Programa de Adoção de Embriões Congelados Snowflakes ("Flocos de Neve") é um programa da Nightlight Christian Adoptions, uma agência de adoção sem fins lucrativos autorizada pelo Estado da Califórnia. Durante os últimos dez anos procuraram ajudar famílias a encaminharem e a receberem em adoção embriões congelados, que resultaram em 168 crianças nascidas através de pais adotivos».

Os autores do programa de adoção de embriões informaram, que a maioria das crianças assim geradas tinham sido embriões congelados por mais de três anos, até serem implantados na mãe adotiva. Também informaram que à época desta declaração pública, a criança mais velha tinha nove anos e a mais nova teria exatamente uma semana de vida sendo “*fonte de grande alegria e de bênção para as suas famílias*” (Córdoba, J.E., Torres, J.C.S. - 2000)

Não é sem sentido que se chegou a evocar para os embriões, um direito a «*Habes corpus*», reforçando o fundamento desta expressão latina que significa

¹⁰⁸ Questões Éticas sobre o Congelamento de Embriões. Disponível em <http://www.procriar.com.br/tratamentos/congelamento-de-embrioes>

¹⁰⁹ <https://www.nightlight.org/snowflakes-embryo-donation-adoption/>

¹¹⁰ <http://www.uhcw.nhs.uk/ivf/treatments/cryopreservation>

literalmente “que tenhas teu corpo”. A expressão usada no âmbito do Direito, refere-se a um direito constitucional, que dá liberdade temporária a alguém colocado na iminência de sofrer um cerceamento de direitos ou algum tipo de violência. Concedido o «*Habes corpus*», readquire-se o direito a dispor do próprio corpo da maneira que se escolher, algo de que o embrião humano criopreservado ou não, está totalmente impossibilitado (Magalhães, V.)¹¹¹.

Outra solução conveniente para os embriões excedentários poderia estar numa hipótese que transcrevemos:

«... surge um encaminhamento rápido, capaz de atender aos imperativos das novas técnicas de fertilização e, ao mesmo tempo, preservar o respeito pela dignidade humana, a saber: a doação de pré-embriões, e não a simples adoção, como uma proposta respeitável, jurídica, ética e politicamente. (Pereira, G.O., Pacifico, A. P., 2010)

A complexidade do destino a dar aos embriões excedentários, seria menor se nos focássemos nos seus superiores interesses. Dito por outras palavras, porque é que os progenitores impossibilitados de se responsabilizarem pelo futuro dos seus embriões, não são incentivados a optar pela doação como acabámos de referir? Devemos interrogar-nos porque é que o destino dos excedentários diverge tanto daquele que é reservado às crianças já nascidas, ou aos próprios nascituros, cujas mães não querendo interromper a gravidez, optam antecipadamente por os «doar» para adoção.

Graças à progressiva tomada de consciência da sociedade, a questão dos direitos do embrião saiu dos meios científicos e conquistou todos os que se preocupam com os seres privados de autonomia. Partilhamos totalmente a ideia de quem afirmou que «*Uma coisa é certa, se ninguém pode deter o avanço da ciência, sempre será de exigir um compromisso com a ética e com a dignidade humana*» (Galante, F. - 1997) e subscrevemos com Daniel Serrão, a esperança de encontrar uma solução e um estatuto

¹¹¹ Pesquisa e texto de Vivian Magalhães in <http://jovemdez.no.comunidades.net/index.php?pagina=1026031840>

digno para o embrião humano artificialmente concebido, que liberte a sociedade contemporânea de algum desnorte em que se tem deixado arrastar.

2.5.4 – A questão das células tronco embrionárias

As células embrionárias de várias espécies possuem a capacidade única de gerarem todas as outras linhagens celulares, ao contrário das células pluripotenciais dos organismos adultos e, por esse motivo são designadas células tronculares ou estaminais, designação equivalente a *stem cells* da nomenclatura anglo-saxónica (Osswald, W., CNECV - 2004). Além desta característica única, as células retiradas de um embrião em estado de blastocisto são capazes de se multiplicar *in vitro* (pelo menos 200 vezes) e dar origem a vários tipos de células diferenciadas.

As células estaminais sobrevivem em cultura, por tempo indeterminado, graças a uma elevada capacidade auto regenerativa, e podem ser congeladas sem perda deste potencial. Devido a estas características ímpares, os embriões e os seus subprodutos constituem um manancial de reserva celular precioso, com reconhecido interesse económico e científico. O contributo da investigação realizada sobre embriões tem sido tão determinante para importantes avanços das ciências médicas, nomeadamente para o conhecimento de doenças infantis que tal facto facilitou uma quase desobediência e um certo laxismo legislativo, relativamente ao uso de embriões em estado pré implantatário.

O problema principal quando se aborda a questão das células estaminais, não é tanto a investigação mas sim a legitimidade da sua proveniência (A.A.P., *Committee for Pediatric Research and Committee on Bioethics* – 2012). Embora se deva reconhecer que o embrião no estado de blastocisto merece respeito e é algo mais do que um simples aglomerado de células, devido ao potencial nele existente de evoluir até pessoa (Osswald, W., CNECV - 2004), nem sempre é respeitada uma ética defensora e principialista, prevalecendo o mero utilitarismo.

Paralelamente aos progressos que a investigação com células pluripotenciais tem permitido, incluindo a previsão futura do seu uso terapêutico, avoluma-se a suspeita, de que a manutenção e manipulação destas células pode vir a acarretar riscos porque ninguém sabe ao certo como se irão comportar *in vivo* (A.A.P., *Committee for Pediatric Research and Committee on Bioethics* – 2012). As

preocupações que existem relativamente à manipulação de células pluripotenciais são naturalmente extensíveis aos gâmetas e aos embriões conservados em laboratório.

Outra preocupação que se avoluma, é se o crescente recurso às tecnologias da PMA não poderá perturbar o equilíbrio genético que levou séculos a estabelecer e cujas regras não são totalmente conhecidas. Se por um lado existem aspectos muito positivos nesta tentativa de minimizar erros naturais, por outro lado crescem receios de potenciais riscos e abusos. Poderá ser um receio mais imaginário do que real, mas obriga os investigadores a refletir sobre as suas práticas e suscita o debate, levando a sociedade a questionar-se sobre a hierarquia dos valores éticos a preservar.

2.5.5 – Criopreservação embrionária e neuroética

Entre os mais importantes avanços da Medicina da Reprodução, inclui-se a criopreservação embrionária, descrita em 1983 e bem-sucedida desde 1984 (Wang J., Sauer, V. M. – 2006). Esta tecnologia veio possibilitar a utilização diferida dos embriões e diminuir os custos humanos e materiais da PMA, ao reduzir os riscos decorrentes das repetidas estimulações ováricas e tentativas de fertilização. A par das inegáveis vantagens, surgiram questões que evidenciam a necessidade de compatibilizar os avanços científicos com os direitos fundamentais dos progenitores e dos seres humanos assim concebidos.¹¹² As questões levantadas pela crio preservação embrionária não são só médicas e ético jurídicas mas igualmente morais e religiosas. Porém, ultrapassados os problemas ético morais decorrentes da destruição embrionária, poderão vir a surgir novas questões face aos riscos biológicos desconhecidos (causados entre outros factores pelo congelamento e manipulação térmica posterior).

Não sendo a crio preservação o cenário ideal para o início da vida humana, transformou-se em poucos anos numa realidade incontornável e, prevê-se que no futuro se venha a multiplicar pois será problemático destruir material biológico mantido em boas condições. Antes das restrições legais que foram surgindo na generalidade dos

¹¹² Declaração sobre o uso do progresso científico e tecnológico no interesse da Paz e em benefício da Humanidade Proclamada pela Assembleia Geral das Nações Unidas em 10 de Novembro de 1975 - Resolução n.º 3384 (XXX).

países, chegaram ao conhecimento público casos de crianças aparentemente saudáveis nascidas de embriões que estiveram congelados mais de dez anos (Wilson, C., et al. – 2006). Com o desenvolvimento das novas técnicas de vitrificação, que alargam as possibilidades de sobrevivência intacta, poderão aumentar as questões relativas ao tempo de armazenamento legalmente permitido. Independentemente da lei ou dos limites prováveis da viabilidade biológica, ninguém conhece ao certo o impacto da criopreservação sobre os embriões, e esta dúvida irá permanecer por muito tempo, tornando-se uma prolongada fonte de surpresas.

Aqueles que contestam a criopreservação embrionária assentam a sua argumentação muitas vezes em polos opostos. Existem opositores de algumas tecnologias da PMA cuja argumentação é bastante afirmativa da sua postura contra corrente, contrária ao utilitarismo atual e bastante plausível:

“...no parece conforme a la dignidad humana el que los seres humanos, en su fase incipiente, padezcan la detención de sus funciones biológicas. Al contrario, la práctica de crioconservación de embriones humanos refleja una pérdida del sentido del valor de cada ser humano individual. (...) La congelación no sólo es un hábitat no acorde con la dignidad del viviente individual humano, sino expresión de una voluntad que determina y decide la vida humana de los débiles, y por la que la dignidad del embrión se reduce al valor de uso con fecha de caducidad” (Germán Zurriarán, R. -2007).

Alguns países (Alemanha e Dinamarca entre outros) evitam o problema, destruindo os embriões não utilizados logo após a fertilização, mas é uma atitude extrema e muito pouco consensual. Tratar um problema evitando que ele exista, pode parecer uma boa solução mas a prática mostra que é difícil evitar que sejam produzidos embriões em excesso. Um elevado rigor legal implica a destruição de muitas vidas potenciais e de muitos projetos parentais.

Os óvulos fecundados só são congelados porque os progenitores desejam ter mais filhos, ou receiam que a primeira tentativa de implantação seja mal sucedida. Considerando então que esta realidade só pode ser minimizada mas não deve ser eliminada, impõe-se decidir o que fazer aos embriões excedentários. Nesta matéria os

dilemas não se colocam apenas em relação ao futuro, mas igualmente nas tentativas para solucionar os erros acumulados do passado¹¹³.

Nos países que permitem a preservação embrionária há mais opções, mas persiste a ameaça da destruição. Sob o princípio da legalidade, em que o que não é proibido é permitido e, não havendo interdição legal à destruição, pode cair-se no facilitismo da eliminação pura e simples dos embriões em estado pré-implantatório. Alguns países como a Bélgica e os Estados Unidos, cientes do valor biológico e científico, incentivam a doação dos embriões para investigação científica, promovendo uma solução legal, mas que também se revela muito utilitarista e pouco humanitária. Destacámos entre muitos comentários (Ferreira, A.F. – 2002) um que consegue resumir de forma acutilante as várias vertente deste problema:

“a produção excessiva de possíveis vidas humanas, como se fossem objetos de consumo ou meros instrumentos a justificar o desejo dos casais de terem filhos, dá-nos a sensação de que a espécie humana não é nada mais do que um meio, e não um fim em si mesmo”.

Paralelamente ao dilema ético jurídico inerente à existência de embriões excedentários, mantem-se a dúvida sobre a integridade futura daqueles cuja concepção foi artificial ou que foram submetidos a processos de criopreservação. Relativamente aos aspectos neurofisiológicos decorrentes das técnicas da PMA, a situação é particularmente complexa porque paira a ameaça do desconhecido. Pela sua novidade, as questões que se levantam com as novas tecnologias, transcendem os atuais conhecimentos científicos e podem vir a afetar a comunidade humana como um todo, originando um complexo problema bioético.

Apesar da consequência mais grave de toda a iatrogenia ser a lesão sobre um novo ser, tantas vezes pior aceite do que a sua própria morte, não existem estudos suficientes sobre os efeitos a longo prazo da PMA e da criopreservação sobre o

¹¹³ Trata-se de uma questão confessadamente não resolvida, sejam quais forem os princípios éticos dos participantes deste debate.

<http://www.bioeticaweb.com/aies-lascito-adoptar-embriones-congelados-para-salvar-su-vida/>
<http://www.bioeticaweb.com/rescate-y-adopcion-de-embriones-criopreservados-solidaridad-o-encarnizamiento-reproductivo/>

nascituro, porque o foco da investigação tem estado mais centrado na capacidade e êxito procriativos. Conhecer melhor estes mecanismos, pode conduzir a estratégias preventivas ou curativas de extrema importância para os indivíduos afetados ou em risco (O'Connell M.E., et al. – 2009).

Tal como descrevemos ao longo deste trabalho, há factores extrínsecos que modificam a expressão genética e a produção de derivados proteicos celulares, levando a que o desenvolvimento neurosensorial e cognitivo do ser humano seja afetado, tanto pela experiência como pelo ambiente em que cresce e é gerado. Muito curiosa é a evidência, de que há factores ambientais que são capazes de afetar processos epigenéticos no cérebro humano. Ao contrário das mutações genéticas que são estáveis, as mutações epigenéticas são reversíveis. Quanto mais jovem é o organismo, mais susceptível é o seu epigenoma à mudança e, descobrir esses factores de proteção e estabilidade, pode vir a ter grande impacto futuro.

Após a nidação, a sobrevivência e o crescimento do novo ser vão depender da placenta. As células da placenta em desenvolvimento sofrem uma extensa metilação do seu ADN e a regulação epigenética varia ao longo da gravidez. A fase embrionária é de todas a mais vulnerável às circunstâncias ambientais porque os factores que interagem com o ambiente, modulam de forma definitiva o neurodesenvolvimento. A má nutrição por exemplo, é um facto susceptível de alterar a neuro transmissão e afetar o desempenho cognitivo, com todas as implicações que daí possam advir. Ainda que uma reposição e normalização posterior compensem alguns dos efeitos duma carência prévia, nunca se conseguirá reverter a totalidade dos danos causados porque tais ações foram exercidas em fases diferentes e irrepetíveis do desenvolvimento.

Uma área de investigação que merece atenção, é a que relaciona carências em oligoelementos, prévias ou concomitantes à gravidez, com alterações mais tardias do neurodesenvolvimento fetal. Em estudos sobre a intoxicação crónica por metais pesados, verificou-se por exemplo, que para cada aumento sérico de 1 micrograma de chumbo, podia surgir um declínio cognitivo de 0,87 pontos percentuais no quociente de inteligência. Uma possível explicação é que o chumbo tende a depositar-se nas células do cérebro infantil. Sabe-se igualmente que a carência em ferro, afeta o desenvolvimento cerebral devido à sua interferência na neurogénese, na mielinização e na transmissão nervosa das células. Os défices de ácido fólico por sua vez estão

associados a alterações do tubo neural e a sua administração a mulheres férteis ou gestantes, é considerada boa prática porque reduz a incidência deste tipo de patologia (Haider, B.A., Bhutta, Z.A. - 2012).

Os factores epigenéticos modulados pelo ambiente vão-se acumulando ou extinguindo e, na idade adulta, cerca de um terço dos gémeos monozigóticos já exprime diferenças na metilação ou na modificação das histonas, sendo de admitir que estas diferenças façam variar a suscetibilidade às doenças. O próprio ambiente emocional da mãe durante a gestação ou nos primeiros tempos de vida, pode ter implicações permanentes na vida dos indivíduos.

Os perfis de metilação de alguns genes específicos derivados de tecidos cerebrais (nomeadamente o gene do factor neurotrófico cerebral/ *brain-derived neurotrophic factor gene*) poderão um dia servir como bio marcadores da depressão. Outra evidência, que já foi identificada, é a que relaciona antecedentes de abuso infantil com mudanças epigenéticas no recetor glucocorticoide do gene NR3C1 do hipocampo.

Voltando aos efeitos do meio sobre os organismos em desenvolvimento, damos conta da sua importância, mas nunca chegaremos a conhecer todos os aspectos implicados, quer na fase embrionária quer nos estádios subsequentes porque, a todo o momento são identificadas novas e importantes interações. O que parece irrefutável tanto na reprodução natural como na PMA, é que ainda há muito por descobrir sobre os inúmeros factores que influenciam e interagem nos processos de desenvolvimento.

A estimulação ovárica cautelosa e as transferências embrionárias mais seletivas (feitas de preferência com embriões únicos), têm conduzido a menos casos de pré eclâmpsia materna e de encefalopatia infantil, embora as desvantagens em relação à gravidez espontânea se mantenham (Finnstrom et al. - 2011). Circunstâncias desta natureza poderão vir a afetar gerações de crianças concebidas artificialmente, bem como a sua descendência, mas podemos perspetivar intervenções nutricionais ou farmacológicas que sejam benéficas e contribuam para uma possível reversão de efeitos desfavoráveis. (Victoria, K., Cortessis, K.V., Duncan, C., et.al. – 2012).

As oportunidades científicas muitas vezes advêm de circunstâncias adversas e geram inesperados horizontes de investigação. Um exemplo do que acabámos de dizer,

foram as descobertas relativamente à síndrome do X frágil, que é a causa hereditária mais frequente de atraso mental em crianças. O gene envolvido na ocorrência desta síndrome, codifica a produção de uma proteína vital para o desenvolvimento cerebral e existe sob a forma de mutação silenciosa, nos portadores da deficiência. Foi no âmbito da investigação e das dificuldades de obtenção de células tronco embrionárias, que se verificou que este gene ainda funciona normalmente nas células embrionárias humanas, mas pode ficar inativo à medida que as células se diferenciam. O referido gene já está silenciado nas células estaminais, que não são embrionárias, embora ainda sejam pluripotentes. Se não tivesse havido a oportunidade de estudar as circunstâncias, numa e em outra fase do desenvolvimento destes doentes, não se teriam podido tirar tais conclusões.

Outras patologias cuja relação com a PMA está bem estabelecida e que se relacionam com os mecanismos de imprinting genético são, como vimos, as síndromes de Beckwith-Weidemann (1 para cada 10 000 nascimentos) que resulta duma deficiente metilação de vários genes e a síndrome de Angelman (1 para cada 12 000 nados vivos) que resulta da perda do alelo materno UBE3A. A Síndrome de hipometilação materna, o Retinoblastoma e a Síndrome de Silver – Russell, entre outras doenças raras, também têm sido associadas a estes mecanismos de transmissão e são mais frequentes nas situações de PMA. Também se sabe que existem sempre diferenças entre os gémeos monozigóticos, que decorrem da informação epigenética e que vão aumentando ao longo da vida. Daqui se deduz a enorme importância das condições de fertilização e de crescimento inicial, que podem condicionar a própria expressão do genoma.

As inovações técnicas abrem horizontes desconhecidos no que respeita às repercussões biológicas. Existindo informação que sugere riscos, a médio e a longo prazo (Ceelen, M., et al. – 2009) sobre a integridade do embrião humano concebido com PMA, devemos prosseguir na procura de condições e procedimentos seguros. Os processos de fertilização e as técnicas de diagnóstico pré-implantatório deverão ser alvo de avaliação (Steel AJ, Sutcliffe A. 2009) bem como as condições termo biológicas de amadurecimento in-vitro, a criopreservação e o *follow-up* do desenvolvimento dos seres humanos artificialmente concebidos (Liebaers, I. – 2009), (Basatemur, E., Sutcliffe, A. – 2008).

Não será fácil, podendo mesmo ser impossível, avaliar a repercussão das várias etapas que vão desde os primeiros exames dos indivíduos que se pressupõem inférteis, até ao fim da desejada gravidez e evolução da sua descendência. Perante o receio de se poder estar a criar uma geração transgénica, passe o exagero do termo, mais importante do que resolver um dia os problemas, será evitá-los antecipadamente.

As melhores expectativas poderão ser defraudadas, se não se tiverem em conta os aspectos mais subtis das condições ambientais do embrião humano criado *in vitro*. São circunstâncias reais e que exigem respostas, para que se salvaguardem os direitos essenciais, a integridade do ecossistema em que vivemos e o porvir destes seres humanos que, mesmo sendo excedentários, permanecem «plenos de potencial».

No campo da PMA insinuam-se preocupações neuroéticas, se assim as podemos designar, respeitantes ao início da vida e conseqüentemente à evolução da nossa espécie mas só o futuro poderá revelar o seu impacto biológico no nosso ecossistema, porque as técnicas são recentes e estão em permanente evolução.

Consideramos eticamente desejável, por tudo o que foi dito, que se mantenha e aprofunde a investigação nas áreas de prevenção e que os embriões humanos nunca sejam excluídos do *Primado do ser humano*, de acordo com o artigo 2º da declaração de Oviedo onde se afirma que : “os interesses e o bem-estar do ser humano deverão prevalecer sobre o interesse exclusivo da sociedade ou da ciência” (em Martinho da Silva, P., - 1997).

2.5.6 – Desafios e enigmas futuros

Face à possibilidade de manter por tempo indeterminado, seres biologicamente autónomos passíveis de sobrevivência ou de destruição, numa fase do desenvolvimento absolutamente crucial e em que se inscrevem os padrões do seu futuro, é legítimo reexaminar efeitos irreversíveis. Todos os avanços tecnológicos, a par de indiscutíveis melhorias no tratamento da infertilidade, podem vir a determinar mudanças para o futuro da nossa espécie.

Vejam os casos, já tornados realidade e amplamente divulgados nos meios de comunicação, em que foram geradas crianças com a participação de três indivíduos.

Situações em que um progenitor funciona como dador de sémen, outro como dador do ovócito e outro ainda como ventre de acolhimento após a necessária FIV ¹¹⁴. Com os avanços da engenharia genética não é difícil antever quimeras humanos cujo ADN provenha de uma multiplicidade de dadores, na tentativa de construção de algo tão absurdo como «um ser humano perfeito» (Stock, G. – 2002). Mantem-se também a perspectiva de, num futuro próximo, se poder ver consumada a clonização de seres humanos ou surgirem parentalidades narcísicas, entregues a um único indivíduo, mesmo que um prevalente bom senso tenha conseguido travar, até agora, tão aberrantes experiências.

As células tronco ou células estaminais por serem «células não especializadas», conservam a capacidade de se auto replicarem em cópias idênticas e de se diferenciarem originando diversos tecidos. As células pluripotenciais oriundas dos embriões possuem uma capacidade de diferenciação intacta, o que lhes confere imenso valor e potencial terapêutico, mas a sua obtenção acarreta problemas éticos indiscutíveis.

Em 2005, um investigador sul coreano protagonizou uma famosa fraude científica, que escapou ao controle e chegou a ser publicada na prestigiada revista Science. Hwang Woo Suk e a sua equipa universitária, afirmaram ter obtido células tronculares de embriões a partir da clonização de células de doentes. A ser verdade, teria constituído um importante avanço científico. Acontece que tal sonho quimérico veio anos mais tarde a tornar-se parcialmente real quando outro investigador da Universidade de Kyoto, conseguiu obter células precursoras de espermatozoides, as chamadas “células germinativas primordiais” a partir de células tronco provenientes de embrião de ratinho. Aquelas células, verdadeiramente pluripotenciais, deram depois origem a espermatozoides que fecundaram óvulos e geraram descendência aparentemente saudável (Hayashi K., et al. – 2011) Os autores dizem esperar que o desenvolvimento desta técnica possa vir a resolver muitos casos de infertilidade e que em breve as

¹¹⁴ Diz-se que a maternidade é sub-rogada quando o embrião dum casal é implantado no útero de outra mulher (pejorativamente designada por «ventre de aluguer») e que a maternidade é compartilhada quando uma mulher contribui com o seu ovócito e é inseminada com o sémen oriundo dum individuo ou casal, com quem estabeleceu contrato, de entregar a criança no fim da gestação. Esta prática não está prevista na legislação portuguesa a qual determina que mãe é a mulher que gera a criança independentemente da origem biológica.

pesquisas evoluam para protocolos bem estabelecidos e seguros, que ofereçam aos homens azoospermicos, a possibilidade de gerarem filhos biológicos¹¹⁵

Em 2006 a equipa dirigida por Shinya Yamanaka da Universidade de Kioto (Prémio Nobel da Medicina e Fisiologia em 2012) descobriu que era possível «reprogramar» células adultas (*nuclear reprogramming*) ou seja, restituir às células adultas alguns dos atributos das células pluripotenciais, evitando assim o recurso às células embrionárias, cuja utilização levanta tantas questões éticas. Estas células reprogramadas denominam-se *células tronco pluripotenciais induzidas* ou *induced pluripotent stem cells (iPSCs)* na terminologia inglesa, e foram obtidas mediante a inclusão de quatro genes no seu ADN. A técnica embora muito inovadora revelou-se lenta, pouco eficaz e foi rapidamente ultrapassada por outras descobertas. A obtenção de células tronco a partir de células da pele (*iPSCs*) capazes de virem a ser usadas terapêuticamente, valeu a este investigador de células estaminais, o prémio Nobel em 2012.

A reprogramação nuclear das células já tinha sido comprovada por Sir John Gurdon, em 1962, quando reportou o nascimento de rãs *Xenopus laevis* obtidas pela transferência de núcleos de células intestinais da rã para os seus próprios ovócitos enucleados. Mais tarde em 1997, a equipa de Sir Ian Wilmut obteve o nascimento tão mediático da ovelha Dolly, que foi o primeiro clone de mamífero obtido com a técnica de transferência nuclear. Estes seres artificialmente concebidos vieram provar que o genoma ADN das células maduras possui, pelo menos em teoria, toda a informação para dar origem a um novo ser.

Um avanço mais recente (2001) foi obtido por Takashi Tada da Universidade de Kyoto, que provou que os timócitos do rato (células provenientes do timo e implicadas na defesa imunitária) tornam-se pluripotentes quando são electro fundidos com células pluripotenciais dessa mesma espécie. Aquele facto indica, que as células pluripotenciais

¹¹⁵ <http://www.sciencedaily.com/releases/2011/08/110804123857.htm>

também possuem factores capazes de induzirem a característica pluripotencial em células somáticas.¹¹⁶

Os investigadores procuravam o «gatilho» que aparentemente faz reverter, e sincroniza, a programação celular das células tronco. Em 2006, Shinya Yamanaka publicou na «*Cell*» a descrição bem-sucedida das células IPS no rato, recorrendo apenas a quatro factores e segundo um processo mais simples que o previsto e que já foi reproduzido com sucesso por outros laboratórios. Em 2007 o mesmo êxito foi alcançado com células humanas, mais concretamente fibroblastos da pele, em que foram introduzidos os quatro factores celulares recorrendo a vetores virais.

Sendo capazes de se diferenciar em praticamente todos os tipos de células ou de se conservarem e multiplicarem como células pluripotenciais, as células IPS têm um enorme potencial clínico e farmacológico. Podem estudar-se, os efeitos dos fármacos ou das doenças, em amostras celulares e, no futuro, prevê-se que irá ser possível fazer transplantes, ou reverter o destino celular, levando células adultas a voltarem ao seu estado embrionário¹¹⁷.

O grupo de Hanna et al. liderado por Noa Novershtern, do Departamento de Genética Molecular, juntamente com membros do *Institute's Israel Structural Proteomics Center*, identificou uma proteína chamada MBD3, de função anteriormente desconhecida, com a particularidade de estar presente em todas as células e em todas as fases do desenvolvimento. É uma característica rara porque proteínas específicas só são produzidas, por um determinado tipo celular, em fases bem definidas do percurso existencial e visando objetivos específicos. Esta equipa de investigação apercebeu-se numa exceção, na expressão universal desta proteína, e que ocorre nos três primeiros dias após a concepção. O óvulo fertilizado divide-se mas ao fim de três dias ainda existe um embrião constituído só por células pluripotenciais. Ao quarto dia inicia-se a diferenciação e as células embrionárias começam a perder esta característica de serem pluripotenciais. É exatamente nesta fase que aparecem as proteínas MBD3. A descoberta revelou ter implicações na produção de células (iPSCs) para uso terapêutico.

¹¹⁶ Shinya Yamanaka - Biographica. *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2014.

<http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2012/yamanaka-bio.html>

¹¹⁷ Idem

Shinya Yamanaka usou vírus para inserir os quatro genes na célula mas, por questões de segurança, a reprogramação celular visando terapêutica humana não utiliza este método. A omissão dos vírus reduz significativamente a eficiência de todo o processo, mas se a proteína MBD3 for retirada das células adultas a eficiência e a velocidade do processo voltam a aumentar de forma notável. Hanna et al. salientam que os resultados foram alcançados partindo da investigação das vias naturais do desenvolvimento embrionário e afirmam: "*Scientists investigating reprogramming can benefit from a deeper understanding of how embryonic stem cells are produced in nature. After all, nature still makes them best, in the most efficient manner.*"¹¹⁸ Não podíamos estar mais de acordo com este parágrafo redentor que foi extraído da publicação citada.

Atualmente conseguem-se células tronco a partir de numerosos tecidos orgânicos, como sejam os embriões criopreservados no azoto líquido (-196 °C), os blastómeros individuais, os ovócitos cativados por transferência nuclear e as células pluripotenciais retiradas do líquido amniótico e do sangue do cordão umbilical. Também se obtêm células tronco adultas hematopoiéticas e da medula óssea, assim como provenientes da gordura corporal dos adultos e todas estas células têm potencial clínico (Planas Ribo, J., Coronel Gagliardi, R. – 2011).

As células pluripotenciais assim obtidas têm fins terapêuticos, nas áreas da hematologia, cardiologia e neurologia mas há autores que denunciam o seu uso. Aznar, J. e Gómez, I. numa publicação em 2012, denunciaram de forma acutilante que são muito poucos, os ensaios clínicos em curso, que têm objetivos terapêuticos (*Hasta lo que conocen los autores, hasta la fecha, están en curso tan sólo tres ensayos con objetivos terapéuticos, aunque no todos se han iniciado para incluir a pacientes, y naturalmente ninguno de ellos ha obtenido todavía resultados clínicos evaluables*).

Em relação às avançadas técnicas de reprogramação celular que descrevemos, alguns autores também se interrogam sobre riscos colaterais e voltam a evocar os valores éticos que a ciência não deverá descurar: "*no existiendo una común concepción de la vida humana en Europa, pueden surgir en un futuro próximo problemas de índole*

¹¹⁸ Weizmann Institute of Science. Stem cell reprogramming made easier. Science Daily. 2013. <http://www.sciencedaily.com/releases/2013/09/130918132449.htm>

ético a la hora de patentar, a nivel europeo, los resultados de estas técnicas de reprogramación celular embrionária” e insistem numa oportuna reflexão (...) de «La posible aplicación eugenésica de estas tecnologías, en concreto, ha despertado inquietudes. (...)». (Landeweerd, L. - 2009).

Estas preocupações justificam quanto a nós, a referência que fizemos aos efeitos da manipulação ambiental da embriogénese sobre os mecanismos genéticos e às implicações que tal interferência pode acarretar.

Conciliando a curiosidade e o interesse científico, com a defesa do ser humano em todas as fases da sua existência, realizámos para esta dissertação, uma investigação centrada no neurodesenvolvimento de crianças reais, submetidas a criopreservação na sua fase embrionária. Os estudos sobre esta matéria que se inclui na nossa experiência profissional, têm vindo a evidenciar riscos ainda pouco conhecidos, mas que se admite serem modulados por esta interação entre a genética e o ambiente artificial criado pela PMA.

2.6 NEURODESENVOLVIMENTO INFANTIL . CONSIDERAÇÕES E AVALIAÇÃO

2.6 NEURODESENVOLVIMENTO INFANTIL . CONSIDERAÇÕES E AVALIAÇÃO

2.6.1 - Considerações sobre o desenvolvimento humano

A sociedade persiste em esperar, que a Biologia consiga um dia responder à eterna questão de quando começa a vida, ou qual é o momento crucial em que se inicia o desenvolvimento dum indivíduo. Apreciamos sobremaneira a perspectiva de António Coutinho, sobre esta questão, quando diz¹¹⁹:

«Quando nos emocionamos com o nascimento de uma criança, com o desabrochar das flores na primavera a partir das sementes que plantámos, pensamos que se trata de “novas vidas”, mas apenas por que não pensamos dois segundos: estas novas vidas, germinaram de sementes ou de células que já estavam vivas elas próprias, ou seja, de novas, estas vidas não têm nada. Vida há só uma e só aconteceu uma vez.»

O estudo do desenvolvimento humano é uma área fascinante mas muito complexa, porque às suas insondáveis questões constantemente afluem novos dados. Sejam quais forem as interpretações sobre a origem da vida, o que podemos afirmar é que o desenvolvimento dum novo ser é dinâmico, já que influencia e é influenciado pelo meio em que ocorre. Esta permanente interação já tinha acontecido nas gerações anteriores, num *continuum* cuja origem é desconhecida.

O desenvolvimento cumpre a sua ordem natural que é prosseguir e, sobre este percurso ininterrupto, gostaríamos de evocar Daniel Serrão, quando nos recorda que “(...) a vida humana é um processo contínuo. A conjugação de uma célula viva, o espermatozoide, com outra célula viva, o óvulo, produz um ser unicelular, também vivo” (Daniel Serrão – 1999), ou seja, um processo onde está tudo interligado. Sob o ponto de vista ontológico também “...não é possível fixar ao ser humano um ponto de partida cronológico da sua dimensão pessoal, que não seja o momento da concepção”

¹¹⁹ CNECV, Da célula ao embrião, pag 19, 2004

(Isabel Miranda – 1998) mas, relativamente a outras coordenadas do desenvolvimento, não podemos afirmar que tal «ponto zero» realmente exista e muito menos fixá-lo.

Diferente é a eterna questão bioética, sobre a origem do ser, a qual mantém em aberto a definição de «pessoa» e de «personalidade», que são atributos sociais e não são conceitos biológicos (Scott, F. G. – 2013). Determinar o momento em que se estabelece a qualidade de «ser pessoa» não é uma questão científica nem algo que possa ser respondido. Walter Osswald recorda-nos que haverá diversas maneiras de entender o estatuto ontológico do embrião: para uns, o zigoto (ovócito fertilizado) já teria adquirido o estatuto de «pessoa» na altura da concepção enquanto para outros tal atributo viria mesmo depois do nascimento. Entendimentos nesta área nunca serão unânimes e há pelo menos quatro **correntes científico filosóficas** com diferentes fundamentos **sobre a origem da vida** e o momento fulcral do início do ser humano:

Fertilização – As interpretações que defendem que a vida se inicia com a fertilização ou seja, com o momento em que é adquirido o genoma, têm fundamento genético. Os críticos desta posição argumentam, que o estabelecimento da individualidade pode ser posterior, uma vez que os gémeos monozigóticos são indivíduos distintos, apesar da fertilização simultânea e de possuírem um ADN basicamente idêntico. Esta corrente de opinião tem a seu favor factos irrefutáveis, mas tem contra si a circunstância dos gémeos monozigóticos poderem ser discrepantes e biologicamente distintos mostrando que a genética não se limita exclusivamente às cadeias do ADN.

Gastrulação – quem defende a fase de gastrulação como marco inicial, baseia-se na circunstância dos gémeos ainda poderem sofrer modificações estruturais até ao momento da gastrulação¹²⁰ mas já não a partir daí. É nesta fase que se consolida a individualização e se admite que as células recebem a «informação» definitiva sobre o rumo que irão seguir. No embrião humano a gastrulação ocorre por volta do 14º dia após a fertilização. Esta interpretação justifica as posições de alguns países (Inglaterra e Canadá) que autorizam a investigação em células embrionárias pluripotenciais desde que sejam realizadas até esta fase da individualização.

¹²⁰ A gastrulação segundo Keith Moore in Embriologia Clínica, 9ª edição, 2013 «é o processo formativo mediante o qual as três camadas germinativas precursoras de todos os tecidos embrionários e a orientação axial são estabelecidas»

Actividade elétrica cerebral (EEG) – Alguns biólogos argumentam que a personalidade do indivíduo só se estabelece quando a actividade elétrica cerebral pode ser registada, facto que ocorre por volta da 26ª semana com os aparelhos de registo existentes. Por outro lado, o desaparecimento da actividade cerebral é aceite como o principal sinal da morte do indivíduo, facto que legitima a transplantação de órgãos. Curiosamente, esta postura de base científica, tem algum paralelismo com as posições pré-científicas de S.Tomás de Aquino, quando defendia que o corpo adquire a sua alma algum tempo após a concepção e na altura em que a consciência é possível.

Acontece porém, que a vida extra uterina já é possível muito antes das 26 semanas de IG, e o essencial do neurodesenvolvimento humano já está definido neste estágio. Se não é captada actividade elétrica cerebral antes de determinada idade, não significa que não exista. Em rigor, a única coisa que podemos afirmar é que os instrumentos de que dispomos actualmente, não permitem detectar qualquer actividade cerebral antes de determinado estágio do desenvolvimento fetal.

Viabilidade e nascimento – há quem defenda que a individualidade exige e depende dum nascimento com vida porque, até aí, o indivíduo depende do organismo materno para a sua sobrevivência. É curioso verificar que apesar desta teoria ter numerosos opositores, sob o ponto de vista teológico judaico cristão até é, de certa maneira, a posição das Sagradas Escrituras ou pelo menos da interpretação que delas habitualmente se faz. A Bíblia evidencia uma postura natalista, revelada no confronto entre o que está escrito no Livro de Genesis 9:6 « *Quem derramar o sangue do homem, pelo homem o seu sangue será derramado; porque Deus fez o homem conforme a sua imagem ...* » e o que é afirmado no Livro do Êxodo 21:22 que diz: « *Se alguns homens pelejarem, e um ferir uma mulher grávida, e fôr causa de que aborte, porém não havendo outro dano, certamente será multado, conforme o que lhe impuser o marido da mulher, e julgarem os juízes* ».

Um aspeto biológico e aparentemente irrefutável do desenvolvimento humano é a circunstância de existirem «**períodos de conclusão**» nas diversas etapas do desenvolvimento, a partir das quais determinadas mudanças, como por exemplo os

efeitos teratogénicos, são insusceptíveis de ocorrer (Warkany, J. - 1971)¹²¹. Não existe porém, um período suficientemente prévio para que efeitos exercidos sobre estruturas não se possam manifestar no futuro. Ou seja, as ações exercidas sobre os embriões poderão vir a manifestar-se muitos anos depois mas nunca se irão repercutir, sobre uma etapa biológica já concluída. Concretizando com um exemplo: se um determinado insulto ambiental não determinou nenhuma malformação (cerebral ou outra) durante a embriogénese, a mesma não irá ocorrer ao longo da vida (Volpe, J. - 2001). Fica no entanto uma importante interrogação no ar: será que a descendência desse indivíduo está livre de qualquer dano transmitido por factores latentes, ambientais e epigenéticos?

À luz dos conhecimentos actuais, a concepção marca o início do processo de desenvolvimento infantil mas, talvez no futuro já possamos avaliar o impacto das circunstâncias prévias à fecundação, suscetíveis de terem tido, ou de virem a ter, influência no devir dum indivíduo ou duma comunidade.

Recuando à origem da palavra desenvolvimento, que deriva da palavra «desenvolver» que por sua vez provem do étimo latino «*volvere*» que significa “rolar, fazer girar”¹²², encontramos um termo que descreve o acto de “desenrolar, permitir a saída ou aparecimento de algo que estava tolhido”¹²³. A palavra desenvolver descreve uma ação contrária à expressa pelo verbo envolver, após a junção do prefixo *des*. É curioso verificar, como o conceito etimológico insinua muitos dos pressupostos das mais atuais teorias do desenvolvimento humano quando determinam que:

- O desenvolvimento precoce relaciona-se com as etapas posteriores.
- O desenvolvimento é influenciado simultaneamente pela hereditariedade e pelo meio.
- O indivíduo interfere no seu próprio desenvolvimento.
- Os diversos domínios do desenvolvimento relacionam-se entre si

Se estes princípios são geralmente aceites, já a interpretação do processo e dos mecanismos de aquisição, feita pelos vários autores, é divergente. Enquanto alguns têm

¹²¹ Warkany J: Congenital malformations, Chicago, 1971, Mosby.

¹²² Origem da Palavra - Site de etimologia -

<http://origemdapalavra.com.br/site/palavras/desenvolvimento/>

¹²³ Idem

uma visão mais neurobiológica, outros integram interpretações mais humanísticas, comportamentais, cognitivas ou mesmo psicanalíticas e ecológicas.

Identificámos entre os marcos essenciais do estudo do desenvolvimento humano, o contributo teórico de Arnold Gesell (1925)¹²⁴ cujo modelo de interpretação se baseia num processo contínuo e evolutivo a partir da conceção, que percorre numerosas etapas numa sequência constante e ordenada. Para Gesell as crianças vão adquirindo um nível de maturidade que o autor compartimenta em 24 estádios de evolução, onde cada etapa representa um nível de maturidade. Também Jean Piaget (1896 -1952)¹²⁵ ao estudar a génese psicológica do pensamento, concluiu que os seres em desenvolvimento só aprendem, o que estão preparados para assimilar em estágios determinados. Piaget descreveu as “estruturas operatórias” e desenvolveu, ao longo da sua obra, o conceito de "sujeito epistêmico" que corresponde à criança num determinado estádio de desenvolvimento.

As principais teorias do neurodesenvolvimento infantil, perpetuaram-no em estádios sendo que para Piaget *«a inteligência é adaptação... e a vida é uma criação contínua de formas cada vez mais complexas e de um balanceamento progressivo entre estas formas e o meio»* (Piaget – 1952). Também para Lev Vygotsky (1896-1934)¹²⁶ o desenvolvimento intelectual das crianças decorre das suas interações sociais e das condições de vida, de tal forma que a aprendizagem é entendida como um processo que obriga a uma construção de alicerces e emerge de interações. Mais recentemente e nesta área, destacou-se Howard Gardner¹²⁷ um psicólogo americano, ligado à universidade de Harvard, e reconhecido pela sua teoria das inteligências múltiplas. Todavia, até hoje, nenhuma corrente teórica provou possuir toda a explicação dos processos de aprendizagem e aquisição de competências (Aldridge, J., Goldman, R., - 2007). As várias teorias são valorizadas como pontes de interação com outras áreas do saber nomeadamente as neurociências.

¹²⁴ Psicólogo e médico, Arnold Gesell nasceu em 1880, em Wisconsin, EUA.

¹²⁵ Sir Jean William Fritz Piaget (1896-1980), nascido na Suíça em 1896, dedicou-se à investigação epistemológica (Epistemologia do grego *epistème*, ou seja, "ciência" ou "conhecimento", e *logos*, que significa "discurso") ou seja ao estudo crítico das ciências, com o objetivo de determinar a sua origem e valor. Em: [http://www.infopedia.pt/\\$epistemologia](http://www.infopedia.pt/$epistemologia)

¹²⁶ Lev Vygotsky, cientista russo falecido prematuramente e só descoberto postumamente pelos meios académicos.

¹²⁷ Howard Gardner (DN 1943) psicólogo americano, ligado à Universidade de Harvard

Como tem sido referido por diversos autores e foi mencionado no projeto americano citado anteriormente¹²⁸, é difícil ou mesmo impossível isolar todos os contributos do neurodesenvolvimento devido à multiplicidade de factores envolvidos. O que parece consensual, é a necessidade de incluir os aspectos somáticos, psicomotores e relativos à personalidade, sempre que se pretender fazer uma avaliação global. Das várias teorias e correntes associadas, obtêm-se contributos fundamentais para uma interpretação da realidade mas, sempre no pressuposto de que a sua inteira compreensão é, *a priori*, intangível.

Embora haja pouca investigação sobre os riscos da PMA e em particular sobre os seus efeitos na vertiginosa construção do sistema nervoso, com os seus 100 milhões de neurónios em permanente interação, tal desinformação não nos deixa tranquilos. Existe o receio fundamentado de que as tecnologias ou factores epigenéticos ainda não identificados, possam causar danos imediatos ao embrião ou fazerem ecoar os erros do passado nas gerações futuras.

A natureza, que presidiu à nossa origem, parece ter um desígnio para o nosso percurso, ainda que este trajeto possa ser interrompido por percalços. Acreditámos por isso, que substituir os mecanismos naturais ou intervir excessivamente sobre os mesmos, pode comprometer o futuro da humanidade e da vida no planeta.

2.6.2 – Neurodesenvolvimento infantil. Conceito e avaliação

Classificar as capacidades ou competências dum indivíduo, sobretudo numa criança que se encontra em permanente evolução, é um processo dinâmico que não permite avaliar mais do que fragmentos artificialmente isolados do todo. Aquilo que no ser humano começa por ser apenas «*nature*», cedo se modifica pela ação do que tem sido designado por «*nurture*» ambiental e educativa, englobando-se aqui todos os fenómenos que interferem na expressão do potencial biológico dum indivíduo.

¹²⁸ The National Children's Study Research Plan: A Review
<http://www.nap.edu/catalog/12211.html>

A escolha dum método de avaliação de capacidades e competências, seja clínico, instrumental ou misto, é sempre motivo de intenso debate metodológico. Para além das dificuldades de que está imbuído, o processo de avaliação do neurodesenvolvimento infantil deve abranger aspectos neuro psicológicos bem como mnésicos, linguísticos, práticos ou de execução, à medida que a criança vai crescendo e adquirindo mais funções lógico-matemáticas ou crescentes competências sociais.

Nos vários estudos que fomos referindo ao longo do texto e em que se relacionaram as técnicas da PMA com o desenvolvimento infantil, houve com frequência o recurso a bases de dados com baixa sensibilidade e fiabilidade para os aspectos que se pretendia avaliar. Apercebemo-nos que tirar conclusões recorrendo a registos nacionais ou institucionais, por carência de melhores meios, implica muitos factores de erro. Os critérios e os métodos utilizados são demasiado standardizados e não abrangem aspectos mais sensíveis do desenvolvimento. Há igualmente aspectos da personalidade e do comportamento, que acabam por passar despercebidos. Num contexto de consulta alguns traços do espectro do autismo, por exemplo, podem facilmente ser confundidos com timidez e serem inadvertidamente desvalorizados.

Praticamente todos os comportamentos humanos dependem de competências adquiridas ao longo da vida. Enquanto as dificuldades sensoriais e motoras podem ser identificados por altura do nascimento, as dificuldades comportamentais e de aprendizagem, só se evidenciam mais tarde. Para além das dificuldades relativas à avaliação básica, sabe-se que alguns problemas tais como as alterações do espectro do autismo, da atenção e do humor ou a hiperatividade, raramente são detectadas antes do segundo ano e por vezes só são reconhecidas mais tarde.

Outro problema comum, na avaliação do neurodesenvolvimento, é a dificuldade em seleccionar os aspectos que realmente devem ser avaliados. Sente-se por isso, a necessidade de seleccionar um núcleo base de parâmetros, que permita traçar um perfil minimamente preditivo da globalidade do desenvolvimento que os indivíduos irão expressar.

Um rastreio neuropsicológico oportuno pode ser importante para a adequação das estratégias de ensino às características duma criança, e tal rastreio assume um papel crucial se existirem distúrbios ou deficiências evitáveis.

Sabe-se que qualquer que seja o instrumento psicométrico escolhido para uma avaliação, os resultados espelharão sempre as subjetividades e crenças do avaliador porque “...*Qualquer observador, por mais neutro que tente ser, não consegue evitar um olhar modulado pelas experiências da sua própria vida (...).*” (B. Santos, 1998, pp. 23 - 25).

Sublinhando o que dissemos e recorrendo à opinião expressa pelos autores de uma conhecida revisão (Middelburg, K.J., Heineman, M.J. et al. - 2008) feita a partir de 59 trabalhos publicados, que compararam o neurodesenvolvimento de crianças nascidas umas após ICSI e outras após FIV clássica, verificámos que muitos estudos não englobavam nem as crianças mais velhas nem os aspectos mais subtis do desenvolvimento, tais como a motricidade fina ou as competências para a leitura e a escrita e os seus conteúdos não eram homogéneos. Os autores concluíram que, a sua revisão não identificou assimetrias significativas no desenvolvimento neuromotor, na cognição, na expressão, na linguagem e no comportamento das duas populações, salvaguardada a escassa sensibilidade das análises parcelares. Fica-nos portanto, a dúvida sobre se os métodos de avaliação usados permitiam tirar tais conclusões.

2.6.3 – Monitorização nacional da saúde infantil após PMA

Existindo tantos estudos que sugerem riscos da PMA para o desenvolvimento dos seres humanos artificialmente concebidos e preservados, sente-se a necessidade de manter sob estreita vigilância todas as etapas de fertilização e de diagnóstico pré-implantatório, bem como as condições termo biológicas de amadurecimento *in-vitro* e de criopreservação.

Em Portugal, tal como na maior parte dos países, é exigida a avaliação dos principais resultados da PMA, e existe da parte dos profissionais e dos pais o compromisso de cederem informações, sobre dados relevantes para a análise global dos tratamentos recebidos.

O artigo 13.º, n.º 2, da Lei n.º 32/2006, de 26 de Julho estabelece que: “*A fim de serem globalmente avaliados os resultados médico-sanitários e psicossociológicos dos processos de PMA, devem os beneficiários prestar todas as informações relacionadas com a saúde e o desenvolvimento das crianças nascidas com recurso a estas técnicas*”.

A CNPMA informa os futuros pais deste compromisso, através da apresentação dum formulário com o seguinte texto (excerto):

«Na sequência desta imposição legal, foram-vos fornecidos dois modelos de relatório médico, um a preencher pelo médico assistente, descrevendo as condições do parto e as características do recém-nascido, e um outro, preenchido pelo pediatra ou médico de família assistente, no final do primeiro ano de vida da criança, que deverão ser devolvidos ao centro em que foi efetuada a terapêutica de PMA».

Devemos comentar, que a nossa experiência nos leva a supor que tais recomendações nem sempre serão cumpridas e que os dados existentes deverão ser escassos. Por outro lado, ainda que aqueles requisitos fossem inteiramente cumpridos, manter-se-iam muitas lacunas de registo, tanto em Portugal como nos restantes países que divulgam resultados, porque a investigação sobre o neurodesenvolvimento das crianças artificialmente concebidas é insuficiente e raramente ultrapassa o 2º ano de vida.

Em Portugal, os dados solicitados aos pais (fig.14) seguem o **modelo de avaliação** (CNPMA) abaixo exposto: ¹²⁹

DADOS SOBRE A(S) CRIANÇA(S) NO FINAL DO 1º ANO DE VIDA

(por favor, enviar um formulário por cada criança nascida)

IDENTIFICAÇÃO DO CASAL

DESENVOLVIMENTO ESTATURO-PONDERAL

Altura (cms) Percentil

Peso (Kg) Percentil

Perímetro Cefálico (cms) Percentil

DESENVOLVIMENTO NEUROLÓGICO

Paralisia Cerebral - Não/Sim

Epilepsia - Não/Sim

¹²⁹ Modelo em: http://www.cnpma.org.pt/Docs/Modelo_DesenvolvimentoCrianca.pdf

AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO – 12 meses (parâmetros a indicar pelo observador)

MOTRICIDADE GROSSEIRA / LOCOMOÇÃO

Desloca-se (anda, arrasta-se, gatinha) – Não / Sim

Passa de uma posição para outra (sentado, de gatas, de pé) – Não / Sim

AUDIÇÃO / LINGUAGEM

Procura a fonte sonora – Não / Sim

Vocaliza muito, com diversas entoações – Não / Sim

VISÃO / MANIPULAÇÃO

Pega em objeto pequeno (ex «smartie») entre polegar e indicador – Não / Sim

Larga voluntariamente o objeto; atira-o – Não / Sim

COMPORTAMENTO SOCIAL

Imita certos gestos ou mímicas - Não / Sim

Sacode a cabeça para dizer não – Não / Sim

Tenta chamar a atenção – Não / Sim

AOS 12 MESES

Põe-se de pé/ suporta o peso sobre as pernas – Não / Sim

Anda sempre na ponta dos pés – Não / Sim

Vocaliza espontaneamente – Não / Sim

MALFORMAÇÕES (de acordo com ICD-10)

– Especifique: Saúde da criança ao longo do primeiro ano de vida

Sem problemas relevantes:

Necessidade de tratamentos: em fisioterapia, em ortopedia

Necessidade de acompanhamento em consultas de desenvolvimento.

Se ainda se mantém em acompanhamento em consultas de desenvolvimento.

Fig. 14 - Modelo nacional de avaliação do desenvolvimento infantil (CNPMA)

2.6.4 – Métodos de avaliação. A difícil escolha.

Recentemente, um conjunto de especialistas britânicos, apoiados por autores de reconhecido mérito internacional, tentaram identificar os melhores instrumentos psicométricos para as idades pediátricas. O seu estudo (Bedford, H. et al. - 2013)¹³⁰, feito com apoio governamental e que visava encontrar um modelo universalizável para esta área, foi bem o reflexo das dificuldades de seleção existentes. De facto, existem numerosos instrumentos de grande sensibilidade e especificidade, mas cuja aplicação requer tal disponibilidade de tempo e diferenciação técnica, que dificilmente conseguem sair do âmbito dos ensaios e da investigação académica.

Na escolha dos instrumentos para avaliação do neurodesenvolvimento infantil em contexto formal e aplicável à nossa investigação, também encontrámos uma oferta diversificada. Contudo, perante a exigência de aferição para a população portuguesa verificámos que o repositório de instrumentos é bastante mais escasso, sobretudo se for dirigido às crianças mais jovens.

Recorrendo ao estudo prospetivo que nos inspirou¹³¹ e analisando a metodologia que foi escolhida nessa investigação, valorizámos a importância dada à escolha de instrumentos para inferir consequências e resultados de circunstâncias biológicas. A equipa de investigadores projetou fazer exames físicos a todas as crianças nascidas após PMA, e realizar entrevistas telefónicas ou presenciais, durante todo o longo período de acompanhamento («*follow-up*»). Contudo, para melhor validarem os resultados das várias vertentes do desenvolvimento, a equipa escolheu como instrumentos psicométricos, o *Inquérito psicossocial de Achenbach*¹³² devido à sua validade e fácil disponibilidade e uma bateria para determinação do quociente de inteligência (QI) muito divulgada e conhecida como teste de Bailey¹³³ (embora mencionando que há

¹³⁰ Em https://www.ucl.ac.uk/cpru/documents/review_of_measures_of_child_development

¹³¹ The National Children's Study Research Plan: A Review (downloaded from: <http://www.nap.edu/catalog/12211.html>)

¹³² O método ASEBA («Achenbach System of Empirically Based Assessment») baseia-se em «*checklists*» de identificação nosológica dos distúrbios mentais infantis. Foi criado nos anos 60 pelo Dr. Achenbach numa altura em que Academia Americana de Psiquiatria através do «Association's Diagnostic & Statistical Manual (DSM)» só considerava dois diagnósticos: «Adjustment Reaction of Childhood» e «Schizophrenic Reaction, Childhood Type».

¹³³ As Bayley Scales of Infant Development (BSID) avaliam o desenvolvimento mental e motor e o comportamento das crianças entre os 1 e 42 meses de idade. In:

modelos considerados mais preditivos do QI tardio ou das influências do meio ambiente).

Na avaliação preparatória do nosso estudo, embora enfrentando uma realidade diferente e tendo escolhido diferentes instrumentos de avaliação, também nos focamos na evolução a longo prazo das crianças estudadas, quer tivessem sido submetidas a criopreservação embrionária ou pertencessem ao grupo controle. Para crianças em idade pré-escolar e depois de analisadas outras alternativas, optamos pelas «**Escalas de Desenvolvimento Mental de Ruth Griffiths**» (EDMG), que foram concebidas pela psicóloga britânica Ruth Griffiths e são um instrumento psicométrico composto por vários testes utilizados desde o nascimento até aos 8 anos (ou desenvolvimento equiparável). Ao longo do texto teremos oportunidade de desenvolver este tema, mas antecipamos que as subescalas das EDMG inicialmente desenvolvidas em Inglaterra, foram validadas e adaptadas em diversos países, tornando-se um instrumento psicométrico muito útil e divulgado.

Após análise, concluímos que as EDMG eram mais adequadas ao nosso estudo do que as escalas de Bailey (aplicáveis de 1 a 42 meses), porque abrangem um grupo etário mais alargado (de 1 a 96 meses). Numa fase exploratória e inicial da investigação, aplicámos apenas este instrumento e testámos se respondia às questões que tínhamos colocado na investigação, visto não termos encontrado bibliografia suficiente sobre os riscos tardios das crianças submetidas a criopreservação embrionária.

Resolvido o problema da avaliação do desenvolvimento cognitivo e motor na perspectiva das capacidades intelectuais e neurosensoriais, sentimos que outros aspectos mais ligados ao comportamento podiam estar a ser excluídos ou sub avaliados. Posteriormente, e tentando enriquecer a análise, sobre zonas que têm sido pouco trabalhadas até ao presente, e tendo esse objetivo específico, analisámos inquéritos qualitativos destinados a pais ou educadores (hetero relatos).

Como ferramenta de análise comportamental, ponderámos utilizar o mesmo instrumento que tinha sido usado no estudo americano, e em muitos outros trabalhos internacionais, sobre desvios do comportamento juvenil conhecido por «*Child Behavior*

Checklist » [(CBCL) de Achenbach(1991)] uma vez que se encontra validado para a população portuguesa.

As CBCL teriam sido uma escolha conveniente se a nossa amostra tivesse maiores dimensões porque se pretendia inferir tendências dentro dos vários grupos. Contudo, a questão da exequibilidade prática e da adesão dos destinatários, foram factores importantes que nos levaram a optar por um instrumento semelhante, mas de mais simples utilização, que é o **Questionário de Capacidades e de Dificuldades (SDQ-Por)**. Este questionário designado originalmente por «*Strengths and Difficulties Questionnaire* (SDQ)» foi criado em 1997 e publicado por Robert Goodman em 2001. O SDQ está traduzido actualmente em mais de 40 idiomas e a versão portuguesa já está traduzida e adaptada (Fleitlich, B., Loureiro, M., Fonseca, A., e Gaspar, F. - 2005).¹³⁴

A confiança e validade das versões do *SDQ* para pais, professores e auto relato, foram testadas numa amostra de crianças portuguesas entre os 5 e os 16 anos, pondo em evidência a sua utilidade na identificação de problemas comportamentais (Marzocchi *et al.*, 2004). Estes estudos evidenciaram as qualidades psicométricas do *SDQ*, que se tem tornado um dos questionários mais utilizados no rastreio (*screening*) de problemas do comportamento e saúde mental em crianças, com a vantagem de ser de utilização gratuita.

Embora o *SDQ* seja um questionário breve e de fácil utilização, os seus resultados têm correlações positivas com o *Child Behaviour Check List* (versão para pais, professores e de auto relato – *Teacher's Report Form* e *Youth Self-Report*, Achenbach, 1991) que é um paradigma de questionário criado para esta área de estudo e que possui fortes propriedades psicométricas. (Rothenberger, A., Woerner, W., - 2004).

Os questionários e inventários são instrumentos de triagem do tipo «papel e lápis», muito usados porque são fáceis de administrar e cotar. É desejável que sejam precisos e válidos, mas simples, de aplicação breve e adequados à população estudada. Permitem alguma manipulação voluntária das respostas, o que reduz a validade de alguns questionários, mas este tipo de instrumentos mantem mesmo assim a sua importância clínica. Fornecem um despiste comportamental breve, medido através das dificuldades encontradas, onde estão incluídos os problemas emocionais, comportamentais, de hiperatividade e os problemas de relacionamento inter pessoal.

¹³⁴ Disponível em www.sdqinfo.org.

O SDQ também identifica os comportamentos pro-sociais e as normas portuguesas dirigem-se sobretudo a crianças em idade pré-escolar, o que no nosso caso não constituiu problema, nem exigiu o recurso ao modelo inglês¹³⁵. Podem surgir erros de interpretação nos inquéritos em que o respondedor não é o próprio (hetero relatos), mas as propriedades psicométricas e a estrutura factorial do SDQ têm sido satisfatoriamente replicadas em vários países. A versão portuguesa (SDQ-Por) reúne todas as qualidades referidas (Marzocchi, G., *et al.*, 2004), (Stone, L., Otten R., 2010).

2.6.5 – Descrição e uso das Escalas de Desenvolvimento Mental de Ruth Griffiths

A escala «Abilities of Babies 0 - 2 years», das EDMG surgiu primeiro em 1954 e em 1970 foi publicada a escala «Abilities of Young Children» (Preston, P., 2006). Ambas as escalas formam um valioso repositório, que veio preencher uma lacuna no escasso acervo psicométrico dirigido a este grupo etário. A «Association for Research in Infant and Child Development» (ARICD) supervisiona e assegura que a utilização deste instrumento seja feita por psicólogos e pediatras do desenvolvimento, a quem é exigida formação específica.

As escalas, quando aplicadas por profissionais treinados, ajudam a detectar numerosas alterações do desenvolvimento tais como: perturbações da atenção, dispraxias, disfasias e défices fonológicos entre outros. No entanto, o que as torna únicas, é a sua aplicabilidade desde o nascimento e o facto de abrangerem as principais áreas do desenvolvimento infantil (Jacklin, L., Cockcroft, K., - 2013) permitindo estabelecer um perfil individualizado das crianças, a partir dos valores encontrados.

As EDMG possuem várias subescalas com itens ordenados sequencialmente, o que permite identificar as áreas melhor ou pior desenvolvidas, e orientar a intervenção terapêutica.

Entre o nascimento e os dois anos a avaliação é feita a partir de cinco subescalas que são:

¹³⁵ Disponíveis em <http://www.sdqinfo.org/UKNorm.html>

A – **Locomoção/ Desenvolvimento motor:** avalia a motricidade global incluindo o equilíbrio, a coordenação e o controle dos movimentos.

B - **Desenvolvimento pessoal – social:** avalia as competências sociais ao nível da autonomia e a capacidade de interação com os cuidadores e os pares.

C – **Audição/ Linguagem:** avalia a linguagem recetiva e expressiva.

D - **Coordenação olho-mão:** avalia a motricidade fina, a destreza manual e as competências visio motoras.

E - **Realização** (performance): avalia as capacidades visio espaciais, incluindo a rapidez de execução e precisão.

Quando em 1970, foi publicada uma extensão das EDMG para a faixa etária dos 2 aos 8 anos, conservou-se a estrutura original mas foi acrescentada uma 6ª subescala:

F – **Raciocínio Prático** (somente contida na escala dos 2-8 anos) que avalia a capacidade da criança resolver problemas práticos, ordenar sequências e a forma como faz a abordagem de questões morais.

Em 1996, foi publicada uma atualização para o grupo etário do nascimento aos dois anos (*Birth to 2 years Scales*) da responsabilidade do Dr Michael Huntley (anterior psicólogo responsável do *Wolfson Centre, Institute of Child Health*, em Londres) que levou a efeito uma padronização das escalas, juntando oito novos itens ao equipamento e revendo igualmente os boletins de registo das observações. Seguidamente, foi revista a EDMG dos 2 aos 8 anos, e feita a sua aferição em crianças das ilhas britânicas. Em Maio de 2006, foi publicada em língua inglesa (*Barnard, L., et al. -2006*) uma versão alargada e novamente padronizada das antigas escalas (no original designadas *Griffiths 2-8 year Scales the GMDS-ER*). As GMDS-ER integram mudanças aos itens anteriores e as alterações introduzidas, estão perfeitamente descritas nos manuais dos novos equipamentos.

Embora as EDMG tenham algumas limitações enquanto método de investigação, são um instrumento de referência muito utilizado. Em estudos realizados em Portugal (e.g. Diniz, A., Ferreira, C., et. al. – 2001) e noutros países (e.g. Luiz, D., Foxcroft, C. e Stewart, R., 2001) concluiu-se que as escalas avaliam o desenvolvimento de forma consistente e verificável em diversas culturas e que «não existem diferenças

significativas de desempenho entre diferentes grupos étnicos, quando os ambientes socioeconómicos são equiparáveis»¹³⁶.

Num estudo publicado em português (Carneiro et. Al., 2003) em que se avaliaram crianças dos 3 aos 7 anos, os autores concluíram que as EDMG dos 2 aos 8 anos, possuíam boa consistência interna e permitiam fazer a avaliação clínica desse grupo etário. A estrutura da escala dos 2-8 anos, revelou medir a capacidade geral de desenvolvimento e ser aplicável na avaliação clínica de crianças portuguesas¹³⁷.

As primeiras edições em língua portuguesa das duas escalas [EDMG (0-2 anos) e (2-8 anos)] foram publicadas em 2007 e em 2008 respetivamente, mas prosseguem estudos que visam a sua validação e melhor adequação à população portuguesa, motivo pelo qual ainda se recorre bastante às tabelas britânicas.

Concluimos a justificação da nossa escolha, com um dos argumentos do grupo de trabalho português, que publicou em 2012 um estudo sobre educação, aprendizagem e desenvolvimento e, em que referiu, que *«as EDMG (...) têm-se revelado de grande interesse clínico na avaliação do desenvolvimento, no diagnóstico e no aconselhamento educacional e terapêutico de crianças em situação de risco de desvios do desenvolvimento, sendo também utilizadas em diversos trabalhos de investigação»* (Mata, L., Peixoto, F – 2012)..

2.6.6 – Descrição e uso do questionário de capacidades e dificuldades (SDQ-Por)

O Questionário de Capacidades e de Dificuldades (SDQ-Por) (Anexo 2) é a versão portuguesa dum questionário breve (com vinte e cinco itens) que foi criado no Reino Unido por Robert Goodman, em 1997. É um instrumento de triagem, utilizado na

¹³⁶ Patrícia Borges, Inês Pessoa e Costa, Manuela Veríssimo. ISPA. Carlota Themudo Ferreira, Membro do Executive Committee da ARICD, Inês Carvalhão, Iolanda Gil do Centro de Reabilitação de Paralisia Cerebral Calouste Gulbenkian, Lisboa, Solange Fernandes, Centro Hospitalar Oeste Norte, Escalas de desenvolvimento mental de Ruth Griffiths – adaptação para a população portuguesa. ACTAS do 12º COLÓQUIO de PSICOLOGIA e EDUCAÇÃO - Olhares contemporâneos através da investigação e da prática – pag. 922-932 - ISPA 1.ª Edição: Junho 2012

¹³⁷ idem

investigação do comportamento de crianças e jovens sobretudo entre os 4 e os 17 anos. O SDQ rastreia problemas de humor, concentração e qualifica as interações sociais.

Existe uma versão de auto retrato para crianças a partir dos 11 anos, uma versão para pais e outra para educadores, com uma boa correlação entre elas (Roy, B. V., Veenstra, R., Clench-Aas, J.- 2008)

As 25 frases do questionário (SDQ-Por) caracterizam comportamentos, e os respondedores devem assinalar a situação que melhor se aplica ao seu caso, optando por uma das seguintes três hipóteses: não é verdade; é um pouco verdade; é muito verdade. As respostas devem reportar-se aos últimos seis meses.

Este instrumento tem muitas semelhanças com o inventário de Achenbach (Child Behavior Checklist – CBCL, 1984) que em português se designa «Inventário de Competências Sociais e de Problemas do Comportamento para crianças e adolescentes» e que é usado na triagem de comportamentos problemáticos sobretudo entre os 4 e os 18 anos. Uma das maiores vantagens do *SDQ* é a sua simplicidade de aplicação o que não impede a sua utilidade, na análise de atributos comportamentais quer negativos quer positivos, e a sua correspondência com critérios de classificação correntes. (Rothenberger, A., Woerner, W. – 2004), (Roy, B.V. *et al.*, 2008).

A partir da soma dos valores obtidos, em cada item, obtém-se o valor de cada uma das subescalas e o valor global do inventário. As escolhas expressas nas várias subescalas, permitem identificar diversas alterações comportamentais, e obter um perfil dos problemas da criança, porque pesquisam:

- Isolamento,
- Queixas somáticas,
- Ansiedade/ Depressão,
- Problemas sociais,
- Problemas do pensamento,
- Problemas de atenção,
- Comportamento delinquente e
- Comportamento agressivo.

O SDQ-Por gera cinco subescalas:

- (1) Sintomas emocionais
- (2) Problemas de comportamento
- (3) Hiperatividade
- (4) Problemas de relacionamento com os colegas
- (5) Comportamento pró-social

O SDQ também tem uma pontuação total de dificuldades (soma de todas as subescalas com exceção da escala de comportamento pró-social) e, a partir dos resultados, são estabelecidos coeficientes que depois são interpretados de acordo com os critérios do autor (Becker *et al.*, 2004).

Com a versão original da CBCL, Achenbach (1991b) identificou 8 síndromes (subescalas), presentes em ambos os sexos e patentes em várias idades, que poderiam constituir uma base para a classificação da psicopatologia juvenil ou pelo menos dividi-la em dois grandes grupos (designados «clusters» no estudo americano): problemas de comportamento externalizante e problemas de comportamento internalizante. No estudo português (Fonseca *et al.*, 1995) para adaptação destes inventários (CBCL) foram definidas e adaptadas 7 subescalas:

- Agressividade/Antissocial,
- Problemas de atenção/ Dificuldades de aprendizagem,
- Isolamento social,
- Pensamento obsessivo,
- Problemas sociais/ Impopular,
- Ansiedade e
- Comportamentos estranhos (esquizoide)

À semelhança das CBCL o SDQ (internacional) também faz uma triagem de perturbações de externalização e internalização mas de forma mais breve. O SDQ-Por tem igualmente menor sensibilidade que o CBCL mas consegue abranger as mesmas subescalas comportamentais e funciona como a sua versão simplificada.

Fazendo uma breve introdução sobre o entendimento dos processos de internalização e de externalização, podemos dizer que os mesmos se referem à relação da mente humana com o ambiente social envolvente. As atividades internas (os processos mentais definidos pela ciência cognitiva) não podem ser entendidas sem o reflexo das actividades externas, porque, quer a atividade interna, quer a influência do meio interagem mutuamente, o que leva a transformações bidirecionais entre as duas realidades.

A internalização consiste portanto no processamento individual das atividades externas, tornando-as realidades internas. A atividade interna nunca é sobreponível à atividade externa, porque ocorrem sempre mudanças quando a realidade externa é interiorizada, pelo indivíduo ou pela sociedade se adaptarmos o conceito a um microcosmo mais amplo. A internalização duma realidade externa permite interagir, através da simulação mental, sem ultrapassar o imaginário e sem passar à ação concreta.

Os processos de internalização não são uma simples assimilação, mas sim a modulação dos componentes externos e internos da atividade mental podendo haver rejeição dos componentes externos. A externalização, pelo contrário, transforma atividades internas em externas e corresponde à influência do indivíduo sobre o seu meio. Estes conceitos foram amplamente desenvolvidos por Vygostky (Kozulin, A., 1990) mas já tinham sido abordados por Piaget, na sua descrição dos esquemas sensório motores.

Para surgir internalização é necessária uma capacidade de permanência do objeto e a sua representação interna. A linguagem humana é um exemplo dos processos de interiorização dos esquemas sensório motores, que são acedidos e interiorizados na infância mediante a interação entre a criança e o meio, refletindo as suas capacidades cognitivas.

Concluimos a justificação da nossa escolha com o facto do SDQ-For constituir um instrumento de avaliação muito útil e acessível, nomeadamente para os grupos etários pré escolares, que são «grupos negligenciados» relativamente a esta questão e, para os quais existem poucos instrumentos de avaliação psicopatológica.

PARTE 3

**ESTUDO COMPARATIVO DO NEURODESENVOLVIMENTO DE CRIANÇAS
CUJOS EMBRIÕES ESTIVERAM CRIOPRESERVADOS**

3.1 - CONTRIBUTO PESSOAL E ESTUDO EMPÍRICO

3.1.1- Introdução

Neste capítulo, onde inserimos o nosso contributo pessoal e estudo empírico, pretendemos expor e fundamentar a metodologia escolhida, descrevendo o longo percurso da investigação, através do qual se foi desvendando uma realidade e construindo o seu conhecimento.

Nesta parte 3 da dissertação serão referidas as dificuldades encontradas na seleção da amostra e na escolha do modelo de investigação. O método escolhido foi predominantemente quantitativo, mas pôde ser enriquecido com aspectos qualitativos não essenciais, mas complementares. Reafirmámos as razões porque escolhemos os instrumentos psicométricos que foram apresentados na parte 2, e mencionámos os procedimentos usados na recolha dos dados. Em seguida caracterizámos os elementos da amostra populacional seguida da análise dos resultados e terminámos com a sua discussão e conclusão final.

3.1.2 - Contextualização da investigação

Nesta parte 3, centrada no estudo empírico e contributo pessoal, evocaremos sumariamente o enquadramento teórico, a que demos espaço na parte 2 da dissertação. Referiremos as principais áreas temáticas que foram anteriormente desenvolvidas para melhor compreensão das variáveis em estudo, lembrando a forma como titulámos e desenvolvemos os diversos capítulos que foram:

- Infertilidade e Medicina da Reprodução.
- Contributo da PMA para a reprodução humana.
- A importância do meio ambiente no desenvolvimento humano
- Aspectos bioéticos e jurídicos da PMA e da criopreservação embrionária
- Neurodesenvolvimento infantil - considerações e avaliação

Ao longo do texto, salientámos as principais diferenças entre a reprodução natural e a medicamente assistida, realçando factores ambientais e epigenéticos, que se crê poderem afetar o desenvolvimento dos embriões humanos artificialmente concebidos e preservados. Dando visibilidade a numerosos autores, reportámos algumas das dificuldades sentidas neste tipo de investigações. Relembámos as limitações de muitos estudos em que as amostras populacionais são pequenas e não permitem a análise discriminada das várias técnicas de PMA (Porta Ribera, R., Trémols, V. et al – 2009). Noutras situações, talvez a maioria, há omissão de resultados (Carson, C. et al. – 2010 e 2011) ou só são analisados os dados da somatometria e da mortalidade, devido ao seu fácil acesso. Os resultados da morbilidade perinatal e do neurodesenvolvimento infantil tendem a ser menos abordados, apesar de serem indispensáveis para a programação de necessárias mudanças.

Prosseguimos com a referência a alguns aspectos jurídicos e bioéticos que considerámos relevantes, e concluímos com uma breve síntese das diferentes abordagens de avaliação do neurodesenvolvimento infantil.

Na terceira parte, que ora desenvolvemos, procederemos à apresentação da metodologia de investigação e das avaliações formais, com um resumo das características demográficas dos participantes. De seguida apresentaremos os resultados, a discussão e a conclusão deste estudo sobre criopreservação embrionária e neurodesenvolvimento infantil.

3.1.3 - Objectivos da investigação

3.1.3.1 - Objectivo geral

O objetivo geral deste trabalho centrou-se no contributo pessoal para a avaliação sistemática e comparativa do neurodesenvolvimento de crianças cujos embriões estiveram criopreservados versus o de outras, em que não existiu esse antecedente, mesmo que tivesse havido PMA. Esta técnica de criopreservação biológica é muito utilizada no âmbito da Medicina da Reprodução, mas os seus efeitos sobre o desenvolvimento humano têm sido pouco avaliados e ainda são mal conhecidos. Porém,

tão ou mais importante que este contributo para o conhecimento das implicações dum procedimento técnico, é a defesa duma procura alargada e pluridisciplinar e dum estatuto para o embrião artificialmente concebido, que promova a defesa da vida e respeite o ser humano desde o desejo dos seus pais.

3.1.3.2 - Objetivo específico

O objetivo específico deste trabalho consistiu na comparação de aspectos do comportamento e do desenvolvimento psicomotor, bem como do comportamento duma população infantil com idades entre os 18 meses e os 8 anos, avaliada com recursos clínicos e psicométricos. Formaram-se três grupos, sendo que o grupo designado por grupo A funcionou como índice, e teve como facto distintivo integrar apenas elementos submetidos a criopreservação embrionária. Os outros dois grupos, com características demográficas sobreponíveis, funcionaram como grupos controle e foram designados grupos B e C.

Compararam-se os três grupos, utilizando a dicotomia da variável «ter ou não ter sido criopreservado», na tentativa de isolar o efeito desta técnica de preservação embrionária, relativamente à transferência a fresco após FIV/ICSI e à concepção natural. Na hipótese de serem encontradas diferenças entre as crianças nascidos de FIV/ICSI com transferência a fresco, e as crianças nascidas de FIV/ICSI com criopreservação, mantendo idênticas as outras características, ficaríamos mais próximo de identificar um possível efeito da técnica em análise. Poder-se-iam ter criado outros subgrupos, tais como os submetidos a crio-ICSI ou a crio-FIV clássica, mas a dimensão das amostras não permitiu essa discriminação.

3.1.3.3 - Questão de Investigação

Este trabalho de investigação consistiu no estudo comparativo e predominantemente quantitativo, com componente analítica, do neurodesenvolvimento de crianças com características predefinidas. Foram comparadas crianças cujos

embriões estiveram criopreservados com outras demograficamente idênticas mas cuja concepção foi espontânea ou obtida com FIV/ICSI seguida de transferência a fresco.

3.1.4 – Questões e hipóteses em análise

O estudo assentou na colocação de quatro hipóteses base, para a investigação pretendida:

Hipótese 1: Existirão diferenças de neurodesenvolvimento e/ou de comportamento entre as crianças cujos embriões estiveram criopreservados e as restantes, detectáveis clinicamente ou mensuráveis com instrumentos psicométricos estandardizados, entre os 18 meses e os 8 anos?

Hipótese 2: Existirão diferenças de neurodesenvolvimento e/ou de comportamento infantil (avaliado entre os 18 meses e os 8 anos com instrumentos psicométricos identificados) atribuíveis aos tratamentos da PMA e independentes da criopreservação embrionária, quando as crianças assim concebidas, são comparadas com outras de concepção natural?

Hipótese 3: Existirão diferenças de neurodesenvolvimento e/ou de comportamento infantil (avaliado entre os 18 meses e os 8 anos e detectáveis clinicamente ou mensuráveis com instrumentos psicométricos identificados) dependentes não só da criopreservação embrionária mas também do tempo de preservação decorrido?

Hipótese 4: Serão as hipóteses 1 e 2 verificáveis apenas em alguns grupos populacionais com particularidades identificáveis?

Para as hipóteses colocadas, não possuímos suporte bibliográfico suficiente, para lhes atribuir evidência. A verificar-se a hipótese 4 confirmaríamos alguns dados da literatura nomeadamente as conclusões da meta análise de Pinborg, A., Wennerholm, U.B., et al. (2013) e de Hansen, M., Kurinczuk J., et al (2013) discutidas na parte 2 deste texto.

3.1.5 - Consentimento informado dos participantes

A Convenção sobre os Direitos do Homem e da Biomedicina (Convenção de Oviedo), aberta à assinatura dos Estados Membros em 4 de abril de 1997, aprovada para ratificação por Resolução da Assembleia da República em 19 de outubro, e ratificada pelo Decreto da Presidência da República n.º 1/2001, de 3 de janeiro, garante no artigo 6º, que a opinião dos menores deve ser tomada em consideração em função da sua idade e do seu grau de maturidade, e que as pessoas que careçam de autonomia para prestar o consentimento informado devem, se possível, participar no processo de decisão. A investigação em pessoas é aliás, um dos itens previstos pela obrigatoriedade de consentimento informado cf. artigo 16.º, alínea v da mesma Convenção.

No presente estudo foram respeitadas todas as regras éticas inerentes a estudos desta natureza.

3.1.6 – Autorização institucional e consentimento legal do estudo

Após a aprovação do projeto de estudo para esta dissertação, por parte do Conselho Científico da Universidade Católica Portuguesa, dos responsáveis do Departamento de Bioética da mesma Universidade e do seu orientador o Senhor Professor Daniel Serrão, formalizámos o pedido oficial para a sua execução junto da «Comissão Nacional de Proteção de Dados» (CNPd).

O pedido de autorização desta investigação obedeceu ao regulamento oficial, que exigiu uma **sinopse do estudo**, a cópia do **caderno de recolha de dados** ou do **modelo de história clínica**, bem como uma cópia do **documento de consentimento informado** (anexos 4, 5 e 6). O pedido com o número de Ref. 02.02 e todo o plano processual (Proc. N.º 13846/2014) mereceram **aprovação documental**, cuja cópia se anexa (anexo 7).

3.2 – METODOLOGIA

3.2.1 – Introdução

Podemos sintetizar a parte prática desta investigação em seis momentos:

1º) Um primeiro momento em que fizemos um levantamento da população alvo e procedemos à divulgação do projeto de trabalho junto da mesma. Foi talvez o período mais longo. Ultrapassados os principais obstáculos, o estudo foi iniciado com uma amostra de conveniência, que foi selecionada a partir de:

- Ficheiro clínico da autora deste estudo, que exerce pediatria hospitalar e ambulatória há mais de vinte anos e trabalha numa maternidade que integra um importante centro de PMA.
- Participantes contactados pelos aderentes iniciais, numa base de «passar a palavra» e de generosa confiança.
- Angariação de participantes através de redes sociais, sobretudo a partir da página informática da Associação Portuguesa de Fertilidade (APF) da qual a autora se tornou sócia e frequentadora do *Fórum* cuja ajuda gostaríamos de enaltecer (anexo 8)¹³⁸.

2º) Um segundo momento em que realizámos a seleção da amostra através dos contactos estabelecidos com a população alvo. Nesta fase redefiniram-se os critérios de seleção pois foi-se tornando evidente, a dificuldade em obter um número suficiente de participantes.

3º) Um terceiro momento em que se realizou a anamnese das crianças selecionadas e a história clínica e procriativa básica dos seus progenitores. Esta fase da investigação sobrepôs-se às duas primeiras, sempre que houve oportunidade.

4º) Um quarto momento em que foi feita a aplicação das EDMG nas condições que serão descritas no texto.

¹³⁸ <http://www.apfertilidade.org/web/index.php>

5º) Um quinto momento em que se avaliaram aspectos emocionais e comportamentais mediante a aplicação do *Questionário de Capacidades e de Dificuldades (SDQ-Por)*, na versão portuguesa para pais, visando identificar padrões de hiperatividade ou de défice de atenção bem como perturbações da esfera do humor.

6º) Um sexto momento em que se avaliaram estatisticamente os resultados, e se fez a análise das hipóteses em estudo.

3.2.2 – População estudada e critérios de seleção das amostras

Nos últimos anos diminuiu bastante o número de nascimentos em Portugal, baixando de 120 008 no ano 2000 para 82 787 nados vivos em 2013¹³⁹. A procura da PMA tem, pelo contrário, vindo a aumentar.

Os registos nacionais da PMA foram reorganizados em fevereiro de 2013¹⁴⁰ e publicados em maio desse mesmo ano. Verificou-se que em 2010 houve um acréscimo de 22% no número de ciclos, relativamente a 2009, mas, nos anos mais recentes, houve um decréscimo que poderá corresponder a um equilíbrio da procura, ou a um reflexo da baixa global da natalidade em Portugal.

Em 2011 houve 1288 partos de crianças artificialmente concebidas, ou seja, menos 241 do que no ano anterior. Traduzido em números, os resultados nacionais da PMA em 2011, contribuíram para o nascimento de 1757 crianças a que acrescem 250 nascidas após transferência intra uterina de espermatozoides.

Também em 2011, foram transferidos 918 embriões criopreservados (designados ciclos TEC) que deram origem a 199 gestações, 49 perdas obstétricas e 148 partos de que resultaram 172 RNs (quadro 5).¹⁴¹

¹³⁹ Estatísticas demográficas 2012. INE. Edição 2013. pag 39 e

<http://www.pordata.pt/Portugal/Quadro+Resumo/Portugal-5812>

¹⁴⁰ http://www.cnpma.org.pt/Docs/RELATORIO_ACTIVIDADE_PMA2011.pdf

¹⁴¹ idem

Partos	Total	< 28 semanas	28 – 32 semanas	33 – 36 semanas	37- 41 semanas
Únicos	123	1	1	15	102
Gemelares	24	0	2	13	8
Trigemelares	1	0	0	1	0
Total	148 partos/ 172 RNs	1 parto/ 1 RN	3 partos/ 5 RNs	29 partos/ 41 RNs	110 partos/ 118 RNs

Quadro 5- Número global de partos e de recém-nascidos (RNs) após transferência de embriões criopreservados (provenientes de TEC após FIV/ICSI, no ano de 2011 em Portugal)

Em relação aos anos de 2009 e 2010 tinham sido registados em todo o país, 1438 ciclos TEC (661 – 777 respetivamente) mas não está perfeitamente determinado o número de nascimentos a que estes ciclos deram origem. Se os resultados tiverem sido idênticos aos de 2011, estes ciclos TEC terão correspondido a 269 crianças das quais apenas 203 terão tido, de acordo com os mesmos cálculos, as características etárias necessárias para serem integradas no nosso estudo.

No triénio 2009-2011 terão nascido portanto, cerca de 321 crianças com mais de 36 semanas de IG num total de 441. Extrapolando resultados, e partindo do princípio que os participantes provenientes de ciclos TEC do nosso estudo, nasceram entre janeiro de 2007 e agosto de 2010 (3 anos e oito meses), podemos dizer que pertencem a um universo teórico que terá no máximo 350 crianças. Entre estas crianças haverá aproximadamente 260 com todos os critérios a seguir enunciados e necessários para participarem nesta investigação constituindo o seu universo ou **população alvo** do estudo.

Relativamente às **amostras de estudo**, a sua seleção foi feita por conveniência. Reafirmamos as dificuldades encontradas, perante a escassez da população alvo, para conseguir reunir um **grupo índice** numericamente significativo para se poderem tirar ilações estatísticas.

Os **dois grupos controle**, foram de muito mais fácil seleção e integraram crianças demograficamente idênticas mas cuja concepção foi espontânea, ou em que houve FIV/ICSI com transferência a fresco.

Tanto os elementos do grupo índice (crianças com TEC) como os dos grupos controle, partilharam os seguintes critérios:

1º - Terem nascido com 36 ou mais semanas de IG

2º - Não terem tido problemas perinatais suficientemente graves para, por si só, condicionarem o desenvolvimento infantil. Referimo-nos concretamente a situações de sofrimento fetal, asfixia neonatal ou outras exigindo internamento em unidades de cuidados intensivos.

3º - Terem entre 18 e 96 meses (um ano e meio e oito anos) na altura da avaliação instrumental.

4º - Residirem em território nacional e falarem português, uma vez que tanto o avaliador como o instrumento de avaliação utilizam esta língua. Esta circunstância obrigou à exclusão de alguns elementos elegíveis.

5º - Não serem detentoras de características insuscetíveis de comparação no grupo controle.

Na seleção dos grupos controle replicaram-se as características demográficas do grupo índice, selecionando as crianças elegíveis de forma tão aleatória quanto possível. Ou seja, sempre que surgia mais do que uma criança demograficamente comparável com outra da amostra índice, a seleção era feita ao acaso. Dando um exemplo concreto: foram avaliados dois gémeos dizigóticos de sexo diferente, na amostra índice e também foram avaliados dois gémeos da mesma idade e dizigóticos no controle, ambos residentes nos arredores de Lisboa e do mesmo estrato socioeconómico. Se tivéssemos dispostos de mais do que um par de gémeos com estas características, teríamos escolhido um dos pares ao acaso.

A somar às dificuldades de construção da amostra atribuíveis à pouca acessibilidade e ao escasso número de crianças elegíveis, tivemos a dificuldade acessória imposta pelo índice de prematuridade, e de problemas perinatais parecer ser mais elevado entre as crianças da PMA, e tais antecedentes serem impeditivos de participação no estudo.

O facto da metodologia impor que o português fosse a primeira língua das crianças à data da sua avaliação, também obrigou à exclusão de elementos elegíveis, concretamente crianças filhas de pais estrangeiros mas residentes no país.

Na elaboração dos grupos controle não houve dificuldades comparáveis, devido à superioridade numérica. Constatou-se também, que alguns pais recusaram integrar um estudo desta natureza, sugerindo que evitavam recordar as dificuldades vividas no passado.

Estabelecidos os critérios de seleção, iniciámos este estudo com uma amostra de 60 crianças, sendo que 19 estiveram submetidas a criopreservação na sua fase embrionária e dois grupos controle idênticos, em que um é constituído por 22 crianças concebidas com FIV/ICSI sem criopreservação e outro por 19 crianças concebidas naturalmente.

Pelas razões expostas, foram despendidos vários anos na busca e avaliação duma amostra numericamente segura, como a que obtivemos ao termos conseguido avaliar 7,3% deste universo populacional.

3.2.3 – Constituição das amostras e sua caracterização demográfica

Após terem sido definidas as características da população a estudar, foram definidos os critérios de amostragem, e foi feita a seleção dos elementos das amostras de controle, tão aleatoriamente quanto possível.

Foram estabelecidos os critérios de seleção com base nas características demográficas pretendidas e as amostras estudadas foram selecionadas pela sua conveniência (amostragem não-aleatória). Constituíram-se três grupos demograficamente equiparáveis: o **grupo índice** que **designaremos** ao longo do texto por **grupo A** e em que todos os elementos foram submetidos a criopreservação na sua fase embrionária (TEC), um grupo de **crianças concebidas com FIV/ICSI** mas cujos

embriões foram transferidos a fresco (não estiveram criopreservados) designado por **grupo B** e um grupo de **crianças concebidas naturalmente** que constituiu o **grupo C**.

Não foram estabelecidas subamostragens dependentes de outras características, nomeadamente dos procedimentos da PMA nem procurámos detalhar a tecnologia subjacente. Partimos do princípio que os participantes foram todos oriundos de centros de Reprodução Humana, onde é utilizada tecnologia homologada e equiparável.

De acordo com os critérios estabelecidos e já referidos, a população índice selecionada para este estudo, englobou 19 crianças residentes em Portugal, tendo como primeira língua o português, maiores de 18 meses e menores de oito anos (mínimo de 18 e máximo de 96 meses na altura da avaliação instrumental), nascidas com pelo menos 36 semanas de IG, sem patologia perinatal relevante e cujos embriões estiveram criopreservados. O tempo de criopreservação embrionária não constituiu factor de exclusão ou de inclusão, e nem sempre pôde ser determinado.

A amostra de controle foi dividida em dois grupos diferentes, constituídos por crianças com características demográficas idênticas, mas com a particularidade de não terem sido submetidas a criopreservação na sua fase embrionária embora pudesse ter havido PMA.

3.2.4 – Caracterização demográfica da amostra global

Os dados demográficos, e relativos às técnicas de PMA, foram fornecidos voluntária e individualmente pelos pais dos participantes à autora deste estudo, no âmbito duma relação médico doente.

Verificou-se que um número elevado de participantes desconhecia ou dizia não recordar as tecnologias utilizadas no seu processo. Alguns beneficiários da PMA ignoravam o significado do termo «ICSI» ou as suas indicações, tendo-se optado por não colocar questões desta natureza, ainda que se registassem todas as informações cedidas espontaneamente. A designação «TEC», de registo indispensável para o nosso estudo, mostrou ser melhor conhecida, quanto mais não fosse pelas implicações

temporais. Repare-se que uma TEC nunca é a primeira tentativa, o que confere *à priori*, características diferentes a este grupo.

Tanto a idade média como o grau académico dos pais que recorrem à PMA, tende a ser mais elevado do que aquele que é encontrado na média da população mas, neste trabalho, procurámos que as características demográficas dos progenitores fossem homogéneas. Terão persistido ligeiras assimetrias demográficas, entre os três grupos do estudo, mas houve a preocupação de as minimizar, quer relativamente às crianças quer aos seus pais.

3.2.5 - Procedimentos de avaliação clínica e instrumental

Os procedimentos usados na avaliação da amostra incluíram:

(1) Entrevista clínica aos pais das crianças elegíveis cujo consentimento se pretendeu que fosse o mais informado possível.

(2) Análise documental das circunstâncias da conceção, gravidez, período perinatal e evolução posterior, desde que disponível.

(3) Observação e avaliação neurocomportamental das crianças selecionadas.

Todos os participantes foram submetidos a uma análise global do neurodesenvolvimento e comportamental, realizada por observação direta e avaliação instrumental. Porque era importante distinguir os vários aspectos do neurodesenvolvimento, optámos pelas Escalas de Desenvolvimento de Ruth Griffiths¹⁴², que se complementaram com o Questionário de Capacidades e de Dificuldades (SDQ-Por) (Anexo 2) instrumentos estes que foram descritos na parte 2 deste texto. Ou seja, a pesquisa de eventuais assimetrias de desempenho entre o grupo índice e os de controle foi obtida com instrumentos clínicos e instrumentais.

¹⁴² Escalas de Desenvolvimento de Ruth Griffiths, reconhecidas pela “Association for Research in Infant and Child Development”

3.2.5.1 - Triagem inicial e pré seleção dos dados anamnéticos

Na fase de pré-seleção, foi feita uma triagem sumária com a inclusão das crianças num dos três grupos estabelecidos. Esta pré-seleção foi prolongada e feita num contexto clínico que decorreu em simultâneo com outras etapas da investigação e em que se valorizou:

- Idade da criança em meses - contada a partir do seu nascimento e sem correção para uma eventual prematuridade limiar ¹⁴³.
- Causas da infertilidade – apenas se registou se os factores eram masculinos, femininos ou mistos. Deparamos com alguns casos de fator desconhecido e também com um relativo desconhecimento dos factos.
- Métodos usados na concepção – devido à reduzida dimensão do grupo índice, considerámos apenas três situações para estudo: fertilização natural, FIV/ICSI com transferência a fresco e com criopreservação.
- Idade da gestante em anos, na altura do nascimento.
- Idade do pai em anos, na altura do nascimento mesmo que não fosse o pai biológico.
- Tempo de criopreservação do embrião se disponível.
- I.G. contada pelos métodos habituais que são: data da última menstruação, data da transferência embrionária ou avaliação ecográfica e/ou clínica na ausência dos dois dados anteriores.
- Existência de patologia anterior ou concomitante à gravidez.
- Tipo de parto
- Sexo

¹⁴³ A amostra contém algumas crianças nascidas com mais de 36 mas menos de 37 semanas de IG e que por isso devem ser consideradas pré termo. Na avaliação de uma criança nascida pré-termo, e até que complete 2 anos, pode corrigir-se a idade para as 40 semanas. Ou seja, teoricamente uma criança nascida com 36 semanas de IG, ao atingir por exemplo as 5 semanas cronológicas, deve ser equiparada a outra de apenas uma semana mas que tenha nascido com 40 semanas de IG.

- Peso ao nascer, com referência à restrição de crescimento intrauterino (RCIU) e à macrosomia fetal, representados por um desenvolvimento estatura-ponderal inferior ou superior a dois desvios-padrão da média da população [não existem valores universais nem tabelas nacionais. Na avaliação da biometria e cálculo do peso fetal, foi sistematicamente utilizada a fórmula de *Hadlock et al. (1991)*].
- Condição do RN à nascença sendo excluídos os que necessitaram de cuidados intensivos (UCIRN). Considerámos que as situações patológicas que não permitem a seleção dum caso controle adequado, já que duas situações nunca são iguais do ponto de vista do paciente.
- Circunstâncias relevantes do estado de saúde, desenvolvimento estatura ponderal ou psicomotor já conhecidas.
- Existência e características da fratria. Procurámos que cada caso índice de gémeos tivesse casos paralelos nos grupos controle o que nem sempre foi possível.
- Circunstâncias sociais, económicas e culturais dos pais, tendo por base uma avaliação segundo Graffar (Anexo 1)

O método utilizado na caracterização das amostras, foi a análise documental dos boletins de registo da saúde infantil, complementada com uma entrevista a pelo menos um dos progenitores. Na presença ou suspeita de anomalias do desenvolvimento somático ou estatura ponderal, foi feita uma triagem clínica.

Fizémos um estudo comparativo dos grupos triados e como se tratou dum estudo controlado, realizámos alguns ajustes necessários à maior similitude demográfica possível entre eles. Concretizando melhor, tivemos de excluir uma fratria de trigêmeos TEC a que tivemos acesso, e que daria mais robustez à nossa amostra, devido à impossibilidade de cruzar dados com trigêmeos espontâneos, uma ocorrência extremamente rara e indisponível.

3.2.5.2 - Colheita e sumarização das variáveis em estudo

Na pré-triagem documental e clínica, analisámos todas as condições materno-fetais, neonatais e de evolução posterior. Seguidamente, por questões práticas e relativas ao tamanho da amostra, só prosseguimos a análise dos principais aspectos nosológicos relacionados com o neurodesenvolvimento infantil e que foram as seguintes:

a) Origem da infertilidade sem definição das causas:

a.1 - Masculina

a.2 - Feminina

a.3 - Mista

b) Método de fertilização:

b.1 - Natural,

b.2 - FIV/ICSI com transferência a fresco e

b.3 - FIV/ICSI com criopreservação

c) Idade gestacional em semanas completas

d) Existência de patologia na gravidez:

d.1 - Anterior à gravidez

d.2 - Concomitante à gravidez

d.3 – Ambas

e) Gemelaridade:

e.1 Gemelaridade monozigótica

e.2 Gemelaridade dizigótica

f) Sexo do recém-nascido:

f.1 Masculino

f.2 Feminino

g) Peso ao nascer (PN): em gramas.

h) Classificação segundo Graffar (Graffar 1, 2, 3 ou 4)

A colheita dos dados clínicos e a caracterização sociodemográfica dos participantes foi feita através de contacto pessoal.

3.2.5.3 – Aplicação dos instrumentos psicométricos

3.2.5.3.1 – Características das EDMG 0-2 e 2-8 anos

Neste trabalho de investigação foi utilizada (exceto em 1 caso) a Escala de Desenvolvimento Mental de Griffiths dos 2 aos 8 anos – Extensão revista (Luiz, D.M., et al., em 2006) na sua edição em português a qual é da responsabilidade da CEGOC-Tea que comercializa o teste¹⁴⁴. Nesta versão que contem ficha de identificação, a tradução e as normas de aplicação das escalas são da responsabilidade do Grupo de Tutores Griffiths portugueses que detém os direitos de autor.

Na parte 2 do texto, fizemos a descrição do conteúdo e do potencial psicométrico das EDMG, pelo que aqui só focaremos os principais aspectos práticos e estruturais.

Relativamente à versão que utilizámos, são do editores¹⁴⁵ os seguintes comentários :

« ... A Griffiths dos 2 aos 8 anos avalia, individual e coletivamente, seis áreas do desenvolvimento (...) O examinador recolhe informações relacionadas com o tipo de

¹⁴⁴ CEGOC – TEA - Centro de Estudos de Gestão e Organização Científica - Técnicos Especializados Associados, Lda. Representa em Portugal o grupo internacional CEGOS dedicado ao desenvolvimento vocacional, consultadoria empresarial e *managment*. Comercializa numerosos instrumentos psicométricos reconhecidos internacionalmente.

¹⁴⁵ <http://www.cegoc.pt/teste/escala-de-desenvolvimento-mental-de-griffiths-2-8-anos-edicao-2006/>

comportamentos que a criança apresenta em cada uma das áreas. A análise dos resultados é feita com base no total de itens que a criança executa.»

As EDMG preveem **6 subescalas** (aqui designadas por letras de A a F) que avaliam as principais competências discriminadas por idades e que são:

A – Locomotora: Avalia o desenvolvimento e controle motor, quer da motricidade fina quer grosseira, incluindo o equilíbrio e a coordenação, através de tarefas adequadas às várias idades, tais como correr, saltar, subir e descer escadas, andar de bicicleta entre outras.

B – Pessoal/Social: avalia o desenvolvimento da autonomia nas atividades diárias (por ex. vestir e despir) e a socialização revelada pela adaptação e interação social. Também são avaliados os conhecimentos sobre a identidade como o nome, a morada e outros itens de acordo com a idade.

C – Audição e Linguagem: avalia o desenvolvimento linguístico através da linguagem recetiva (por ex. identificação e descrição de semelhanças entre conceitos e objetos) e expressiva (por ex. descrição de uma imagem).

D – Coordenação olho-mão: avalia a destreza manual, as competências visio-motoras e o desenvolvimento da motricidade fina através de exercícios manuais.

E – Realização: avalia competências visio-espaciais, valorizando a velocidade e precisão dos gestos (por ex. encaixe de figuras geométricas)

F – Raciocínio Prático: só é aplicado depois do 3º ano e avalia a capacidade de raciocínio, de cálculo matemático e de resolução de questões práticas (por ex. noção de número e tamanho, de sequências crescentes e decrescentes e noções de tempo).

A aplicação deste método de Ruth Griffiths exige um conjunto de objetos que estão padronizados e que são muito apelativos, semelhantes a brinquedos e que podem ser culturalmente adaptados. Os materiais são utilizados, como se se tratasse de um jogo entre o avaliador e a criança, e permitem quantificar vários aspectos do

desenvolvimento infantil entre os quais realçamos (Jacklin, L., Cockcroft, K. - 2012), (Hsiao, C., Richter L.M. – 2014):

1. Observar a interação da criança com o seu meio ambiente
2. Acompanhar a evolução das etapas do desenvolvimento e dos padrões de organização que os acompanham, os quais podem ser reveladores das funções neuro motoras subjacentes.
3. Avaliar o desenvolvimento global, partindo quer da avaliação do comportamento quer do desempenho e da interação de ambos.
4. Medir as etapas do desenvolvimento mais significativas para a expressão da inteligência, ou para o crescimento mental funcional.

Os valores obtidos nas avaliações, podem ser convertidos em «Idade de Desenvolvimento» após terem sido aferidos com os resultados padronizados (percentis e notas-z). Com esta bateria de testes é possível quantificar os desvios padrão, relativamente à média da idade.

Além dos valores quantitativos que se obtêm, as EDMG permitem a interpretação do perfil de cada criança mediante a análise qualitativa do seu desempenho, relativamente a inúmeros aspectos relevantes, tais como a manutenção da atenção, o empenho revelado na tarefa, a adesão aos desafios propostos, tipo de abordagem e estratégias utilizadas (Mata L., Peixoto, F. - 2012).

As EDMG utilizadas nesta investigação, estavam devidamente padronizadas e eram constituídas pelo seguinte material: Manual Técnico, Manual de Administração, Caderno de Registo, Caderno de Grafismos e conjunto de Materiais Estandarizados (figuras 15 e 16).



Fig. 15 - Kit Griffiths 0-2 anos



Fig. 16 - Kit Griffiths 2-8 anos

3.2.5.3.2 - Aplicação e cotação das EDMG

Todas as avaliações instrumentais desta investigação, decorreram no mesmo espaço físico e em condições experimentais muito idênticas.

A aplicação das escalas foi feita por uma psicóloga especialista na área e, todas as variáveis que foi possível controlar, foram mantidas constantes com todos os avaliados. Devido à idade dos participantes foi permitida a proximidade (mas não a presença), de um dos progenitores durante a aplicação das EDMG.

Houve um compromisso mútuo, entre a autora da dissertação e a psicóloga, de serem mantidas incógnitas as hipóteses em estudo e os dados anamnésticos das crianças, até ao fim das avaliações. Para cumprir este objetivo, todas as fichas de identificação foram limitadas ao nome próprio da criança, data de nascimento e telefone de contacto. Esta preocupação teve por objetivo reduzir um eventual viés durante as avaliações instrumentais. O sigilo previsto no consentimento informado, estava garantido à partida, pelas rigorosas regras deontológicas dos profissionais envolvidos.

Os resultados foram analisados tendo em conta as médias e os desvios-padrão descritos no Manual Técnico da “Escala de Desenvolvimento Mental de Griffiths (2-8 anos)” (Luiz et al., 2006) que ainda reportam a aferição das escalas para a população britânica. A este propósito, os responsáveis fornecem as seguintes informações complementares:

«A versão portuguesa da Griffiths é uma tradução da versão original Inglesa. Assim, as tabelas de normas apresentadas correspondem aos resultados da tipificação realizada no Reino Unido (...). Conversão em Percentis e notas Z dos resultados brutos para cada Subescala e para a Escala Geral, dos 24 aos 96 meses (com intervalos de 6 meses). O Manual Técnico apresenta um método de cálculo da Idade Mental (de Desenvolvimento), com base nas tabelas de percentis.

CORRECÇÃO MANUAL: QUALITATIVA. A pontuação atribuída a cada área, é calculada com base na qualidade do desempenho da criança em cada item. A informação necessária para a correção desta prova encontra-se no manual de administração e no caderno de registo.»

O tempo disponibilizado ou dispendido na realização de cada uma das subescalas, encontra-se padronizado. É possível identificar a idade mental (IM) da criança e situá-la comparativamente à sua idade cronológica (IC). É igualmente possível definir um perfil das áreas mais ou menos desenvolvidas. Os valores obtidos podem ser convertidos em resultados padronizados (percentis e notas-z) e também na Idade de Desenvolvimento.

O conjunto dos valores de cada subescala fornece dados representativos do Q.I (quociente intelectual) através de uma equação: $IM \times 100 / IC = QI$. O Quociente de Inteligência (QI) geral, é obtido através da média dos 6 sub- quocientes.

3.2.5.3.3 – Características do SDQ-Por

O Questionário de Capacidades e de Dificuldades (SDQ-Por) é, como descrevemos na parte 2 do texto, a versão portuguesa do questionário criado por Robert Goodman e designado originalmente *Strengths and Difficulties Questionnaire* (SDQ). Trata-se dum questionário de triagem do tipo papel-e-lápis, muito fácil de administrar e cotar (anexo 2).

Podem surgir erros de interpretação, sobretudo quando o respondedor não é o próprio (hetero relatos) tal foi o caso neste trabalho, mas, as propriedades psicométricas e a estrutura factorial estão validadas, têm sido satisfatoriamente replicadas em vários países e a versão portuguesa (SDQ-Por) reúne todas as qualidades necessárias.

3.2.5.3.4 - Aplicação e cotação do SDQ-Por - versão de pais/ professores

Na aplicação deste instrumento, recorreu-se ao envio, para todos os pais, quer por correio electrónico quer por correio postal, dos questionários (SDQ-Por) compostos pelas 25 frases juntamente com um texto explicativo de fácil apreensão (anexo 2). Sempre que se usou correio informático, o inquérito foi anexado sob a forma de texto

editável, mantendo-se o seu aspecto habitual, para facilitar o preenchimento imediato e o reenvio pela mesma via.

Para cada uma das frases do questionário, espera-se que os respondedores assinalem uma das três hipóteses: «*não é verdade*»; «*é um pouco verdade*»; «*é muito verdade*» fazendo uma cruz no quadrado correspondente à frase que melhor define a criança avaliada, mesmo que a afirmação possa parecer estranha. As respostas reportam-se aos últimos seis meses e é desejável, mas não obrigatório, que todas as questões sejam respondidas.

O questionário está organizado em 5 escalas e cada uma tem 5 frases ou itens que no conjunto totalizam as 25 frases já referidas. Cada item tem 3 opções de resposta. A opção «*é um pouco verdade*» é sempre cotada com 1. Cada uma das outras opções (*não é verdade / é muito verdade*) pode ser cotada com 0 ou 2 pontos, conforme o item, tal como é apresentado, escala por escala no anexo 3. A pontuação total de cada uma das 5 escalas pode variar entre 0 e 10, se os 5 itens tiverem sido todos respondidos. O resultado de cada escala pode ser validado desde que, pelo menos 3 itens tenham sido respondidos.

A cotação dos testemunhos parentais recolhidos através do SDQ-Por, foi feita pela autora desta dissertação.

3.2.6 – RESULTADOS GERAIS

Os resultados gerais da investigação decorrem dos dados colhidos com a anamnese, complementada com a avaliação psicométrica decorrente da aplicação das EDMG usadas como instrumento de avaliação do neurodesenvolvimento infantil e o testemunho parental avaliado através do SDQ- Por.

3.2.6.1 – Resultados demográficos e anamnésticos dos grupos estudados

Foram avaliadas 60 crianças distribuídas por 3 grupos (designados grupo A – TEC; grupo B – transferência a fresco; grupo C - concepção natural) que possuíam as seguintes características demográficas:

Grupo A – formado por 19 crianças cujos embriões estiveram criopreservados (TEC) e que nasceram entre janeiro de 2007 e agosto de 2010. Tinham idades compreendidas entre os 21 e os 96 meses à data da avaliação EDMG e SDQ-Por, sendo a sua **idade média 51 meses**.

Todas as crianças do grupo tiveram um questionário anamnóstico preenchido mas só 17 completaram a avaliação com as EDMG. Duas irmãs gémeas interromperam as provas devido à sua patologia do espectro do autismo e uma outra criança teve a sua avaliação adiada, devido a uma situação de sono e fadiga durante a aplicação do instrumento que, caso não fosse respeitada, conduziria a resultados alterados. 14 das 19 crianças completaram o questionário SDQ-Por e 11 preencheram todos os itens do processo de avaliação.

Grupo B – formado por 22 crianças cuja conceção incluiu FIV/ICSI, com transferência embrionária feita a fresco e que nasceram entre janeiro de 2006 e outubro de 2012. Tinham idades compreendidas entre os 33 e os 85 meses à data da avaliação, sendo a sua **idade média 56 meses**.

Todas as crianças deste grupo completaram o questionário anamnóstico e a avaliação com as EDMG. 11 completaram o questionário SDQ-Por. Ou seja, 11 preencheram todos os itens do processo de avaliação.

Grupo C – formado por 19 crianças de conceção natural e nascidas entre maio de 2007 e março de 2012. Tinham idades compreendidas entre os 20 e os 85 meses à data da avaliação, sendo a sua **idade média 48 meses**.

Todas as crianças completaram o questionário anamnóstico, 19 fizeram avaliação e apenas uma criança não completou a totalidade das escalas EDMG. 12 completaram o questionário SDQ-Por. Neste grupo 11 crianças preencheram todos os itens do processo de avaliação.

Fizemos uma triagem e seleção dos dados anamnísticos, e quantificámos as seguintes variáveis demográficas nos três grupos em estudo:

1 – **Causas de infertilidade** – foram abordadas de forma global em causas masculinas, femininas ou mistas sem discriminação de sub tipos.

Esta informação só se aplica aos grupos A e B e só foi definida em 35 dos 41 casos. No grupo A encontramos dois casos de infertilidade atribuível aos dois membros do casal, 5 casos de origem masculina, 8 de causa feminina e 4 desconhecidos. No grupo B encontramos 1 caso de infertilidade respeitante aos dois membros do casal, 8 casos de origem masculina, 10 de causa feminina e 3 desconhecidos.

2 - **Método de fertilização** – no grupo A houve 5 casos confirmados de ICSI em 15 casos conhecidos (33,3%) e no grupo B houve 7 casos de ICSI em 19 reportados (36,8%).

3 - **Idade Gestacional (IG)** – no grupo A a IG média é de 37 semanas e 4 dias, no grupo B é de 38 semanas e no grupo C é de 38 semanas e 2 dias

4 – **Existência de patologia na gravidez** – registámos, quando referida, toda a patologia crónica ou ocorrida durante a gravidez mas, as complicações encontradas foram escassas e indistintas nos 3 grupos, não parecendo ter influenciado os resultados.

5 – **Gemelaridade** - Registou-se o número e tipo de gémeos e verificou-se que nos grupos da PMA houve uma incidência de gestações gemelares muito superior, e impossível de equiparar quando foram selecionados os participantes naturalmente concebidos. Tentámos mesmo assim, homogeneizar os 3 grupos.

No grupo A houve 9 crianças provenientes de gestação gemelar. Todos os casos foram de gemelaridade dizigótica mas o número é impar porque um gémeo possuía uma alteração cromossómica e não sobreviveu. No grupo B houve 6 crianças de gravidez gemelar e dizigótica. No grupo C houve 2 crianças também gémeas dizigóticas.

6 – **Sexo** - No grupo A houve 9 rapazes (45%) e 10 raparigas; no grupo B houve 16 rapazes (72,7%) e 6 raparigas e no grupo C houve 6 rapazes (31,6%) e 13 raparigas. No total dos 3 grupos encontramos 31 rapazes e 29 raparigas.

7 – **Peso ao nascer (PN)**. No grupo A o peso médio ao nascer foi de 2594g, no grupo B foi de 2842g e no grupo C foi de 3105g

8 – Utilizámos o método de Graffar (anexo 1) para caracterizar as **variáveis socio demográficas** dos progenitores, e partimos dos dados fornecidos pelo casal. Apesar do

método estar estandardizado, o aspeto que mais valorizámos foi o nível de escolaridade dos pais e as condições e área de residência (predominantemente urbana ou rural). A maioria dos pais da nossa amostra pertencia aos grupos 2 e 3 da classificação de Graffar, com uma percentagem de licenciados superior à média da população portuguesa. Devido à importância do ambiente socio cultural, na evolução do neurodesenvolvimento e comportamento infantil, estas diferenças foram ativamente esbatidas na seleção da amostra e formação dos grupos de estudo.

3.2.6.2 - Resultados das avaliações do neurodesenvolvimento e comportamento

3.2.6.1. - Resultados obtidos nas EDMG

Os 96 itens das EDMG estão ordenados por ordem de dificuldade e compõem várias sub escalas. A avaliação é interrompida quando a criança falha cinco itens sucessivos. Este instrumento de avaliação psicométrica permite calcular um valor global para cada criança, designado por Escala Geral (referida originalmente como *score*) sendo a pontuação máxima 100 meses.

As sub escalas estão organizadas por anos, correspondendo cada ano a uma pontuação máxima de 12 meses sendo que, a sua soma, dá origem à Idade Mental (IM) a qual é obtida através da média dos resultados de cada uma das subescalas.

Os itens que compõem as escalas estão suficientemente aferidos, internacionalmente, para poderem ser fiáveis e reprodutíveis, e são cotados percentualmente, o que confere ao teste grande sensibilidade.

Nos quadros 6, 7 e 8 apresentamos os resultados dos grupos que designámos por A (TEC), B (FIV/ICSI com transferência a fresco) e C (conceção natural).

TEC NºCASO	IDADE MESES	DESENV. MOTOR	DESENV. SOCIAL	LINGUAGEM	COOR DENAÇÃO	REALI ZAÇÃO	PRÁTICA	Q.GERAL
1.M	38	84	95	90	73	90	84	86
2.F	38	100	95	79	90	95	80	91
3.M	29	104	114	114	92	107	107	106
4.F	47	110	130	115	102	115	102	112
5.M	48	116	125	104	96	112	104	108
6.M	43	107	111	79	84	79	74	89
7.F	52	122	126	96	100	104	93	107
8.M	28	93	107	100	93	114	107	102
9.F	21	100	100	95	95	95	-	97
10.F	55	120	127	127	109	105	109	116
11.M	60	117	123	127	100	107	117	115
12.F	58	93	103	107	117	110	110	107
13.M	46	91	117	143	91	121	109	112
14.M	71	102	104	113	123	102	110	109
15.M	96	83	98	102	100	104	104	99
16.F	96	100	102	85	104	96	102	98
17.F	46	-	-	-	-	-	-	autismo
18.F	46	-	-	-	-	-	-	autismo
19.F	57	-	-	-	-	-	-	incompleto

Quadro 6 - resultados do grupo A nas EDMG (TEC; M = masculino; F = feminino)

TRANSF. FRESCO CASO Nº	IDADE MESES	DESENV. MOTOR	DESENV. SOCIAL	LINGUAGEM	COORDENAÇÃO	REALIZAÇÃO	PRÁTICA	Q. GERAL
20.F	72	110	119	115	114	106	114	113
21.M	72	100	119	122	139	106	113	117
22.M	70	103	83	91	89	89	88	91
23.M	38	116	121	126	89	121	100	112
24.M	49	87	87	91	85	87	87	87
25.M	67	119	125	92	113	116	104	112
26.M	67	89	125	113	113	101	110	109
27.M	30	113	120	100	107	113	107	110
28.M	43	126	126	102	116	112	116	116
29.M	51	118	116	94	82	113	106	105
30.M	51	113	118	122	122	118	106	117
31.F	77	83	94	112	81	101	99	95
32.M	54	119	122	133	111	125	119	122
33.F	30	131	124	103	103	110	97	111
34.F	60	107	116	127	120	100	93	111
35.F	50	92	104	96	84	108	92	96
36.F	29	117	131	110	110	103	103	112
37.M	85	116	108	108	106	111	115	111
38.M	84	114	119	119	116	119	119	118
39.M	73	79	88	110	104	104	104	90
40.M	33	112	112	106	106	100	112	108
41.M	60	99	102	108	98	102	102	102

Quadro 7 - resultados do grupo B nas EDMG (TRANSF. FRESCO; M = masculino; F = feminino)

PROCRIAÇÃO NATURAL CASO Nº	IDADE MESES	DESENV. MOTOR	DESENV. SOCIAL	LINGUAGEM	COOR DENAÇÃO	REALI ZAÇÃO	PRÁTICA	Q. GERAL
42.M	49	118	107	102	94	106	94	104
43.F	49	92	106	102	106	114	94	102
44.F	36	117	122	122	100	111	111	114
45.M	39	113	113	107	87	123	97	107
46.F	42	124	119	142	86	105	100	113
47.F	30	113	120	113	100	93	107	108
48.F	27	118	111	104	100	100	111	107
49.F	48	108	113	117	83	100	108	104
50.M	74	108	108	111	105	97	114	107
51.F	25	120	144	112	100	100	112	115
52.F	85	96	96	109	116	101	104	104
53.F	60							Incompleto
54.M	53	109	117	113	98	113	117	111
55.M	83	99	106	99	118	101	96	103
56.M	37	119	97	108	97	103	92	103
57.F	34	106	106	141	94	112	106	111
58.F	20	110	115	74	105	110		103
59.F	53	125	132	120	106	117	109	118
60.F	44	140	126	130	102	121	112	122

Quadro 8 - resultados do grupo C nas EDMG (fertilização natural; M = masculino; F = feminino)

Como já foi referido, uma minoria de crianças, por razões diversas, não completou algumas das etapas previstas na sua avaliação.

Respeitando a maior homogeneização demográfica possível, mesmo dentro dos constrangimentos que amostras populacionais desta natureza impõem, tentámos manter uma distribuição equilibrada dos dois sexos nos três grupos:

A - 10F/9M

B - 6F/16M

C - 13F/6M.

Não houve intencionalidade de estabelecer um predomínio masculino no grupo B ou um predomínio feminino no grupo C e acreditamos que tais circunstâncias não alteraram os resultados globais.

Em seguida fomos comparar os 3 grupos nas seis áreas de desenvolvimento, e ainda um grupo formado pela união dos grupos A+B correspondente a todas as crianças de PMA, versus as de procriação natural e encontramos os seguintes resultados de quocientes parciais e gerais com os respetivos desvios padrão:

A – Locomoção/ Desenvolvimento motor: avalia a motricidade global incluindo o equilíbrio, a coordenação e o controle dos movimentos.

Grupo A – valor médio 102,63 (valores extremos 83-122) desvio padrão 6,24

Grupo B – valor médio 107,40 (valores extremos 79-131) desvio padrão 7,21

Grupo A+B – valor médio 105,39 (valores extremos 79-131) desvio padrão 7,21

Grupo C – valor médio 113,05 (valores extremos 92-140) desvio padrão 6,93

B - Desenvolvimento pessoal – social: avalia as competências sociais ao nível da autonomia e a capacidade de interação com os cuidadores e os pares.

Grupo A – valor médio 111,06 (valores extremos 95-130) desvio padrão 5,92

Grupo B – valor médio 112,68 (valores extremos 83-131) desvio padrão 6,93

Grupo A+B – valor médio 112 (valores extremos 83-131) desvio padrão 6,93

Grupo C – valor médio 114,33 (valores extremos 96-144) desvio padrão 6,93

C – Audição/ Linguagem: avalia a linguagem recetiva e expressiva.

Grupo A – valor médio 104,75 (valores extremos 79-143) desvio padrão 8,0

Grupo B – valor médio 109,09 (valores extremos 91-133) desvio padrão 6,48

Grupo A+B – valor médio 107,26 (valores extremos 79-143) desvio padrão 8,0

Grupo C – valor médio 112,55 (valores extremos 74-141) desvio padrão 8,18

D - Coordenação olho-mão: avalia a motricidade fina, a destreza manual e as competências visio-motoras.

Grupo A – valor médio 98,06 (valores extremos 73-117) desvio padrão 6,63

Grupo B – valor médio 104,90 (valores extremos 84 -122) desvio padrão 6,16

Grupo A+B – valor médio 102,02 (valores extremos 73-122) desvio padrão 7,0

Grupo C – valor médio 99,83 (valores extremos 83-118) desvio padrão 5,91

E - Realização (performance): avalia as capacidades visio-espaciais, incluindo a rapidez de execução e precisão.

Grupo A – valor médio 103,50 (valores extremos 90-121) desvio padrão 5,92

Grupo B – valor médio 107,50 (valores extremos 87 -125) desvio padrão 6,16

Grupo A+B – valor médio 105,81 (valores extremos 87-125) desvio padrão 6,16

Grupo C – valor médio 107,05 (valores extremos 93-121) desvio padrão 5,29

F – Raciocínio Prático: avalia a capacidade da criança resolver problemas práticos, ordenar sequências e a forma como faz a abordagem de questões morais.

Grupo A – valor médio 100,80 (valores extremos 74-117) desvio padrão 6,56

Grupo B – valor médio 104,81 (valores extremos 87 -119) desvio padrão 5,66

Grupo A+B – valor médio 103,72 (valores extremos 74-119) desvio padrão 6,70

Grupo C – valor médio 104,94 (valores extremos 92-117) desvio padrão 5

Relativamente ao **quociente geral** encontramos as seguintes diferenças:

Grupo A – valor médio 103,4 (valores extremos 86-116) desvio padrão 5,48

Grupo B – valor médio 107,5 (valores extremos 87 -118) desvio padrão 5,57

Grupo A+B – valor médio 105,76 (valores extremos 86-118) desvio padrão 5,65

Grupo C – valor médio 108,7 (valores extremos 102-122) desvio padrão 4,47

3.2.6.2.2 - Resultados obtidos no SDQ-Por

O questionário foi preenchido para 40 das 60 crianças (66,6%). Tendo por modelo orientador da cotação os valores do quadro 9:

PREENCHIDO PELOS PAIS	NORMAL	LIMÍTROFE	ANORMAL
Pontuação total das dificuldades	0-13	14-16	17-40
Pontuação dos sintomas emocionais	0-3	4	5-10
Pontuação de problemas de comportamento	0-2	3	4-10
Pontuação para hiperactividade	0-5	6	7-10
Pontuação para problemas com colegas	0-2	3	4-10
Pontuação para comportamento pró-social	6-10	5	0-4

Quadro 9 – modelo de cotação do SDQ-Por preenchido pelos pais.

Obtivemos os resultados abaixo indicados, seguindo os modelos de avaliação da publicação original referida no anexo 2:

Grupo A – Das 19 crianças deste grupo, uma não tinha ainda a idade padrão para ser submetida ao questionário mas os pais quiseram responder e os resultados foram «adequados»; 15 crianças deste grupo foram avaliadas e 4 não foram. 10 tiveram valores normais, 2 tiveram um valor limítrofe e 3 tiveram um valor anormal. Relativamente ao comportamento pró-social houve 2 crianças com comportamento anormal, que se podem enquadrar no espectro do autismo e esse diagnóstico já tinha sido feito.

Grupo B – Das 22 crianças deste grupo, 11 foram avaliadas com este instrumento, 8 tiveram valores normais e 3 tiveram valores anormais.

Grupo C - Das 19 crianças deste grupo, 14 foram avaliados com este instrumento; 10 tiveram valores normais, 3 crianças tiveram um valor limítrofe e 1 teve um valor anormal.

SDQ - Resultados		ESCALAS					
		Q.Geral	Emoção	Comportamento	Hiperatividade	Relação	C. Pró-Social
Grupo A		10	11	9	12	10	12
Total 19	N	(66,6%)	(73,3%)	(60%)	(80%)	(66,6%)	(80%)
Avaliados 15 (78,94%)	L	2	2	2	3	0	0
	A N	3	2	4	0	4	2
Grupo B		8	10	7	8	7	10
Total 22	N	(72,7%)	(90,9%)	(63,6%)	(72,7%)	(63,6%)	(90,9%)
Avaliados 11 (50%)	L	-	-	1	-	2	1
	A N	3	1	3	3	2	-
Grupo A+B		18	20	15	19	16	21
Total 41	N	(69,2%)	(76,9%)	(57,69%)	(73%)	(61,53%)	(80,76%)
Avaliados 26 (63,4%)	L	2	2	3	3	2	1
	A N	6	3	7	3	6	2
Grupo C	N	10	10	10	10	10	13
Total 19		(71,4%)	(71,4%)	(71,4%)	(71,4%)	(71,4%)	(92,8%)
Avaliados 14 (73,68%)	L	3	3	1	1	3	1
	A N	1	1	3	3	1	-

Quadro 10 – Distribuição dos grupos em função dos resultados da cotação nos questionários SDQ-For.

Legenda QG = quociente geral; C = comportamento; N = normal; L = limite; AN = Anormal

3.2.7 – Resumo do estudo empírico

A parte empírica da investigação iniciou-se com uma entrevista semiestruturada, baseada no modelo convencional das histórias clínicas o que permitiu uma pré-seleção dos elementos da amostra. Definida a população, concluída a pré-seleção e selecionados os critérios de inclusão dos participantes nos grupos em estudo, foi feita a sua caracterização seguida da aplicação dos instrumentos de avaliação psicométrica.

Foi feito um estudo de *coorte* com carácter analítico não-experimental, cujo modelo foi comparativo, correlacional e descritivo.

Foram analisadas as variáveis em estudo, valorizando as taxas dos principais antecedentes e os resultados das avaliações instrumentais. Os resultados originais foram informatizados em Excel® e posteriormente exportados para o programa estatístico “*Statistical Package for the Social Sciences*” (SPSS 17.0) para Windows®.

Por se tratar dum estudo com componente retrospectiva, fomos obrigados a excluir variáveis importantes, nomeadamente particularidades dos tratamentos de infertilidade e dos diagnósticos subjacentes, por não terem sido suficientemente registadas ou não permitirem uma análise consistente.

Foi respeitado o anonimato dos participantes em todas as formas escritas incluindo tabelas. Apenas a autora do estudo manteve o acesso à identificação, ficando os dados protegidos de acordo com as normas internacionais de proteção de dados.

3.2.8 - Análise estatística

A análise estatística incluiu vários testes paramétricos e não-paramétricos de comparação de grupos e correlações bi-variadas. Em circunstâncias particulares que serão analisadas no texto, houve oportunidade para alguma análise multivariada, mas nem sempre o número de casos encontrados permitiu tal discriminação. As variáveis a serem estudadas, além das demográficas em geral (e.g., idade, sexo, método de fertilização, contexto social, etc.), foram as teoricamente relevantes a cada caso particular, constituídas pelos resultados quantitativos e qualitativos obtidos nos itens isolados e integrados das EDMG e do SDQ-Por anteriormente referidos.

Algumas das variáveis pré selecionadas não incluíam número de casos significativo e foram excluídas da análise. A partir de cada variável e sempre que possível, calculou-se a média, a mediana e o desvio padrão (entre o percentil 25 e 75).

A transformação logarítmica de alguns resultados gerou uma distribuição normal, o que permitiu o uso de métodos paramétricos de análise.

Para a comparação de variáveis qualitativas utilizou-se a prova de Qui quadrado. No caso de haver frequências esperadas baixas (< 5) utilizámos o teste exato de Fischer para tabelas de dois por dois, permitindo maximizar resultados, sem aumentar discriminações.

Em alguns casos avaliámos variáveis por subgrupos, com alguma particularidade relevante (exemplo da gemelaridade dizigótica). Aceitámos a mínima frequência esperada igual ou superior a 5 ou seja, um valor de P inferior a 0,05 ($P < 0,05$) como indicativo de significado estatístico.

3.2.9 - Análise dos resultados

Recordámos que a amostra de crianças selecionada, teve muitas características comuns: IG igual ou superior a 36 semanas, idade entre os vinte e os 96 meses na altura da avaliação, residência em território nacional e o português como língua materna, entre outros requisitos já referidos anteriormente. Sendo uma amostra de conveniência, não houve motivos de exclusão após a pré seleção, exceto os motivos impostos pela não realização ou conclusão dos testes, o que se verificou em raros casos. A análise final englobou 60 crianças e houve uma preocupação conseguida, de investigar uma amostra homogénea.

3.2.9.1 – Análise comparativa dos perfis de desenvolvimento em função da existência de criopreservação embrionária.

Com os dados recolhidos foi feita uma análise quantitativa, com base em metodologia de análise de coorte, que permitiu fazer uma avaliação da realidade em estudo, compreendendo-a e centrando-a nas relações existentes. Os resultados foram interpretados de acordo com um grau de significância $p < 0.05$. Ao longo do estudo

procurou-se estabelecer também uma relação entre estas variáveis demográficas e o neurodesenvolvimento infantil.

3.2.9.2 – Análise comparativa dos perfis de desenvolvimento em função de factores demográficos

Tanto quanto foi possível analisar, partindo duma amostra com a dimensão da que foi estudada, os perfis de neurodesenvolvimento e de comportamento não mostraram ser afetados pelo sexo e a idade das crianças, quer do grupo com criopreservação embrionária quer pertencentes aos grupos controle.

As características demográficas idênticas dos 2 grupos de PMA (um com criopreservação e outro sem) permitiram a comparação, tanto mais que as suas características pouco diferiam entre os seus elementos e entre estes e os do grupo índice. O único fator demográfico que se revelou assimétrico entre os grupos, foi uma distribuição heterogénea relativamente ao género.

Sexo – O estudo englobou 31 rapazes e 29 raparigas na totalidade, mas verificou-se uma distribuição heterogénea nos grupos a qual não foi intencional e carece de explicação. O grupo A tem 47,36% rapazes, o grupo B tem 72,7% e o grupo C tem 31,6%. Um maior número de rapazes (51,7% versus 48,3% de raparigas) na amostra global está de acordo com os valores normalmente encontrados nestes grupos etários.

Encontrada esta assimetria de distribuição, analisámos outras características demográficas em função do género e, encontrámos algumas diferenças:

A **idade média** de todos os rapazes, à data da avaliação, foi de 55,5 meses e a das raparigas foi de 47,8 meses na amostra global não sendo esta diferença estatisticamente significativa. A única diferença com significado estatístico ($p < 0,04$) que encontrámos dentro dos 3 grupos, foi a menor idade média das raparigas do grupo C que é de 42,5 meses versus a dos rapazes que é de 55,5 meses.

Foi feita uma análise multifatorial de **outros factores demográficos e características singulares** e a sua relação com os quocientes do neurodesenvolvimento obtidos nas EDMG pelos 3 grupos da amostra. Ou seja, foi analisada a variabilidade dos

perfis de neurodesenvolvimento na amostra índice e nas de controle, de acordo com características demográficas independentes das circunstâncias da fertilização, e não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

Relativamente à **gemelaridade** observou-se que os 6 gémeos dizigóticos do grupo B obtiveram um quociente médio, nas EDMG, de 110 e as restantes 16 crianças desse grupo tiveram um valor médio de 106. Esta diferença é favorável aos gémeos e estatisticamente significativa, sendo $p < 0,03$. No grupo A, pelo contrário os 7 gémeos tiveram uma pontuação ligeiramente inferior aos não gémeos. A média do quociente geral dos gémeos foi de 100 mas houve duas crianças com patologia do desenvolvimento que não completaram as EDMG e cuja participação teria baixado ainda mais este valor. Os 9 não gémeos do grupo A tiveram um quociente médio de 106. Verificou-se que os filhos únicos quer do grupo A quer do grupo B tiveram valores sobreponíveis, mas os gémeos distinguiram-se. Enquanto os gémeos TEC obtiveram valores abaixo da média do seu grupo, os outros gémeos FIV/ICSI sem criopreservação tiveram valores superiores à média do seu grupo.

Se compararmos o desempenho dos 7 gémeos do grupo A cujo quociente geral médio foi de 100 (mas pode estar sobrevalorizado como assinalámos) com o dos 6 gémeos do grupo B cujo quociente geral médio foi de 110, a diferença não chega a ter significado estatístico, mas persistam algumas dúvidas por causa dos dois casos confirmados de patologia do espectro do autismo.

Dado o elevado número de gémeos (que no grupo A corresponde a 47% das crianças e no grupo B a 27,3%), muitos são filhos do mesmo casal e irmãos entre si. Não há casos de gémeos excluídos da amostra por qualquer razão.

Na nossa amostra, a incidência comprovada de patologia pré-natal materna foi baixa, e não permitiu tirar conclusões. Admitimos que a caracterização exata dos factores maternos pode ser influenciada pelo facto de existir um número elevado de gémeos na amostra. Estas circunstâncias também poderiam ter condicionado os cálculos e a caracterização dos grupos, mas não nos apercebemos que tal tivesse acontecido. Como já referimos não houve nenhum caso de gravidez monocoriónica na amostra estudada.

Alguns elementos tanto dos grupos TEC como FIV/ICSI possuíam **características singulares** relacionadas com a fase embrionária:

Houve duas crianças gémeas dizigóticas de sexo diferente, cujos embriões criopreservados foram adotados por um casal com infertilidade mista.

Houve uma criança cujo embrião esteve criopreservado 9 anos.

Houve duas crianças irmãs, filhas de gestações diferentes, que foram submetidas a diagnóstico pré implantatório para rastreio da paramiloidose. Segundo estes pais, 70% dos embriões analisados eram portadores da mutação. As duas crianças tiveram resultados superiores à média nas EDMG mas uma delas tem alterações no questionário SDQ-Por e tem hiperatividade.

Uma criança do grupo A (TEC) foi gémea dizigótica de uma criança com uma alteração cromossómica que morreu *in utero*.

No grupo B e no grupo C existem respetivamente um rapaz e uma rapariga com alterações cromossómicas equilibradas. O rapaz tem uma alteração que envolve o cromossoma 20 e deriva de dissomia parental e a rapariga tem uma alteração do braço longo do cromossoma 15, em loci independente quer do Síndrome de Prader Willi quer da síndrome de Angelman, e herdada da mãe. Sob o ponto de vista clínico, estas duas crianças têm um fenótipo ligeiramente peculiar mas, dentro daquilo que se pode considerar variante do normal; ambas tiveram resultados dentro dos valores médios dos respetivos grupos, quer nas EDMG quer nos questionários SDQ-Por.

3.2.9.3 - Análise comparativa dos quocientes obtidos nas EDMG em função das condições embrionárias

Relativamente ao **quociente geral obtido nas EDMG**, a forma como os resultados divergiram entre os 3 grupos foi a seguinte: o valor médio obtido pelo grupo A foi de 103,4 (valores extremos 86 - 116 e mediana 106,5), tendo-se situado ligeiramente abaixo dos valores do grupo B que teve valor médio 107,5 (valores extremos 87 - 118, mediana 111) e do grupo C que teve valor médio 108,7 (valores extremos 102 - 122, mediana 107).

Se juntarmos todas as crianças de PMA, associando os grupos A com B, obtemos um quociente geral médio de 105,76 (valores extremos 86 – 118, mediana 109) e a diferença de resultados é estatisticamente significativa quando se compara com os resultados das crianças do grupo C com fertilização natural, que têm um valor médio de 108,7 (valores extremos 102 -122, mediana 107) sendo o valor calculado de $p < 0,03$.

As diferenças dos valores médios encontradas nos 3 grupos, não têm significado estatístico mas, existem diferenças significativas se se comparar a probabilidade de uma criança obter um **quociente geral** abaixo ou acima de 2 desvios padrão, nos diferentes grupos. A probabilidade desta assimetria se manifestar, foi a seguinte:

Grupo A – O quociente geral médio foi 103,4 (valores extremos 86 - 116) e 2 desvios padrão correspondem a 10,96 (limite inferior 92,44; limite superior 114,36) – Em 16 crianças, 3 têm um desenvolvimento abaixo de 2 desvios padrão e 2 tem um desenvolvimento acima de 2 desvios padrão. Sabe-se que este grupo incluiu 2 crianças¹⁴⁶(*) que, pela intensidade das suas dificuldades não completaram as EDMG mas estariam, a priori, muito abaixo de 2 desvios padrão. A sua omissão nos resultados enviesou, por excesso, o quociente geral.

Grupo B – O quociente geral médio foi 107,5 (valores extremos 87-118) e 2 desvios padrão correspondem a 11,14 (limite inferior 96,36; limite superior 118,64) – Em 21 crianças, 5 têm um desenvolvimento abaixo de 2 desvios padrão e uma tem um desenvolvimento acima de 2 desvios padrão.

Grupo A+B – O quociente geral médio foi 105,76 (valores extremos 86 - 118) e 2 desvios padrão correspondem a 11,3 (limite inferior 94,46; limite superior 117,06) - Em 37 (+2*) crianças, 8 (+2*) têm um desenvolvimento abaixo de 2 desvios padrão e 2 tem um desenvolvimento acima de 2 desvios padrão.

Grupo C – O quociente geral médio foi 108,66 (valores extremos 102 - 122) e 2 desvios padrão correspondem a 8,94 (limite inferior 99,72; limite superior 117,7) – Em

¹⁴⁶ (*) 2 crianças do sexo feminino, gémeas dizigóticas ambas com patologia do espectro do autismo. Uma tem um atraso ligeiro do desenvolvimento psicomotor e a outra tem um atraso moderadamente grave

18 crianças, nenhuma tem um desenvolvimento abaixo de 2 desvios padrão e 2 têm um desenvolvimento acima de 2 desvios padrão.

Fazendo a análise dos resultados obtidos a partir das **sub escalas das EDMG** verificaram-se os seguintes resultados:

A – Locomoção/ Desenvolvimento motor:

O valor médio obtido pelo grupo C foi 113,05 (valores extremos 92 - 140) e superou os restantes grupos [Grupo A – valor médio 102,63 (valores extremos 83 - 122), Grupo B – valor médio 107,40 (valores extremos 79 - 131) e Grupo A+B – valor médio 105,39 (valores extremos 79 - 131)]. Esta diferença é estatisticamente significativa ($p < 0,03$) quando se compara o grupo TEC com o grupo da procriação natural, mas não é significativa entre o grupo de procriação natural e o grupo FIV/ICSI de transferência a fresco.

B - Desenvolvimento pessoal – social:

O grupo C com valor médio 114,33 (valores extremos 96 - 144) superou ligeiramente os restantes, mas as diferenças entre grupos não são significativas [Grupo A – valor médio 111,06 (valores extremos 95 - 130); Grupo B – valor médio 112,68 (valores extremos 83 - 131); Grupo A+B – valor médio 112 (valores extremos 83 -131)]

C – Audição/ Linguagem: avalia a linguagem recetiva e expressiva.

O valor médio obtido pelo grupo C foi 112,55 (valores extremos 74 - 141) e superou os restantes grupos [Grupo A – valor médio 104,75 (valores extremos 79 - 143), Grupo B – valor médio 109,09 (valores extremos 91 - 133) e Grupo A+B – valor médio 107,26 (valores extremos 79 - 143). Esta diferença é estatisticamente significativa ($p < 0,01$) quando se compara o grupo TEC com o grupo da procriação natural, mas não é significativa entre este e o grupo FIV/ICSI de transferência a fresco.

D - Coordenação olho-mão:

Esta foi a única sub escala em que o grupo B que obteve um valor médio 104,90 (valores extremos 84 - 122) superou o grupo C da procriação natural que obteve valor médio 99,83 (valores extremos 83 - 118) e também superou o grupo A com valor médio 98,6 (valores extremos 73 - 117) mas esta diferença não é estatisticamente significativa

(nem mesmo comparando o grupo TEC com o grupo B da FIV/ICSI com transferência a fresco).

E - Realização (performance):

Tanto o grupo B com valor médio 107,50 (valores extremos 87 - 125) como o grupo C com valor médio 107,05 (valores extremos 93 - 121) equiparam-se e superam ligeiramente o Grupo A com valor médio 103,50 (valores extremos 90 - 121) mas estas diferenças não são significativas.

F – Raciocínio Prático:

O grupo B com valor médio 104,81 (valores extremos 87 -119) e o grupo C com valor médio 104,94 (valores extremos 92-117) equiparam-se e superam ligeiramente o Grupo A com valor médio 100,80 (valores extremos 74-117) mas as diferenças não são significativas.

3.2.9.4 - Análise comparativa dos resultados obtidos no SDQ-Por em função das condições embrionárias

Na avaliação de capacidades e de dificuldades usando como instrumento o SDQ-Por, os resultados pouco divergiram entre os 3 grupos denominados A, B e C. Foi conseguido o objetivo de caracterizar os participantes, relativamente aos aspectos emocionais, comportamentais, de hiperatividade e relacionamento social. As pequenas diferenças encontradas, em nenhum caso se revelaram significativas mas, como só 40 (66,6%) das 60 crianças tiveram um questionário preenchido, a subamostra considerada, teve menor potência estatística.

Verificou-se que aproximadamente 10% de todas as crianças, sendo os pais respondedores, obtiveram resultados gerais considerados não normais e idêntica percentagem teve resultados limítrofes.

Parece esboçar-se uma tendência geral para que os problemas de comportamento e relacionais predominem sobre as dificuldades emocionais ou de hiperatividade, mas as

diferenças encontradas não são estatisticamente significativas, nem entre as diversas escalas nem inter grupos.

Contrariamente às diferenças que tinham sido identificadas pelas EDMG, em que as crianças de um determinado grupo tinham maior probabilidade de se desviar da média do seu grupo, os questionários SDQ-Por não identificaram tais assimetrias, facto que pode ser atribuído ou à diferente sensibilidade dos instrumentos ou a um elevado nível de semelhança.

3.2.9.5 – Resumo dos resultados

- A população desta investigação integrou crianças submetidas a criopreservação na fase embrionária, nascidas com mais de 36 semanas de IG e sem problemas perinatais relevantes. A população do estudo pertence a um escasso universo que em Portugal não ultrapassa 80 novos casos por ano.
- O período de 3 anos e 8 meses, calculado a partir das datas de nascimento dos elementos da amostra, corresponde a um universo de aproximadamente 260 crianças elegíveis para o estudo (das 350 crianças nascidas nesse período de acordo com os cálculos enunciados).
- Foram contactados pais de crianças elegíveis e foi construída uma amostra índice e dois grupos controle demograficamente homogéneos que designámos por grupos A, B e C.
- O estudo integrou 60 crianças, 19 pertencentes ao grupo índice (A) e 41 pertencentes aos 2 grupos controle (B+C). A razão entre contactados e avaliados terá rondado 2:1 o que revela algumas das dificuldades sentidas.
- A distribuição por género foi globalmente equilibrada mas foi heterogénea por grupos, sendo que o sexo masculino predominou no grupo B e foi minoritário no grupo C.

- A idade média das raparigas do grupo C foi 42,5 meses e a dos rapazes foi 55,5 meses sendo esta a única diferença etária com significado estatístico ($p < 0,04$) encontrada nos 3 grupos.
- Na análise multifatorial entre os factores demográficos de sexo e idade e os quocientes obtidos nas EDMG, não houve diferenças com significado.
- A percentagem de gémeos é muito mais elevada nos grupos A e B relativamente ao grupo C.
- Os gémeos do grupo B obtiveram quocientes médios, nas EDMG, superiores aos dos não gémeos, e esta diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,03$). Os gémeos TEC tiveram valores nas EDMG abaixo (100) dos não gémeos (106) mas a diferença não é significativa.
- A probabilidade de uma criança do grupo TEC ter um quociente geral, nas EDMG, inferior a 2 desvios padrão da média do seu grupo, é superior à de uma criança de procriação natural e, essa diferença, é estatisticamente significativa ($p < 0,032$). Se tivéssemos incluído as duas crianças com patologia do espectro do autismo, que previsivelmente obteriam um valor abaixo dos 2 desvios padrão, a significância estatística ainda seria maior.
- A probabilidade de uma criança do grupo FIV/ICSI com transferência a fresco ter um quociente geral inferior a 2 desvios padrão da média do seu grupo, é maior do que a de uma criança de procriação natural e essa diferença, é estatisticamente significativa ($p < 0,01$)
- A probabilidade de uma criança superar a média do seu grupo, para além de 2 desvios padrão, é idêntica em todos os grupos analisados e igualmente infrequente.
- Os resultados obtidos pelas crianças do grupo TEC nunca superaram os do grupo da procriação natural. Os resultados nas sub escalas A (desenvolvimento motor) e C (linguagem) são inferiores quando comparados com os do grupo de procriação natural. Não existem diferenças significativas entre o grupo de

procriação natural e o grupo FIV/ICSI de transferência a fresco relativamente às mesmas sub-escalas.

- O grupo da procriação natural supera o grupo com transferência a fresco, em 5 das 6 sub escalas mas tal diferença não é estatisticamente significativa. Salvaguarda-se a probabilidade significativa e já referida, de elementos do grupo B se desviarem mais de 2 desvios padrão abaixo da média, do quociente geral do seu próprio grupo.
- Contrariamente às diferenças identificadas pelas EDMG, em que a probabilidade de uma criança se desviar da média era maior no grupo A, tais assimetrias não se verificam com o SDQ-Por.

3.2.10 - Discussão dos resultados

A discussão, a seguir apresentada, é dirigida aos objetivos de resposta às hipóteses colocadas nesta investigação.

Ao apresentarmos os pressupostos metodológicos, que fundamentam o nosso trabalho, realçámos que avaliar o neurodesenvolvimento de crianças cujos embriões estiveram criopreservados, ou analisar os efeitos da criopreservação embrionária sobre o neurodesenvolvimento infantil, são abordagens diferentes. Se no primeiro caso a avaliação é clínica, e o foco está no neurodesenvolvimento de um grupo alvo, no segundo caso o alvo desvia-se para a criopreservação e biotecnologia associada. Não foi nossa intenção, porque ultrapassaria o âmbito da nossa competência, aprofundar aspectos bioquímicos, biofísicos ou mesmo laboratoriais. A nossa intervenção procurou manter-se numa perspetiva clínica, neuropsicológica e bioética, ao longo de toda a investigação.

Os pais de crianças elegíveis para o estudo foram contactados pessoalmente. As dificuldades sentidas na construção da amostra, ultrapassaram o que tínhamos previsto, facto que atribuímos à escassez do universo alvo, e ao facto do grau de adesão ser moderado.

Vencidas as maiores dificuldades de obtenção de uma amostra populacional representativa do universo escolhido, que pelos cálculos apresentados, rondará 260 crianças, e de terem sido selecionados os elementos dos grupos controle, procedeu-se à colheita das histórias clínicas e aplicação dos instrumentos. O estudo integrou 60 crianças das quais 19 foram submetidas a criopreservação na fase embrionária o que considerámos uma amostra de dimensão adequada (7,3% do universo populacional).

A amostra que estudámos, pode ser considerada representativa perante a igualmente escassa população que representa. Procurámos compensar aquele aspeto com uma seleção rigorosa dos grupos controle e a escolha criteriosa da profissional que aplicou os instrumentos psicométricos.

Confrontámo-nos com um número muito elevado de gémeos, sobretudo no grupo A (TEC). Este valor não se equiparou nos grupos B e C o que poderá ter condicionado os resultados uma vez que a gemelaridade impõe diferenças de resultados. Por outro lado, somos levados a admitir que os embriões destinados a dar origem a gémeos parecem possuir características distintas, que os tornam mais resistentes às perdas gestacionais precoces.

Era nossa intenção inicial, não integrar crianças com menos de 37 semanas de IG porque a prematuridade acarreta riscos para o neurodesenvolvimento que podem ser difíceis de isolar numa análise multifatorial. A dificuldade em encontrar crianças do grupo TEC, com as características pretendidas levou-nos a baixar para 36 semanas a IG mínima para participar no estudo. Admitimos que foi seguro integrar estas crianças, para analisar os resultados que buscávamos, tanto mais que excluámos todas as que tinham tido problemas perinatais.

Quando analisámos os resultados, colocou-se a questão de se determinar para efeitos de cálculo, as idades corrigidas para as 40 semanas de IG, (nas crianças avaliadas com menos de 24 meses de idade cronológica) mas, como só foram avaliadas 2 crianças nestas condições e pertencentes a grupos diferentes, essa correção foi considerada desnecessária¹⁴⁷.

¹⁴⁷Informação condensada em <http://www.pediatrics.emory.edu/divisions/neonatology/dpc/faq.html>

Avaliámos uma criança do grupo FIV/ICSI com transferência a fresco que possui uma alteração cromossómica herdada do pai, não obstante a alteração cromossómica equilibrada do pai ser distinta da do filho, existindo suspeita de *imprinting* genético. Lembramos que na seleção dos grupos se homogeneizaram as características demográficas para que as comparações fossem legítimas, mas não se emparelharam dados anamnésticos que pudessem ser reveladores dos efeitos das técnicas de fertilização. Casual e curiosamente, até porque a raridade dos casos não permitiria a intencionalidade, o grupo C à semelhança do B também integrou uma criança com uma alteração cromossómica equilibrada, embora herdada da mãe.

Obtidos os três grupos demograficamente idênticos, de acordo com os critérios e objetivos pré-definidos, foram aplicados os instrumentos escolhidos. Foi usada a história clínica que se complementou com a metodologia de Ruth Griffiths como instrumento de avaliação do neurodesenvolvimento infantil e o testemunho parental recolhido através do SDQ – Por (hetero relato). As EDMG incluem variáveis e definições originais ¹⁴⁸.

Todas as avaliações decorreram em condições experimentais muito idênticas. O local, a profissional executante e todas as variáveis que foi possível controlar, foram mantidas constantes para todos os participantes. O objetivo de rastrear o desempenho psicomotor e a existência de desvios da normalidade foi conseguido na quase totalidade das crianças.

Embora a autora desta investigação esteja creditada para utilizar as EDMG, todas as avaliações feitas com este instrumento, foram realizadas por uma profissional alheia ao estudo e que, sendo uma psicóloga experiente, pôde manter condições de avaliação idênticas e minimizar o risco de enviesamento, determinado pelo conhecimento prévio das particularidades da história pregressa das crianças.

A exclusão por inerência metodológica, de algumas crianças que não completaram nenhuma das avaliações instrumentais, poderá ter prejudicado a avaliação de algumas variáveis devido à redução da amostra. Registaram-se dificuldades na

¹⁴⁸ Consultar também o restante texto e o glossário. As definições utilizadas ao longo deste trabalho são sempre as adoptadas pelas organizações internacionais e consignadas pelo uso.

avaliação de duas crianças com distúrbios emocionais e comportamentais classificados no DMS-5¹⁴⁹ e houve falha na aplicação da EDMG em mais duas outras. Ou seja, 3 crianças do grupo A (TEC) e uma do grupo C (fertilização natural) não completaram as EDMG; duas delas devido a características neurocomportamentais que as situam no espectro do autismo e outras duas, também não completaram todas as subescalas, por razões metodológicas. Estes resultados parcelares foram tidos em consideração no cálculo dos resultados.

As EDMG possuem qualidades psicométricas bem comprovadas ou seja, têm bons indicadores de fiabilidade e estabilidade, boa validade inter juízes e mostraram-se apropriadas à população e ao contexto que escolhemos. Tanto a sua sensibilidade como a especificidade são elevadas, o que permite uma triagem correta com poucos falsos negativos e, igualmente baixa probabilidade de falsos positivos. Uma crítica que por vezes é feita às EDMG prende-se com o facto de permitir avaliar crianças até aos 96 meses mas ter como pontuação máxima 100 meses. Na hipótese duma criança no limite da idade, possuir uma idade mental muito elevada, poderia ficar subavaliada. Trata-se de uma hipótese que não se verificou na nossa amostra.

Os resultados do SDQ-Por foram colhidos pelos pais e cotados pela autora deste estudo. Este questionário tinha sido escolhido por possuir correlações positivas com outros inventários, com propriedades psicométricas fortes e bem estabelecidas, nomeadamente o *Child Behaviour Check List* (versão para pais, educadores e de autorrelato – *Teacher's Report Form* e *Youth Self-Report*, Achenbach, 1991) (Rothenberger, A., Woerner, W., 2004 e Bedford, H., 2013). Mede cinco dimensões importantes das capacidades e do comportamento (os cinco grandes factores já

¹⁴⁹ O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – DSM) é utilizado mundialmente e fornece critérios para o diagnóstico dos transtornos mentais de acordo com a *American Psychiatric Association* (APA). A 1ª edição é de 1952. A maior revisão foi a DSM-IV de 1994. O DSM-5 (anteriormente designado DSM-V) é a versão mais recente publicada nos USA em 2013 e em Portugal em outubro de 2014. Existe uma versão original disponível on-line:

<https://docs.google.com/file/d/0BwD-YtZFWfxMbWs2UC1WdWJzZTQ/edit?pli=1>

descritos), através de 40 especificações importantes, no interior de cada dimensão. Este modelo permite uma perspetiva mais dinâmica.

A colheita, organização e análise dos dados, iniciou-se em 2012 e terminou em 2015. Foi feita uma análise retrospectiva e sequencial dos dados do grupo índice e dos grupos controle. Podemos classificar esta investigação como um estudo exploratório, em que se recorreu a estratégias quantitativas e semi quantitativas.

Segundo D'Oliveira (D'Oliveira, 2005, p. 19) “A abordagem qualitativa tenta englobar toda a diversidade que o comportamento humano pode assumir e manifestar” enquanto a abordagem quantitativa procura identificar as regularidades do comportamento humano.

3.3 - CONCLUSÕES

A parte empírica desta dissertação ficou concluída com o teste de hipóteses propriamente dito e a análise dos resultados. O objetivo principal de investigar assimetrias do neurodesenvolvimento, entre crianças naturalmente concebidas e aquelas que estiveram submetidas a criopreservação na fase embrionária, foi materializado neste estudo preliminar onde foi possível estabelecer algumas conclusões, nomeadamente:

3.3.1- Conclusões relativas às hipóteses do estudo quantitativo

Ao questionarmos se a criopreservação embrionária é suscetível de determinar alterações no neurodesenvolvimento e comportamento infantil, pretendemos compreender e avaliar se existe uma diferença do nível médio de desempenho, numa população previamente submetida a tal técnica da PMA, quando comparada com outra demograficamente idêntica mas sem esse antecedente. Como os elementos de um grupo com criopreservação também são obrigatoriamente submetidos às outras etapas da PMA, sentimos a necessidade metodológica de estabelecer dois grupos de controle em que um foi de procriação natural e outro de PMA/FIV mas sem criopreservação, para se poder isolar os eventuais efeitos desta última tecnologia.

Através da análise estatística dos resultados, verificou-se que em valores médios absolutos as diferenças existentes entre os 3 grupos não foram muito significativas. Contudo, olhando dum ponto de vista mais individual, foi notória a maior probabilidade dos elementos de um determinado grupo, se poderem situar dois desvios padrão abaixo da média do seu grupo ou de todos eles. Dito de outro modo, dentro do grupo TEC houve um número mais elevado de crianças com atraso de desenvolvimento relativamente à média tanto do seu grupo como da amostra populacional global.

O termo «atraso de desenvolvimento» é vago e a maioria dos autores define-o como «a condição em que uma criança não se está a desenvolver ou não está a adquirir competências espectáveis para a sua idade»¹⁵⁰ ou numa forma mais estatística, como «aqueles que numa população se situam abaixo de um determinado percentil», que Limbos e Joyce (Limbos, M. e Joyce, D.P. 2011) sugeriram ser o percentil 10. Outra forma mais absoluta de definir a deficiência mental pode ser através de um valor (i.e. 'scoring') correspondente a um certo nível. Nos Estados Unidos da América, com algumas diferenças entre Estados, considera-se que alguém é elegível para um cargo público quando não ultrapassa 2 desvios padrão abaixo da média em uma área de desenvolvimento ou 1,5 desvios padrão em duas ou mais áreas (Danaher J. 2012)¹⁵¹

Neste estudo não existem sequências no tempo nem há assimetrias de desempenho explicáveis pela idade dos avaliados, que oscilou entre 20 e 96 meses.

3.3.2- Conclusões relativas às hipóteses do estudo qualitativo

Na abordagem qualitativa, valorizámos os dados clínicos e a caracterização sociodemográfica dos pais, procurando estabelecer uma relação entre estas variáveis e o neurodesenvolvimento infantil.

¹⁵⁰ «the condition in which a child is not developing and/or achieving skills according to the expected time frame», in Council on Children with Disabilities, Section on Developmental Behavioral Pediatrics, and Bright Futures Steering Committee and Home Initiatives for Children with Special Needs Project Advisory Committee, *Identifying infants and young children with developmental disorders in the medical home: an algorithm for developmental surveillance and screening*. Pediatrics, 2006. 118 (1): p. 405-20.

¹⁵¹ Disponível em <http://www.nectac.org/~pdfs/pubs/nnotes27.pdf>.

Com a versão portuguesa do SDQ, traduzida e adaptada (Fleitlich, B. et al. 2005)¹⁵² foi feita uma abordagem semi-quantitativa em que se procurou aprofundar a incidência de dificuldades emocionais e comportamentais, nos distintos grupos. Este questionário de rastreio (*screening*) de problemas do comportamento e saúde mental em crianças, preencheu algumas lacunas deixadas pelas EDMG.

O SDQ-Por não replicou as assimetrias que tinham sido identificadas pelas EDMG, facto que pode ser atribuído à diferente sensibilidade dos instrumentos ou a uma maior similitude entre grupos, dos aspectos pesquisados.

Enquanto foram notadas diferentes competências psico-motoras, relacionáveis com os antecedentes embrionários, não foi encontrado equivalente estatisticamente significativo no que respeita a capacidades e dificuldades comportamentais ou envolvendo aspectos emocionais, relativos a perfis de hiperatividade ou de relacionamento e atitude pró social.

Poderíamos interpretar, especulando que as EDMG analisam competências cuja aquisição depende maioritariamente de factores congénitos, e o SDQ-Por avalia maioritariamente atributos culturalmente transmitidos. Não seria porém correto, fazer tal separação porque o desenvolvimento infantil é um todo que depende da harmonia de múltiplos factores e influências.

A **conclusão principal** é que existem significativas diferenças entre o processo de procriação natural e os próprios indivíduos assim concebidos quando comparados com outros demograficamente idênticos mas cuja procriação foi artificial e, essa diferença acentua-se de forma desfavorável se tiver havido criopreservação embrionária.

Perante tantas perdas entre o início dos procedimentos da PMA/FIV e os processos de criopreservação podemos questionar qual ou quais etapas parecem condicionar os resultados, mas é difícil individualizar o contributo de cada uma delas. Não identificámos aumento de risco para um aspecto isolado, mas poderá existir um efeito somatório de vários factores.

¹⁵² Disponível em www.sdqinfo.org.

Encontrar semelhanças de resultados entre gémeos e não gémeos, poderia surpreender, porque a gemelaridade é um fator de risco conhecido. Acontece que a gemelaridade na nossa amostra, apesar de elevada, não se associou a piores resultados e este fenómeno já tinha sido observado por outros autores (Belva et al. – 2008), (Cortessis K.V., Duncan C., et al. – 2012), (Pinborg, A. et al. – 2013). É importante recordar que, neste estudo, foram excluídas as crianças com problemas perinatais o que selecionou, talvez excessivamente, a sub amostra analisada. Podemos concluir que, se não existirem diferenças demográficas ou problemas perinatais entre gémeos e não gémeos e, se as abordagens terapêuticas forem as mesmas, os resultados poderão aproximar-se. Dito de outra maneira, as circunstâncias da gemelaridade expõem os fetos duma gravidez múltipla a maiores e compreensíveis riscos porém, tais indivíduos não são intrinsecamente diferentes nem respondem de forma diversa, pelo simples facto de serem gémeos. Parece até adivinhar-se um factor de proteção desconhecido, quer para a sobrevivência precoce dos gémeos da PMA, quer para a sua evolução posterior.

3.4 – REFLEXÃO FINAL

É com apreensão científica e bioética que assistimos a um aumento generalizado do recurso à PMA/FIV, que em Portugal atinge atualmente 2,1% de todos os nascimentos¹⁵³. Nas últimas décadas assistiu-se a uma prodigiosa evolução de toda a tecnologia associada à Medicina da Reprodução mas receamos que os recursos desenvolvidos, para dar resposta ao problema da infertilidade, que é um drama suficientemente intenso para envolver os serviços de saúde e motivar a própria sociedade, sejam postos ao dispôr dum inadequado encarniçamento procriativo. Não é tanto a alocação de recursos médicos ou outros, que nos suscita preocupação, mas sim o número de vidas humanas levemente interrompidas ou a quase ausência de limites às capacidades tecnológicas nesta área sensível.

A evolução dos conhecimentos, e a tomada de consciência dos riscos biológicos, tem coexistido de forma paradoxal com modelos de procriação a qualquer custo, que viabilizam realidades contrárias aos mais elementares direitos dos novos seres. Aquilo

¹⁵³ http://www.cnpma.org.pt/Docs/RELATORIO_ACTIVIDADE_PMA2011.pdf

que pretendia ser uma resposta ao problema dos casais inférteis transformou-se numa alternativa muitas vezes atentatória da dignidade humana. Mesmo isolando a vertente ética e moral, tantas vezes posta em causa quando deliberadamente se privilegiam os direitos reprodutivos sobre o mais elementar dos direitos, que é o direito à vida, há que refletir sobre os riscos pragmáticos duma procriação a todo o custo.

Neste trabalho foram investigadas as alterações do neurodesenvolvimento infantil, que se podem relacionar (positivamente ou negativamente) com as tecnologias da PMA, visando a identificação dos riscos biológicos e contribuir para a sua melhor prevenção.

Nesta dissertação fizemos uma escolha criteriosa dos grupos controle, tentando diminuir o enviesamento estatístico. Foi feito um estudo controlado, em que as crianças avaliadas foram comparadas com outras provenientes dum estrato sobreponível, quer do ponto de vista etário quer económico e sócio educativo.

A rigorosa seleção das 60 crianças forneceu uma amostra credível, além de epidemiologicamente representativa, mesmo face à escassez de elementos elegíveis no universo estudado. Perante os resultados, e concluída a análise, não ficámos mais tranquilos sobre os riscos imediatos ou a longo prazo, que este somatório de intervenções médicas pode determinar sobre um ser humano em desenvolvimento.

Sendo verdade que este estudo não nos deu evidências de segurança, e nos fez manter a convicção que podem existir riscos imediatos ou tardios, ainda desconhecidos, por outro lado revelou crianças com excelente desenvolvimento físico e neurocognitivo, apesar das condições biológicas extremas a que estiveram submetidas.

Tendo circunscrito a amostra aos casos que chegaram a termo, e tendo excluído do estudo as crianças que tiveram problemas perinatais, é possível que tenhamos selecionado aquilo a que poderíamos chamar «os melhores casos» porém, só olhando retrospectivamente nos apercebemos dessa circunstância. Se havia a intenção de analisar riscos, fomos perdendo os sinais desses mesmos riscos, excluindo todos os que tiveram problemas de percurso. Acontece que enveredar por outro modelo comparativo, em que nunca conseguiríamos contabilizar quantas vidas se deterioraram ou perderam ao longo do seu percurso vital, fosse ele natural ou artificialmente iniciado, tornaria os cálculos impossíveis.

No universo desconhecido dos embriões artificialmente criados, apenas uma minoria irá ter o privilégio de chegar a ser transferida para o útero materno. De cada 100 desses embriões transferidos, só 15 ou 16 chegarão a nascer e destes, 4 irão ser prematuros ou terão problemas perinatais. Dos 11 restantes, ainda haverá 1 ou 2 que irão ter problemas detectáveis ao nível do neurodesenvolvimento, se os dados do nosso estudo estiverem próximo da realidade. Mas, por outro lado, será que podemos afirmar que estas 15 ou 16 crianças não justificaram o investimento? Do ponto de vista mais pragmático, quase nos permitiríamos afirmar que uma única criança poderia ser justificação suficiente mas, sob um ponto de vista bioético menos consequencialista os danos colaterais parecem-nos excessivos e levam-nos a questionar os procedimentos. Ou seja, estamos perante um recurso médico que é capaz de viabilizar vidas humanas e aliviar o sofrimento de muitos pais em situações de inultrapassável infertilidade mas, por outro lado, como poderemos justificar uma tecnologia em que por cada criança que nasce conduz a um número elevado de vidas perdidas?

Ao custo biológico dum processo de procriação com tão baixa rentabilidade, somam-se as preocupações levantadas por numerosos estudos. Esta investigação também comprovou a supremacia dos resultados das crianças de fertilização natural, o que tem sido referido pela generalidade dos autores (Pinborg, A. et al. – 2013). Ter ou não ter havido criopreservação na fase embrionária, pode ser determinante de alguns aspectos do desenvolvimento humano, mas os processos neurocognitivos serão apenas um alvo entre vários possíveis. São muitos os factores que afetam o desenvolvimento humano e este carácter multifatorial é difícil de analisar parcelarmente. A quantidade de etapas terapêuticas iniciais bem como as alterações epigenéticas que determinam ou que ocorrem ao longo de tantos meses, não nos permitem quantificar de que forma esses factores isolados podem ter concorrido para o resultado final. São tantos os aspectos que isoladamente interferem nos resultados, que não é possível separar e quantificar possíveis efeitos neuro protetores ou neuro agressores de um único procedimento.

A criopreservação poderá também conduzir a uma forma de seleção e relacionar-se com resultados a mais curto prazo, que não estão no âmbito deste estudo. É concetualizável que a criopreservação embrionária possa determinar uma seleção artificial, à qual só sobrevivam embriões com determinadas características intrínsecas. Esta capacidade para sobreviver em condições artificialmente impostas, somar-se-ia a

todas as outras alterações já ocorridas no processo de fertilização e permitiria que embriões com elevada resiliência biológica não exprimissem desvantagens comparativamente aos embriões gerados pela “protetora” fertilização natural. Ou seja, podemos teorizar uma situação comparável à dos indivíduos vacinados, quando são expostos a determinada infeção e se comportam como não vulneráveis, ou como se não tivessem sido expostos. Acontece que tal resistência ao *stress* ambiental parece-nos improvável entre os embriões e, mesmo os muito resistentes que conseguem sobreviver, revelam-se vulneráveis, exprimem uma mortalidade muito elevada e, na rara circunstância de sobreviverem, exibem as inevitáveis cicatrizes.

Seriam de esperar mais complicações nos descendentes da PMA/FIV mas acreditamos que o elevado investimento pessoal dos progenitores incentive a procura de cuidados médicos, reduza riscos evitáveis e selecione casos, causando enviesamento estatístico. As crianças, por nós avaliadas, correspondem a uma pequena percentagem de sobreviventes e o enorme investimento nestas gestações pode ter sido facilitador de melhores resultados. Também é importante equacionar que a elevada incidência de prematuridade, comum nos grupos da PMA, ficou incógnita neste estudo por ter sido ativamente excluída da análise. Por outras palavras, esta ou qualquer outra investigação que integre crianças geradas com o contributo da PMA limita-se a analisar os escassos sobreviventes e representa sempre o que de melhor acontece na Medicina da Reprodução.

3.5 – SÍNTESE CONCLUSIVA E IMPACTO DO ESTUDO

Ao analisarmos os efeitos mensuráveis da criopreservação embrionária sobre o neurodesenvolvimento infantil, pretendemos aprofundar o conhecimento nesta área e alertar para a possibilidade de riscos tardios, ainda desconhecidos, poderem vir a afectar os seres humanos artificialmente concebidos. Estaremos atentos aos progressos da ciência nesta área e à divulgação de outros resultados semelhantes e que também visem identificar fragilidades e riscos relacionáveis com as técnicas. Defenderemos o direito à informação dos casais que recorrem à PMA pois sentimos que ainda há muito por fazer a este nível.

Em síntese, este estudo cumpriu os objetivos de:

Comparar o neurodesenvolvimento dum grupo de crianças cujos embriões estiveram criopreservados, com o de outras concebidas naturalmente ou em que houve FIV/ICSI com transferência embrionária a fresco.

- Analisar as implicações bioéticas dos resultados encontrados nas avaliações referidas. Distinguimos duas situações opostas que são a salvaguarda do direito à vida dos embriões criopreservados e supranumerários que ainda podem vir a dar origem a crianças saudáveis, e a exigível regulamentação da tecnologia que os viabiliza e da lei que os condena.
- Contribuir para o conhecimento na área da investigação.
- Identificar e analisar factores de risco ou proteção bem como os seus mecanismos subjacentes, promovendo atitudes efetivas na prevenção de danos evitáveis para o embrião humano em desenvolvimento.
- Não foram identificados riscos associados à aplicação dos instrumentos psicométricos, mas as exigências da sua realização podem ter gerado algum desconforto aos pais, posteriormente compensado pela revelação de importantes aspectos do desenvolvimento dos seus filhos.
- Este estudo também terá tido a vantagem adicional, e gratificante, de ter identificado alguns problemas anteriormente ignorados, em crianças concretas. Evocamos a este propósito, as palavras das autoras da já citada revisão britânica (Helen Bedford et al., 2013) quando afirmam:

« It would also be unethical to assess a child, identify a potential problem requiring further investigation or intervention and yet not act on that information. An ideal measure would therefore be one that serves two functions:

i) It can be used to assess the child's development which is fed back to parents and which provides a basis for appropriate health promotion and, if necessary, to offer additional support or refer a child for follow up and support

ii) It can be used to inform a population outcome measure. ...»

- Como objetivo maior, procurámos dar o nosso contributo para uma reflexão crítica, sobre a necessidade dum estatuto que promova a integridade e o direito à vida do embrião criopreservado.

3.6 - LIMITAÇÕES E DIFICULDADES

A PMA tem custos biológicos elevados, devido aos reduzidos índices de sucesso e ao risco de se perpetuarem alterações genéticas causadoras de infertilidade, que desfavorecem as crianças assim concebidas. Porém, tais aspectos menos favoráveis são minimizados pela forte seleção artificial que é imposta aqueles que conseguem sobreviver. Existe também uma elevada motivação parental e uma vigilância médica que funcionam como factores protetores e promotores de melhores resultados.

Fazer um estudo comparativo do neurodesenvolvimento de crianças oriundas de amostras populacionais com antecedentes biopsicosociais tão diferentes, pode criar dificuldades metodológicas e, impõe uma redobrada atenção a qualquer viés adicional, para se poderem retirar conclusões válidas. Recorremos por isso a amostras populacionais demograficamente sobreponíveis. Cruzámos dados e fizémos comparações entre o neurodesenvolvimento de indivíduos tão semelhantes quanto possível, já que os casos controle foram mais fáceis de seleccionar.

Após a seleção da população a estudar, fizeram-se alguns ajustes visando a homogeneização das amostras.

Ter podido dispor de uma estreita mas representativa base de dados, fruto da partilha e generosidade esclarecida, facilitou e ajudou a ultrapassar algumas dificuldades. Se contratempos existiram na conclusão deste estudo, derivam maioritariamente das limitações da sua autora. Se o elevado número de variáveis a investigar, informatizar e analisar, em referência a cada um dos aspectos estudados, criou limitações temporais e de exequibilidade prática, por outro lado proporcionou dados credíveis. A participação duma psicóloga experiente potenciou a homogeneidade da análise e o contributo de atentos Mestres elevou a sua qualidade.

3.7 - MISSÃO FUTURA

Gostaríamos de prosseguir uma análise futura das hipóteses deste estudo, e contribuir para os diversos aspectos que permanecem em aberto e onde realçamos os seguintes:

- Impacto a longo prazo das tecnologias da reprodução já que as mesmas são muito recentes e os «filhos da PMA» começaram agora, eles próprios, a ser pais.
- Promoção de medidas que respeitem a Bioética e conduzam a um patamar de bem-estar, em que cada vida concebida tenha, à partida, uma oportunidade de prosseguir o seu trajeto vital.
- Esclarecimento verdadeiramente informado e informativo de todos aqueles que recorrem à PMA mas permanecem pouco conhecedores das suas principais dificuldades e implicações.
- Defesa de soluções que evitem a produção supranumerária de embriões e defendam a dignidade e os direitos dos já existentes.
- Defesa do direito a um estatuto ético e jurídico para o embrião humano chamando a atenção para a sua necessidade, à semelhança de outros autores, que nos inspiraram e motivaram para a realização deste trabalho.
- Divulgação do contributo e promoção da mensagem de um dos principais defensores internacionais do embrião humano, o ilustríssimo Senhor Professor Daniel Serrão a quem dirijo a última frase deste trabalho que só pode ser, naturalmente,

BEM-HAJA QUERIDO MESTRE, PELO SEU EXEMPLO E POR TUDO O QUE NOS DEU.

MUITO OBRIGADA!

Célia Francisca Iglésias Batista Neves

Outubro de 2015.

BIBLIOGRAFIA

1. Alcorão 18:46. In <http://www.ibeipr.com.br/ibei.php?path=alcorao>
2. American Academy of Pediatrics. Policy Statement .Human Embryonic Stem Cell (HESC) and Human Embryo Research. Committee for Pediatric Research and Committee on Bioethics . Pediatrics vol. 130 no. 5 November 1, 2012 pp. 972- 977
3. Amor, D.J., Halliday, J. A review of known imprinting syndromes and their association with assisted reproduction technologies. Hum Reprod 2008 Vol 5 (2826-2834)
4. Andrade Carvalho, A., Rocha Faustino, L., Vieira Castro, S., Figueiredo, J.R. & Ribeiro Rodrigues, A.P. Caracterização dos danos celulares em gametas femininos e embriões após criopreservação. Acta Scientiae Veterinariae, 2012. 40(3): 1046. Review article.
5. Andrezza, G.L. A personalidade jurídica dos embriões excedentários e a dignidade da pessoa humana. 2012. Em <http://jus.com.br/revista/texto/22778/a-personalidade-juridica-dos-embrioes-excedentarios-e-a-dignidade-da-pessoa-humana#ixzz2WVbfLVJD>
6. Archer, L. Bioética: Avassaladora, porquê? *Brotéria*, 4, 1996. Vol. 142, pp. 449-472.
7. Archer, L. (1996). Bioética geral. Fundamentos biológicos. In Luís Archer, Jorge Biscaia e Walter Osswald (Eds.), *Bioética* (pp. 17-33). Lisboa: Editorial Verbo.
8. Archer, L. Ainda os direitos do homem. O consentimento informado. *Brotéria*, 2, 1999. Vol. 148, pp. 155-164.
9. Archer, L. et al, Novos Desafios à Bioética, Porto Editora, Porto, 2001, pp.24 e segs.
10. Archer, L. *Da Genética à Bioética*. Coimbra: Gráfica de Coimbra, Lda. 2006
11. Azevedo, L.F., Costa Pereira, A. Pediatria baseada na evidência – Formulação de questões e pesquisa bibliográfica. Nascer e Crescer Revista do Hospital de Crianças Maria Pia. 2007, 16:135-140.
12. Azevedo, L.F., Costa Pereira, A. Avaliação Crítica e Implementação Prática da Evidência. Nascer e Crescer Revista do Hospital de Crianças Maria Pia. 2008, vol. XVII, pp 30-36)
13. Aznar, J., Gómez, I. Posible utilidad clínica de las células progenitoras embrionarias / Possible clinical usefulness of embryonic stem cells Rev. Clín. Esp. sep. 2012 (Ed. impr.); 212(8):403-406,.
14. Barbosa, A.; Ribeiro da Silva, J.; Vale, E. F. - Contributos para a Bioética em Portugal. Lisboa: Edições Cosmos/Centro de Bioética. 2002
15. Barnard, L., Knoesen, M.P., Kotras, N., Burns, Faragher & Challis. Extended Revised Scales in A practitioner’s guide to the Assessment of Mental Development in Infants and Young Children. P. Preston 2006: Publishers: Hogrefe.
16. Barnard, L., Knoesen, M.P., Kotras, N., Burns, Horrocks, S., McAlinden, P., Challis, D., & D.O’Conneel, R. (2007). Escala de Desenvolvimento Mental de Griffiths — Actas do 12º Colóquio de Psicologia e Educação 932, Extensão Revista (Revisão de 2006) dos 2 aos 8 anos. Manual de administração. Lisboa: Cegoc-Tea.
17. Bankowski, B.J., Lysterly, A.D., Faden, R.R., Wallach, E.E. The social implications of embryo cryopreservation. Fertil Steril. 2005 Oct; 84(4):823-32.

18. Barker, D.J.P. Intrauterine programming of coronary heart disease and stroke. *Acta Pediátrica Suppl* 1997; 423: 178-82
19. Barker. D.J.P. Mothers, babies and health in later life. 2nd edn. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1998. pp 46.
20. Barker, D.J. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med* 2007;261:412-417.
21. Barreto, Vicente de Paulo. Bioética, Biodireito e Direitos Humanos. Em http://dhnet.org.br/direitos/direitosglobais/paradigmas_textos/v_barreto.html.
22. Basatemur, E., Sutcliffe, A. Follow-up of children born after ART. *Placenta*. 2008 Oct;29 Suppl B:135-40.
23. Basille, C., Frydman. R., El Aly, A., Hesters, L., Fanchin, R., Tachdjian, G., Steffann, J., LeLorc'h, M., Achour-Frydman, N. Preimplantation genetic diagnosis: state of the art. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2009 Jul; 145(1):9-13.
24. Basso, O., Olsen, J. Subfecundity and neonatal mortality: longitudinal study within the Danish national birth cohort. *Br Med J* 2005;330:393-394.
25. Batel-Marques, F., Mendes, D., Alves, C., Penedones, A., Dias, P., Martins, A., Santiago, L.M., Fontes-Ribeiro, C., Caramona, M., Macedo, T., Pharmacovigilance in Portugal: Activity of the Central Pharmacovigilance Unit. *Acta Médica portuguesa*, vol.28, nº2, 2015.
26. Bateson, P., Barker, D., Clutton-Brock, T., et al. Developmental plasticity and human health. *Nature* 2004;430:419–21.
27. Beauchamp, T., Childress, J. Principles of biomedical ethics. 3rd.ed. New York: Oxford University Press, 1989.
28. Becker, A., Woerner, W., Hasselhorn, M., Banaschewski, T., Rothenberger, A. Validation of the parent and teacher SDQ in a clinical sample. *European Child and Adolescent Psychiatry*, 2004, 13 Suppl 2, II 11-6.
29. Bedford, H., Walton, S., Ahn, J., Measures of Child Development: A review. Centre for Paediatric Epidemiology and Biostatistics. UCL Institute of Child Health, June 2013
30. Belva, F., et AL. Neonatal outcome of 937 children born after transfer of cryopreserved embryos obtained by ICSI and IVF and comparison with outcome data of fresh ICSI and IVF cycles *Human Reproduction*, 2008, volume 23, No. 10 pp. 2227-2238.
31. Ben-Yosef, D., Amit, A., Azem, F. et al. Prospective randomized comparison of two embryo culture systems: P1 medium by Irvine Scientific and the Cook IVF Medium. *J Assist Reprod Genet*. 2004;21(8):291–5.
32. Bioethics Dictionary, pp160. Eubios Ethics Institute. UNESCO/IUBS/EUBIOS <http://www2.unescobkk.org/eubios/index.htm>
33. Boomsma, C.M., Keay, S.D., Macklon, N.S. Peri-implantation glucocorticoid administration for assisted reproductive technology cycles [Full Review]. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2007, Issue 1. Art. No.: CD005996. DOI: 10.1002/14651858.CD005996.pub2.

34. Borges, P., Pessoa, I., Costa Veríssimo, M., Themudo Ferreira, C., Carvalhão, I., Gil, I., Fernandes, S.. Escalas de desenvolvimento mental de Ruth Griffiths – adaptação para a população portuguesa. ACTAS do 12º Colóquio de Psicologia e Educação - Olhares contemporâneos através da investigação e da prática. ISPA. Junho de 2012. 1.ª edição: pag. 922-932.
35. Bradford-Hill, Austin. "The Environment and Disease: Association or Causation?". 'Proceedings of the Royal Society of Medicine', 1965, 58: 295–300.
36. Bredenoord, A., Dondorp, W., Pennings, G., de Die-Smulders, C., Smeets, B., de Wert, G. Preimplantation genetic diagnosis for mitochondrial DNA disorders: ethical guidance for clinical practice. *Eur J Hum Genet.* 2009 May 27.
37. Bredkjaer, H.E., Grudzinskas, J.G. Cryobiology in human assisted reproductive technology. Would Hippocrates approve? *Early pregnancy* 2001 jul;5(3):211-13
38. Brown, J.A., Buckingham, K., Abou-Setta, A., et al. Ultrasound versus ‘clinical touch’ for catheter guidance during embryo transfer in women [Cochrane Full Review]. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2007, Issue 1. Art. No.: CD006107.
39. Calkins, K., Devaskar SU.. Fetal origins of adult disease. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2011; 41:158-176.
40. Campbell, A., Fishel, S., Bowman, N., Duffy, S., Sedler, M., Thornton, S.. Retrospective analysis of outcomes after IVF using an aneuploidy risk model derived from time-lapse imaging without PGS. *Reprod Biomed online* 2013 May 9. pii: S1472-6483(13)00238-1.
41. Canoy, D., Pouta, A., Ruokonen, A., et al. Weight at birth and infancy in relation to adult leukocyte count: a population-based study of 5619 men and women followed from the fetal period to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 1916–22.
42. Carson, C. Kelly, Y, Kurinczuk, J.J., Sacker, A. Redshaw, M. Quigley, M.A. Effect of pregnancy planning and fertility treatment on cognitive outcomes in children at ages 3 and 5: longitudinal cohort study. *BMJ*, 2011 Jul 26; 343.
43. Ceelen, M., Van Weissenbruch M.M., Prein, J., Smith, J.J., Vermeiden, J.P., Spreeuwenberg, M., Van Leeuwen, F.E., Delemarre-van de Waal, H.A. Growth during infancy and early childhood in relation to blood pressure and body fat measures at age 8-18 years of IVF children and spontaneously conceived controls born to subfertile parents. *Hum Reprod.* 2009.
44. CNECV, Relatório-Parecer sobre a Experimentação no Embrião nº 15/CNECV/95 e nº 20/CNECV/1997.
45. CNECV/07 Parecer do Conselho Nacional de Ética para as Ciências da vida sobre os Projectos de Lei nº 126/X (que estabelece os princípios para a investigação em células estaminais e a utilização de embriões)
46. CNECV «A célula património da vida», ciência e ética – da célula ao embrião, pag 16-17, Lisboa 2001
47. CNECV, Da célula ao embrião, 2004, pag 19.
48. CNPMA, 11ª Acta de 9 de Maio de 2008. Disponível em http://www.cnpma.org.pt/Docs/RELATORIO_ACTIVIDADE_PMA2011.pdf

49. Convention for the Protection of Human Rights and Dignity of the Human Being with regard to the Application of Biology and Medicine: Convention on Human Rights and Biomedicine. 1997. Oviedo, 4.IV. Article 2.
50. Córdoba JE, Torres JCS. Fecundación humana asistida: aspectos jurídicos emergentes. Córdoba: Alveroni; 2000. p. 23.
51. Cortessis, V.K., Duncan, C., Thomas, A., Levine, J., Breton, C.V., Mack T.M., Siegmund, K.D., Haile, R.W., Laird, P.W. Environmental epigenetics: prospects for studying epigenetic mediation of exposure–response relationships. *Hum Genet.* Oct 2012; 131(10): 1565–1589).
52. Cortina, Adelia. “10 palavras chave em Ética”. Gráfica de Coimbra. Pag 16
53. Council on Children with Disabilities, Section on Developmental Behavioral Pediatrics, and Bright Futures Steering Committee and Home Initiatives for Children with Special Needs Project Advisory Committee, Identifying infants and young children with developmental disorders in the medical home: an algorithm for developmental surveillance and screening. *Pediatrics*, 2006. 118(1): p. 405-20.
54. Coutinho, António. In «a célula património da vida», CNECV, Ciência e ética – da célula ao embrião, pag 16-17, Lisboa 2001.
55. Cruz, Antonio, Bioética Cristiana, Una propuesta para el tercer milenio, Introducción al Derecho de Familia, Pág. 287
56. Cunningham FG, MacDonald PC, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap LCI, eds. Sex of the fetus. In: *Williams Obstetrics.*, 20th ed. Stamford, CT: Appleton and Lange, 1997; 180.
57. Curley, J.P., Jensen C.L., Mashoodh R., Champagne, F.A. Social influences on neurobiology and behavior: epigenetic effects during development. *Psychoneuroendocrinology*. 11 Apr; 36 (3):352-71.
58. Danaher J. Eligibility policies and practices for young children under Part B of IDEA. 2011 disponível em: <http://www.nectac.org/~pdfs/pubs/nnotes27.pdf>.
59. Daya, S., Gunby, J. Luteal phase support in assisted reproduction cycles [Full Review]. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2004, Issue 3. Art. No.: CD004830.
60. Daxinger, L., Emma Whitelaw, E. Understanding transgenerational epigenetic inheritance via the gametes in mammals. *Nature Reviews Genetics* 13, March 2012, 153-162
61. Declaração sobre o uso do progresso científico e tecnológico no interesse da Paz e em benefício da Humanidade Proclamada pela Assembleia Geral das Nações Unidas em 10 de Novembro de 1975 - Resolução n.º 3384 (XXX).
62. Diário da República, 1.ª série, Lei n.º 32/2006 - Procriação medicamente assistida. N.º 143 Artigo 9.º - Investigação com recurso a embriões e Artigo 25.º Destino dos embriões. 26 de Julho de 2006. Pág. 5245 a 5250.
63. Declercq, E., Luke, B., Belanoff, C., Cabral, H., Diop, H., Gopal, D., Hoang, Lan, Kotelchuck, M., Stern, J. E., Hornstein, M.D. Perinatal outcomes associated with assisted reproductive technology: the Massachusetts Outcomes Study of Assisted Reproductive Technologies (MOSART) Presented at the 69th annual meeting of the

- American Society for Reproductive Medicine, Boston, Massachusetts, October 2013. Pag. 12–17.
- 64 . De Rooij, S.R., Roseboom, T.J., The developmental origins of ageing: study protocol for the Dutch famine birth cohort study on ageing. *BMJ open* 2013; 3:e 003167.doi:10-1136/bmjopen-2013-003167).
- 65 . Desai, M., Gayle, D.A., Casillas, E., et al. Early undernutrition attenuates the inflammatory response in adult rat offspring. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2009; 22: 571–5
- 66 . Diedrich, G. F. Genoma humano: direito internacional e legislação brasileira. In: Santos, M. C. C. L. (Org.). *Biodireito: ciência da vida os novos desafios*. 2001. São Paulo: Editora Revista dos Tribunais.
- 67 . Diniz, A., Ferreira, C., Corrais, C., Boavida, M., Ulrich, M., Tabora, J., Nunes, M. Validade de Constructo da Escala de Desenvolvimento Mental de Ruth Griffiths: Estudo com Crianças Portuguesas de 3, 5 e 7 Anos de Idade. *Association for Research in Infant and Child Development*. 2002. Em <http://www.ulusofona.pt/directorio-de-docentes/joao-luis-santos-tourais-taborda.html>
- 68 . Dorner, G., Staudt, J. Perinatal structural sex differentiation of the hypothalamus in rats. *Neuroendocrinology* 1969; 5: 103–106
- 69 . Dulac, C. Brain function and chromatin plasticity. *Nature* 2010 Jun 10;465(7299):728-35. doi: 10.1038/nature09231.
- 70 . Dumoulin, J.C., Land, J.A., Van Montfoort, A.P., Nelissen, E.C, Coonen, E., Derhaag, J.G., Schreurs, I.L., Dunselman, G.A, Kester, A.D., Geraedts, J.P., et al. Effect of in vitro culture of human embryos on birthweight of newborns. *Hum Reprod* 2010; 25:605-612.
- 71 . Duncan C., Thomas A., Levine J., Breton, C.V., Mack T.M., Siegmund, K.D., Haile, R.W., Laird, P.W., Environmental epigenetics: prospects for studying epigenetic mediation of exposure–response relationships. *Hum Genet*. Oct 2012; 131(10): 1565–1589
- 72 . Edwards, R.G., Steptoe, P.C. Current status of in-vitro fertilisation and implantation of human embryos. *Lancet*. 1983 Dec 3; 2(8362):1265-9.
- 73 . Edwards, R.G. Human implantation: the last barrier in assisted reproduction technologies? *Reproductive Biomedicine Online*. 2006;13(6):887–904.
- 74 . El-Chaar D, Yang Q, Gao J, Bottomley J, Leader A, Wu Wen S, Walker M. Risk of birth defects increased in pregnancies conceived by assisted human reproduction. *Fertil Steril*. 2008 Oct 28.
- 75 . *Encyclopedia of Philosophy*. Disponível em <http://www.iep.utm.edu/goldrule/>
- 76 . Engelhardt H.T *The Foundations of Bioethics*, 1986, New York, Oxford University Press, pag. 216 e segs.
- 77 . Estatísticas demográficas 2012. INE. Edição 2013. pag 39. Disponível em <http://www.pordata.pt/Portugal/Quadro+Resumo/Portugal-5812>

- 78 . Feil, R., Fraga, F. M., Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nature Reviews Genetics*. February 2012, vol. 13, 97-109. | doi:10.1038/nrg3142
- 79 . Fernandes, A.T. *Para uma sociologia da cultura*. 1999. Porto: Campo das Letras Editores S.A.
- 80 . Fernandes, T. B. A reprodução assistida em face da bioética e do biodireito: aspectos do direito de família e do direito das sucessões. Florianópolis: Diploma Legal, 2000. p. 50.
- 81 . Ferreira, F. "Vivendo sem respirar, morrendo sem chance de nascer", Universidade de Coimbra, 2002.
- 82 . Fertility – Assessment and treatment for people with fertility problems, National Institute for Clinical Excellence (NHS), 2004 – www.nice.org.uk
- 83 . Finnstrom, O., Kallen, B., Lindam, A., Nilsson, E., Nygren, K.G., Olausson, P.O. Maternal and child outcome after in vitro fertilization-a review of 25 years of population-based data from Sweden. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2011;90:494-500.
- 84 . Fleitlich, B., Loureiro, M., Fonseca, A., & Gaspar, F. (2005). Questionário de capacidades e dificuldades (SDQ-Por) [Strengths and Difficulties Questionnaire, Portuguese Version]. Em www.sdqinfo.org
- 85 . Fonseca, A.C., Simões, A., Rebelo, J.A., Ferreira, J.A.G., & Cardoso, F. Um inventário de competências sociais e de problemas do comportamento em crianças e adolescentes: O Child Behavior Checklist de Achenbach (CBCL). *Psychologica*, 1994, 12, 55-78.
- 86 . França, G. V. *Direito médico*. 9 ed. São Paulo: Ed Forense; 2007.
- 87 . Martinho da Silva, P. *Convenção dos Direitos do Homem e da Biomedicina* (anotada). Edições Cosmos, Lisboa 1997.
- 88 . Friedler, S., Schachter, M., Strassburger, D. et al. A randomized clinical trial comparing recombinant hyaluronan/recombinant albumin versus human tubal fluid for cleavage stage embryo transfer in patients with multiple IVF-embryo transfer failure. *Hum Reprod*. 2007;22(9):2444–8.
- 89 . Fujimoto, A., Osuga, Y., Fujiwara, T. et al. Human chorionic gonadotropin combined with progesterone for luteal support improves pregnancy rate in patients with low late-midluteal estradiol levels in IVF cycles. *J Assist Reprod Genet*. 2002; 19(12):550– 4.
- 90 . Gabriel Wolf Oselka e Reinaldo Ayer de Oliveira (coordenação). *Doente Terminal. Destino de Pré-Embriões. Clonagem. Meio Ambiente*. (Série Cadernos de Bioética). São Paulo: Conselho Regional de Medicina do Estado de São Paulo. Centro de Bioética, 2005, Volume I. pag. 154
- 91 . Galante, F. *A adoção: A Identidade Pessoal e Genética*. Biomedicina Anotada, 1997, Lisboa: Edições Cosmo. Disponível em <http://ratiolegis.ual.pt/images/pdfs/WorkingPaper/WP%202%20-%202013.pdf>
- 92 . Gardner, D.K., Lane, M. *Embryo culture in Textbook of Assisted Reproductive Techniques, Laboratory and Clinical Perspectives*, Martin Dunitz Ldd, 2012, 4th edition vol 1: pag 204-205.

- 93 . Gardner, D.K., Weissman, A., Howles, C.M., Shoham, Z. Textbook of Assisted Reproductive Techniques. June 27, 2012. Fourth Edition: Volume 1: Laboratory Perspectives por CRC Press
- 94 . Germán Zurriarain, R. La dignidad del embrión humano congelado Rev. Med. Univ. Navarra;51(1):30-32, ene.-mar. 2007.
- 95 . Glujovsky, D. Ratio male/female in newborns from assisted reproduction. 14/5/2014 technologies. Disponível em <http://www.fertilityargentina.com/blog/ratio-malefemale-in-newborns-from-assisted-reproduction-technologies/>
- 96 . Glujovsky, D., Blake, D., Bardach, A., Farquhar, C. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception Menstrual Disorders and Subfertility Group Cochrane review, publicado online: junho 5, 2013 em http://www.cochrane.org/CD002118/MENSTR_cleavage-stage-versus-blastocyst-stage-embryo-transfer-in-assisted-conception
- 97 . Gnoth, C., Godehardt, D., Godehardt, E. et al. Time to pregnancy: results of the German prospective study and impact on the management of infertility. Hum Reprod. 2003;18 (9):1959–66.
- 98 . Gnoth, C., Godehardt, E., Frank-Herrmann P. et al. Definition and prevalence of subfertility and infertility. Hum Reprod. 2005;20 (5):1144–7.
- 99 . Grace, K.S., Sinclair, K.D. Assisted reproductive technology, epigenetics, and long-term health: a developmental time bomb still ticking. Semin Reprod Med 2009; 27:409-416.
100. Gray, R.H., Wu, L.Y. Subfertility and risk of spontaneous abortion. Am J Public Health.2000;90(9):1452–4.
101. Griffith, L.G., Grodzinsky, A.J. Advances in Biomedical Engineering. JAMA. 2001;285:556-561
102. Hadlock, F. P.; Harrist, R. B. & Martinez-Poyer, J.,. In utero analysis of fetal growth: A sonographic weight standard. Radiology, 1991, 181:129-133.
103. Haider, B.A., Bhutta, Z.A., Multiple-micronutrient supplementation for women during pregnancy Cochrane Database Syst Ver. 2012 Nov 14; 11: CD004905.
104. Halliday, J.L., Ukoumunne, O.C., Baker, H.W., Breheny, S., Jaques, A.M., Garrett, C., Healy, D., Amor, D. Increased risk of blastogenesis birth defects, arising in the first 4 weeks of pregnancy, after assisted reproductive technologies. Hum Reprod 2010;25:59–65.
105. Hansen, M., Bower, C., Milne, E., de Klerk, N., Kurinczuk, J.J. Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects—a systematic review. Hum Reprod 2005;20: 328–338.
106. Hansen, M., Kurinczuk, J.J., Milne, E., Nicholas De Klerk, N., & Carol Bower, C. Assisted reproductive technology and birth defects: a systematic review and meta-analysis. Human Reproduction Up-date. 2013, Vol.19,No. 4pp.330-354.
107. Harper, K., Proctor, M., Hughes, E. Growth hormone for in vitro fertilization [Full Review]. Cochrane Database of Systematic Reviews 2003, Issue 3. Art. No.: CD000099. DOI: 10.1002/14651858.CD000099.

108. Hayashi, K., Hiroshi Ohta, Kazuki Kurimoto, Shinya Aramaki, Mitinori Saitou. Reconstitution of the Mouse Germ Cell Specification Pathway in Culture by Pluripotent Stem Cells. *Cell*. Volume 146, issue 4, August 2011, Pages 519–532).
109. Helen Bedford, Suzanne Walton, Jane Ahn. Measures of Child Development: A review . Policy Research Unit in the Health of Children, Young People and Families .Centre for Paediatric Epidemiology and Biostatistics.UCL Institute of Child Health, June 2013
110. Henningsen, A.K., Pinborg, A., Lidegaard, O., Vestergaard, C., Forman, J.L., Andersen, A.N. Perinatal outcome of singleton siblings born after assisted reproductive technology and spontaneous conception: Danish national sibling-cohort study. *Fertil Steril* 2011; 95:959-963.
111. Henningsen, A.A., Gissler, M., Skjaerven, R., Bergh, C., Tiitinen, A., Romundstad, B. Trends in perinatal health after assisted reproduction: a Nordic study from the CoNARTaS group. *Human reproduction* (Oxford, England) 01/2015; DOI: 10.1093/humrep/deu345
121. Henriksen, T. The macrosomic fetus: a challenge in current obstetrics. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2008;87:134-145.
122. Hsiao, C., Richter, L.M. Early Mental Development as a Predictor of Preschool Cognitive and Behavioral Development in South Africa The Moderating Role of Maternal Education in the Birth to Twenty Cohort. *Infants & Young Children*. Vol. 27, No. 1, pp. 74–87. Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins. 2014
123. Human Fertilisation and Embryology Authority. The Patients' Guide to IVF Clinics Provisional Data 2002. London: HFEA.
124. Hvidtjorn, D., Schieve, L., Schendel, D., Jacobsson, B., Svaerke, C., Thorsen, P. Cerebral Palsy, Autism Spectrum Disorders, and Developmental Delay in Children Born After Assisted Conception: A Systematic Review and Meta-analysis. 2009, *Arch Pediatr Adolesc Med* 163: 72-83.
125. INE. Estatísticas demográficas. 2012. Edição 2013, pag. 39
126. Infarmed. Disponível em http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=9663&tipo_doc=fi
127. Infopedia - www.infopedia.pt/
128. Jacklin, L., Cockcroft, K. Chapter 12: the Griffiths Scales in South Africa in *Psychological Assessment in South Africa*. Editor(s): Kate Cockcroft, Sumaya Laher. Wits university press. 2013. Disponível em <http://pt.scribd.com/doc/104509735/psychological-assessment-in-south-africa-research-and-applications>
129. James Gallagher Obituary: Robert Edwards, test-tube baby pioneer. Health and science reporter, BBC News, 10/4/2013
130. Jammes, H., Fauque, P., Jouannet, P. Contribution of animal models to the study of reproduction, assisted reproductive technologies and of development. *Bull Acad natl Med*. 2010 Feb;194 (2):301-17; discussion 317-8.

131. Jaquard, Albert (1988). A equação do nenúfar. Lisboa. Terramar: pág. 33
132. Jeff Wang, J., Sauer, M.V. In vitro fertilization (IVF): a review of 3 decades of clinical innovation and technological advancement, *Ther Clin Risk Manag.* 2006 December; 2(4): 355–364.
133. Jones, C.A., Anna L. Christensen, A.L., Hamisu Salihu, Carpenter, W., Petrozzino, J., Abrams, E., Sills, E.S. Keith, L.G.. Prediction of individual probabilities of live birth and multiple birth events following in vitro fertilization (IVF): a new outcomes counselling tool for IVF providers and patients using HFEA metrics. *J Exp Clin Assist Reprod.* 2011; 8: 3.
134. Kallén, B., Finnstrom, O., Lindam, A. Nilsson, E., Nygren, K.G., Otterblad Olausson, P. Trends in delivery and neonatal outcome after in vitro fertilization in Sweden: data for 25 years. *Hum. Reprod.* 2010 Apr; 25 (4):1026-34
135. Kallén, B., Finnstrom, O., Lindam, A., Nilsson, E., Nygren, K.G., Otterblad Olausson, P. Cancer risk in children and young adults conceived by in vitro fertilization. *Pediatrics* 2010e; 126: 270-276.
136. Kalra, S.K., Ratcliffe, S.T., Barnhart, K.T., Coutifaris, C., Extended embryo culture and an increased risk of preterm delivery. *Obstet Gynecol* 2012 Jul;120(1):69-75. doi: 10.1097/AOG.0b013e31825b88fc
137. Kant, Immanuel. *Fundamentação da Metafísica dos Costumes (1785)*, Edições 70, Brasil, 1991, p.69.
138. Kashyap, S., Moher, D., Fung, M.F., Rosenwaks, Z. Assisted reproductive technology and the incidence of ovarian cancer: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 2004; 103(4): 785-794
139. Kozulin, Alex. *Vigotsky's Psychology: A biography of Ideas.* London. 1990
140. Kwan, I., Bhattacharya, S., Knox, F., et al. Conscious sedation and analgesia for oocyte retrieval during in vitro fertilisation procedures [Full Review]. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2005, Issue 3. Art. No.: CD004829.
141. La Bastide-Van Gemert, S., Seggers J, Haadisma, M.L., Heinemann, M.J., Middelburg, K.J., Roseboom, T.J., Schendelaar, P., Hadders-Algra, M., Van den Heuvel, E.R. Is ovarian hyperstimulation associated with higher blood pressure in 4-year-old IVF offspring? Part II: an explorative causal inference approach. *Hum. Reprod.* 2013.
142. Landeweerd, Laurens. Prenatal Diagnosis and the trouble with Eugenics *Rev. Derecho genoma hum;* (30): 35-61, ene.-jun. 2009
143. Lee J, et al. (2012) TOR signaling regulates ribosome and tRNA synthesis via LAMMER/Clk and GSK-3 family kinases. *Mol Cell* 45(6):836-43.
144. Liebaers, I., Desmyttere, S., Verpoest, W., De Rycke, M., Staessen, C., Sermon, K., Devroey, P., Haentjens, P., Bonduelle, M. (Centre for Medical Genetics, Universitair Ziekenhuis Brussel) Report on a consecutive series of 581 children born after blastomere biopsy for preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod.* 2009. Aug 27.
145. Limbos, M.M., Joyce, D.P. Comparison of the ASQ and PEDS in screening for developmental delay in children presenting for primary care. *J Dev Behav Pediatr,* 2011. 32(7): p. 499-511.

146. Loke, Y.J., Novakovic, B., Ollikainen, M., Wallace, E.M., Umstad, M.P., Permezel, M., Morley, R., Ponsonby, A.L., Gordon, I., Galati, J.C., Saffery, R., Craig, J.M. The Peri/postnatal Epigenetic Twins Study (PETS). *Twin Res Hum Genet.* 2013 Feb; 16 (1): 13-20
147. Lopes, A.M., Aston, K.I., Thompson, E., Carvalho, F., Gonçalves, J., et al. (2013) Human Spermatogenic Failure Purges Deleterious Mutation Load from the Autosomes and Both Sex Chromosomes, including the Gene DMRT1. *PLoS Genet* 9(3): e1003349.
148. Luiz, D., Foxcroft, C., & Stewart, R. The Construct Validity of the GMDS. *Child: Care, Health and Development*, 1, 73-83. 2001.
149. Maalouf, W.E., Mincheva, M.N., Campbell, B.K., Hardy, I.C. Effects of assisted reproductive technologies on human sex ratio at birth, fertile Steril. 2014 May;101(5):1321-5.
150. McDonald SD, Han Z, Mulla S, Murphy KE, Beyene J, Ohlsson A; Knowledge Synthesis Group. Preterm birth and low birth weight among in vitro fertilization singletons: asystematic review and meta-analyses. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009 Oct;146(2):138-48.
151. Magalhães, V. Pesquisa e texto de Vivian Magalhães. Disponível em <http://jovemdez.no.comunidades.net/index.php?pagina=1026031840>
152. Maheshwari, A., Pandey, S., Shetty, A., Hamilton, M., Bhattacharya, S. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from the transfer of frozen thawed versus fresh embryos generated through in vitro fertilization treatment: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2012 Aug;98 (2):368-77.
153. Marzocchi, G., Capron, C., Di Pietro, M., Tauleria, E., Duyme, M., Frigerio, A., Gaspar, M., Hamilton, H., Pithon, G., Simões, A., & Thérond, C. (2004). The use of the Strengths and Difficulties Questionnaire (SDQ) in the Southern European countries. *European Child and Adolescent Psychiatry (Suppl 2)*, 13, 40-46.
154. Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., et al. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med.* 2012;9(12):e1001356.
155. Mastenbroek, S., Twisk, M., van Echten-Arends, J. et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med.* 2007;357(1):9-17.
156. Mata, L., Peixoto, F., Morgado, J., Silva, J. C. & Monteiro, V. (Eds.), *Actas do 12.º Colóquio Internacional de Psicologia e Educação: educação, aprendizagem e desenvolvimento: Olhares contemporâneos através da investigação e da prática* (pp. 922-932). Lisboa: ISPA. 1.ª edição: junho de 2012. Disponível em <http://hdl.handle.net/10400.12/1608>
157. Mattison, D.R., Wilson, S., Coussens, C., et al., editors. *The Role of Environmental Hazards in Premature Birth: Workshop Summary*. Institute of Medicine (US) Roundtable on Environmental Health Sciences, Research, and Medicine; Washington (DC): national Academies press (US); fig. 1.1 – 2003

158. Meaney, M.J. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations *Annu Rev Neurosci.* 2001;24: 1161-192
159. Meaney, M.J Nature, nurture, and the disunity of knowledge. *Ann N Y Acad Sci.* 2001 May; 935:50-61.
160. Ménézo, Y., Lichtblau, I., Elder, K. New insights into human pre-implantation metabolism in vivo and in vitro. *J Assist Reprod Genet.* Mar 2013; 30(3): 293–303.
161. Middelburg, K.J., Heineman, M.J., Bos, A.F., & M. Hadders-Algra, M. Neuromotor, cognitive, language and behavioural outcome in children born following IVF or ICSI—a systematic review. *Bmj.* 2008. Published by Oxford University Press on behalf of the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE).
162. Miranda, I. Quando começa a pessoa in *Cadernos de Bioética.* n° 16, p. 44. 1998
163. Moon, H.S., Park, S.H., Lee, J.O. et al. Treatment with piroxicam before embryo transfer increases the pregnancy rate after in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril.* 2004;82(4):816–20.
164. Moore, Keith. *Embriologia Clínica*, 9ª edição, 2013
165. Morice, P., Josset, P., Dubuisson, J.B. History of sterility in ancient times. I. Sterility in Egypt. Diagnostic recipes for sterility and pregnancy in ancient Egypt. *Contracept Fertil Sex.* 1995 Jun; 23 (6):423-7.
166. Myers, E.R., McCrory, D.C., Mills, A.A., et al. Effectiveness of Assisted Reproductive Technology. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2008 May. (Evidence Reports/Technology Assessments, No. 167.) disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK38549/?report=reader>
167. National Collaborating Centre for Women's and Children's Health (UK). Fertility: Assessment and Treatment for People with Fertility Problems. London (UK): RCOG Press; 2004 Feb. (NICE Clinical Guidelines, No. 11.) 5, Investigation of fertility problems and management strategies.
168. Neuenfeldt, E.G. Fertilidade e infertilidade na Bíblia: Suspeitas a partir da teologia feminista *Revista aulas - ISSN 1981-1225 Dossiê Religião N.4 pag 6-8 - abril 2007/julho 2007*
169. Neves, Mª Céu P. (coord) - *Bioética ou bioéticas na evolução da sociedade.* Centro de Estudos de Bioética / Pólo Açores. Coimbra: Gráfica de Coimbra, 2005.
170. Neves, Mª Céu P. A fundamentação antropológica da bioética. *Bioética (CFM)* 1996;4:7-16. Em <http://www.portalmedico.org.br/revista/bio1v4/fundament.html>
171. Neves, Mª Céu P. A Bioética de ontem, hoje e amanhã. Interpretação de um percurso. In *Novos desafios à Bioética.* Coordenação de Luis Archer, Jorge biscaia, Walter Osswald e Michel Renaud. Porto Editora. 2001. Pag. 24 e 25
172. Neves, Mª Céu P. (coord) - *Bioética ou bioéticas na evolução da sociedade.* Centro de Estudos de Bioética / Pólo Açores. Coimbra: Gráfica de Coimbra, 2005.
173. Neves, C.I. Os direitos do feto no limiar da viabilidade e a assimetria legislativa na União Europeia, Actas das Comunicações Livres apresentadas no V Encontro Luso-Brasileiro de Bioética. Porto 2008 em <http://www.porto.ucp.pt/lusobrasileiro/>

174. NICE. Clinical Guidelines, No. 11
175. O'Connell, M.E., Boat, T., Warner, K.E., editors. Preventing Mental, Emotional, and Behavioral Disorders Among Young People: Progress and Possibilities. Washington (DC): National Academies Press (US); 2009. Summary. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK32776/>
176. Oliveira, D. C. A.; Borges Júnior, E.. Reprodução assistida: até onde podemos chegar? Compreendendo a Ética e a Lei. 1ª. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.
177. Ollikainen, M., Craig, J.M. Epigenetic discordance at imprinting control regions in twins. *Epigenomics* 2011 Jun;3(3):295-306.
178. Ombelet, W., Martens, G., De Sutter, P., Gerris, J., Bosmans, E., Ruysinck, G., Defoort, P., Molenberghs, G., Gyselaers, W. Perinatal outcome of 12,021 singleton and 3108 twin births after non-IVF-assisted reproduction: a cohort study. *Hum Reprod* 2006; 21:1025-1032.
179. Osswald, W. Alguns aspectos éticos da investigação com células tronculares (ou estaminais), Ciência e ética: da célula ao embrião. Actas do 8º Seminário do CNECV. Coleção Bioética. Nº 9, pag 33-35. Lisboa 2004
180. Osswald W., Limites do consentimento informado, uma reflexão ética sobre os cuidados de saúde mental .in Estudos de Direito da Bioética, Coord. José de Oliveira Ascensão, Almedina, Vol.III, ob.cit. pp. 151 e segs. fevereiro de 2005.
181. Osswald, W., Neves, Maria do Céu P. Bioética Simples. Lisboa: Editorial Verbo, 2007.
182. Outomuro, D.. Fundamentação do ensino da Bioética na Medicina. *Acta bioeth.* [online]. 2008, vol.14, n.1 pp. 19-29. Em: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-569X2008000100003&lng=pt&nrm=iso. ISSN 1726-569X.
183. Ozalp, S., Mete Tanir, H., Sener, T., Yazan, S., Keskin, A.E. Health risks for early (< ou = 19) and late (> ou = 35) childbearing. *Arch Gynecol Obstet.* 2003 Aug;268(3):172-4.
184. Pandian, Z., Marjoribanks, J., Ozturk, O., Serour, G., Bhattacharya, S. Number of embryos for transfer following in vitro fertilisation or intra-cytoplasmic sperm injection. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013 Jul 29:7 CD003416
185. Panel to Review the National Children's Study Research Plan, National Institute for Clinical Excellence (NHS), 2004 – www.nice.org.uk
186. Papis, K., Lewandowski, P., Wolski, J.K., Koziol, K., *Ginekol Pol.* [Children born from frozen embryos stored for 10 years -- analysis of 5 cases].*Ginekol Pol.* 2013 Nov; 84 (11):970-3.
187. Pelkonen, S., Koivunen, R., Gissler, M., Nuojua-Huttunen, S., Suikkari, A.M., Hyden-Granskog, C., Martikainen, H., Tiitinen, A., Hartikainen, A.L. Perinatal outcome of children born after frozen and fresh embryo transfer: the Finnish cohort study 1995–2006. *Hum Reprod* 2010;25:914-923.
188. Pereira, G.O., Pacífico, A.P. Doação e adoção como políticas para salvar os embriões humanos excedentes e congelados *Rev. Bras. Saúde matern. Infant.;* 10(supl.2): s391-

- s397, dez. 2010. LILACS | ID: 574874. Em <http://www.procriar.com.br/tratamentos/congelamento-de-embrioes>
189. Perry, S.F. Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. *Molecular Biotechnology*, 9:59-64, 1998
190. Pessini, Loyola. *Fundamentos da Bioética*, 1998, São Paulo, Loyola, Cap. 4, p. 170).
191. Pussi, W.A. *Personalidade Jurídica do Nascituro*, Juruá, 2005, p. 273
192. Pierre Baldi, *The shattered self. The end of natural evolution*. Pag 42. First MIT press paperback edition, 2002
193. Pinborg, A., Loft, A., Henningsen A K, Rasmussen S, Andersen A N. Infant outcome of 957 singletons born after frozen embryo replacement:the Danish National Cohort Study 1995-2006. *Fertil Steril* 2010 Sep; 94 (4):1320-7.
194. Pinborg, A., Loft, A., Noergaard, L., Henningsen, A.K., Rasmussen, S., Nyboe Andersen, A. Singletons born after frozen embryo transfer (FET) have an increased risk of being large for gestational age in Danish national controlled cohort study of 15078 singletons. O-230 Abstract of the 27th Annual Meeting of ESHRE, Stockholm, Sweden. *Hum Reprod* 2011
195. Pinborg, A., Wennerholm, U.B., Romundstad, Loft, A., Aittormaki K., Soderstrom-Anttila V., Nygren, K.G., Hazekamp, J., Bergh, C. Why do singletons conceived after assisted reproduction technology have adverse perinatal outcome? Systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update* Volume 19, Issue 2 Pp. 87-104. 2012
196. Planas Ribo, J; Coronel Gagliardi, R. Obtención y criopreservación de células madre del tejido graso mediante liposucción / Collecting and criopreservation of stem cells obtained by liposuction from fat tissue *Cir. plást. ibero-latinoam*; 37(4):319-324, oct.-dic. 2011.
197. Porta Ribera, R; Trémols, V; Munar Mut, C; Boada Palá, M; Ríos Guillermo, J; Molina Morales, V. Seguimiento del neurodesarrollo de niños nacidos por técnicas de reproducción asistida *Rev. neurol. (Ed. impr.)*;49(9):463-466, nov. 2009.
198. Poustie, V.J., Dodd, S., Drakeley, A.J. Low- dose aspirin for in vitro fertilisation [Full Review]. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2007, Issue 4. Art. No.: CD004832.
199. Potashnik, G., Lerner-Geva, L., Genkin, L. et al. (1999) Fertility drugs and the risk of breast and ovarian cancers: results of a long term follow-up study. *Fertil.steril.*,71,853-859.
200. Programa Nacional de Saúde Reprodutiva. *Orientações*. Pag. 5, 6, 12. Direcção-Geral da Saúde. Lisboa. 2008
201. Pussi, William Artur - *Personalidade jurídica do nascituro*, Curitiba: Juruá, 2005. p. 287.
202. Quinn, P., Cooke, S. Equivalency of culture media for human in vitro fertilization formulated to have the same pH under an atmosphere containing 5% or 6% carbon dioxide. *Fertil Steril*. 2004;81(6):1502-6
203. Rato, M.L., Gouveia-Oliveira, A., Plancha, C.E. Influence of post-thaw culture on the developmental potential of human frozen embryos. 2012 Aug; 29(8):789-95. doi: 10.1007/s10815-012-9793-z.

204. Reefhuis, J., Honein, M.A., Schieve, L.A., Correa, A., Hobbs, C.A., Rasmussen, S.A. Assisted reproductive technology and major structural birth defects in the United States. National Birth Defects Prevention Study. *Hum Reprod.* 2009 Feb; 24 (2):360-6.
205. Reich, W., *Encyclopedia of bioethics*, Schuster, Nova Iorque, 1978
206. Relatório referente à atividade desenvolvida no ano de 2013. N.º 3 do artigo 30.º da Lei n.º 32/2006, de 26 de julho.
207. Resolução da Assembleia da República n.º 1/2001 - aprova, para ratificação, a convenção para a protecção dos direitos do homem e da dignidade do ser humano face às aplicações da Biologia e da Medicina: Convenção sobre os direitos do homem e a biomedicina, aberta à assinatura dos estados membros do conselho da Europa em Oviedo, em 4/4/1997, e o protocolo adicional que proíbe a clonagem de seres humanos, aberto à assinatura dos estados membros em Paris, em 12/1/1998.
208. Rimm, A. A., Katayama, A. C. The impact of ART on major malformations is not known at this time. *J Assist Reprod Genet* 2012b; 29:699–700.
209. Roy, B. V., Veenstra, M., Clench-Aas, J. Construct validity of the five-factor Strengths and Difficulties Questionnaire (SDQ) in pre-, early, and late adolescence. 49:12. pp. 1304-1312. *Child Psychology and Psychiatry.* 2008
210. Roseboom TJ, Schendelaar P, Hadders-Algra M, Van den Heuvel ER.
211. Is ovarian hyperstimulation associated with higher blood pressure in 4-year-old IVF offspring? Part II: an explorative causal inference approach. *Hum Reprod.* 2014 Mar;29(3):510-7.
212. Rothenberger A., Woerner W., Strengths and Difficulties Questionnaire (SDQ)--evaluations and applications. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2004;13 Suppl 2:II1-2.
213. Rothstein, M.A., Yu Cai & Marchant, G.E. Ethical implications of epigenetics research. *Nature Reviews Genetics.* 2009 april. 10, 224
214. Ruestow, J. Anton von Leeuwenhoek and his perception of spermatozoa. Chapter 4:4.1 Leeuwenhoek and images of Homunculi . Adapted from an article by EG Ruestow, J. *History of Biology* 16: 185-224.
215. Sanchis Calvo A, Marcos Puig B, Juan García L, Morales Suárez-Varela MM, Abeledo Gómez A, Balanzá Machancosa R, Pineda Caplliure A, Tamarit Bordes G, Gimeno Clemente N, Cerveró Martí L. Birth characteristics due to in vitro fertilization (IVF) techniques. *An Pediatr (Barc).* 2009 Apr;70(4):333-9.
216. Sattar, N., McConnachie, A., O'Reilly, D., et al. Inverse association between birth weight and C-reactive protein concentrations in the MIDSPAN Family Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:583–7.
217. Saul, R.A. Genetic and genomic literacy in pediatric primary care. *Pediatrics* 2013 Dec;132 (Suppl 3):S198-202.
218. Saur, Adriana Martins e Loureiro, Sonia Regina. Qualidades psicométricas do Questionário de Capacidades e Dificuldades: revisão da literatura. *Estud. psicol. (Campinas)*. 2012, vol.29, n.4, pag. 619 - 629 . Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-166X2012000400016&lng=en&nrm=iso

219. Schieve, L.A., Tatham L, Peterson HB. et al. Spontaneous abortion among pregnancies conceived using assisted reproductive technology in the United States. *Obstet Gynecol.* 2003;101(5 Pt 1):959 – 67.
220. Sazonova, A., Källen, K., Thurin-Kjellberg, A., Wennerholm, U.B., Bergh, C. Obstetric outcome in singletons after in vitro fertilization with cryopreserved/thawed embryos. *Hum Reprod* 2012.
221. Sazonova, A., Källen, K., Thurin-Kjellberg, A., Wennerholm, U.B., Bergh, C.. Neonatal and maternal outcomes comparing women undergoing two in vitro fertilization (IVF) singleton pregnancies and women undergoing one IVF twin pregnancy. *Fertil Steril* 2013;99:731-737.
222. Schenker, J.G. *Ethical Dilemmas in Assisted Reproductive Technologies* editado por Joseph G. Schenker - <https://books.google.pt/>
223. Schieve, L.A, Tatham, L., Peterson, H.B. et al. Spontaneous abortion among pregnancies conceived using assisted reproductive technology in the United States. *Obstet Gynecol.* 2003;101(5 Pt 1):959–67.
224. Schokel, Luis Alonso. *Dicionário Bíblico Hebraico-Português*. São –Paulo: Paulus, 1997
225. Schwarts, S. *Uma visão da esterilidade na Bíblia Hebraica*. São Paulo: Associação Editorial Humanitas, 2004
226. Schwarze, J.E., Balmaceda, J., Pommer, R. Cryopreservation in blastocyst stage effectively reduce the number of embryos cryopreserved. *Ver Med Chil*; 140(1): 45-49, ene. 2012. tab. | LILACS | ID: 627606).
227. Scott F. Gilbert. *When does Human personhood begin?* *Development Biology*, chapter 1:1.1 10th edition 2013
228. Sebastiani, G; Pertierra Cortada, A; Vidal Sordé, E; Figueras Aloy, J; Balasch Cortina, J. Factores relacionados con las técnicas de reproducción asistida y su repercusión en el neonato *An. pediátr.* 2003, Ed. impr.;70 (4):323-332, abr. 2009. Tab).
229. Seggers, J., et al. - Part I: multivariable regression analysis. 2014
230. Seggers, J., Haadisma, M.L., La Bastide-Van Gemert, S., Heineman, M.J., Middelburg, K.J., Roseboom, T.J., Schendelaar, P., Van de Heuvel, E.R., Hadders-Algra, M. Is ovarian hyperstimulation associated with higher blood pressure in 4-year-old IVF offspring? Part I: multivariable regression analysis. 2014
231. Serrão, D. A defesa da vida: um direito da pessoa, um dever da sociedade. *Acção Médica*. Ano LXIII, nº 3, p 34- 41. 1999
232. Serrão, D. *Uso de embriões humanos em investigação científica*. Elaborado a pedido do Ministério da Ciência e Ensino Superior. Secretaria de Estado da Ciência e Tecnologia. 2/ 2003
233. Serrão, D. *Estatuto do Embrião*. *Rev Bioética*. 2003; 11: 109-116.
234. Serrão, D. *Livro Branco sobre “O uso de embriões em investigação científica”*. Relatório Preliminar para um debate alargado relativo à necessidade e oportunidade de legislar sobre a utilização de embriões humanos em investigação científica. Publicação do Ministério da Ciência e do Ensino Superior. Lisboa, 2003.

235. Shinya Yamanaka - Biographica. Nobelprize.org. Nobel Media AB 2014. Disponível em <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2012/yamanaka-bio.html>
236. Shiota, K., Yamada, S., Intrauterine environment-genome interaction and children's development (3): Assisted reproductive technologies and developmental disorders. *Toxicol Sci.* 2009;34 Suppl 2:SP287-91.
237. Sifer, C., Sermondade, N., Dupont, C., Poncelet, C., Cédric-Durnerin, I., Hugues, J. N., Benzacken, B., Levy, R., [Outcome of embryo vitrification compared to slow freezing process at early cleavage stages. Report of the first french birth]. *Gynecol Obstet Fertil.* 2012 mar; 40(3): 158-61.
238. Skora, D. David Frankfurter, D., Adverse perinatal events associated with ART. *Semin Reprod med.* 2012; 30 (02): 84-91
239. Slack, J.M.W. Waddington, C.H. The last Renaissance biologist? *Nature Reviews Genetics.* November 2002. 3, 889-895. Disponível em <http://www.nature.com/nrg/journal/v3/n11/full/nrg933.html>
240. Staessen, C., Platteau, P., Van Assche, E. et al. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2004;19(12):2849–58.
241. Steel, A.J., Sutcliffe, A. Long-term health implications for children conceived by IVF/ICSI. *Hum Fertil (Camb).* 2009 Mar;12(1):21-7.
242. Stock, Gregory. Choosing our children genes. The last human. In *Redesigning humans*. Profile books, U.K. 2002.
243. Stone, L.L., Oten, R., Engels, R. C.M.E., Vermulst, AdA., Janssens, Jan M., Psychometric Properties of the Parent and Teacher Versions of the Strengths and Difficulties Questionnaire for 4- to 12-Year-Olds: A Review. *Clin Child Fam Psychol Rev.* 2010 Sep; 13(3): 254–274.
244. Strömberg, B., Dahlquist, G., Ericson, A., Finnström, O., Köster, M., Stjernqvist, K. Neurological sequelae in children born after in-vitro fertilisation: a population-based study. *The Lancet* (2002) 359:461–465.
245. Sutcliffe, A.G., D'souza, S.W., Cadman, J. Richards, B. McKinlay, I.A., Lieberman, B. Outcome in children from cryopreserved embryos. *Arch dis child.* 1995 apr;72(4):290-3.
246. Sutcliffe, A.G., D'Souza, S.W., Cadman, J. Richards, B. McKinlay, I.A., Lieberman, B. Minor congenital anomalies, major congenital malformations and development in children conceived from cryopreserved embryos. *Hum Reprod.* 1995 Dec; 10(12): 3332-7
247. Swanson, K. W., *Adultery by doctor: artificial insemination, 1890-1945* . 2012. School of Law, faculty publications. Paper 57. Disponível em http://iris.lib.neu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1057&context=slaw_fac_pubs
248. Tabitha, M. *Powledge Behavioral Epigenetics: How Nurture Shapes Nature* Oxford Journals, Science & Mathematics, bioscience, 2011. Volume 61, Issue 8, Pp. 588-592.

249. The European IVF Monitoring Programme (EIM), for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Assisted reproductive technology and intrauterine inseminations in Europe, 2005: results generated from European registers by ESHRE Table II. *Hum Reprod.* 2009 Jun;24(6):1267-87.
250. Trounson, A., Mohr, L., Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Letters to nature. Nature* 305, 707 – 709. 1983
251. Tsuguyoshi Suzuki, Nobumasa Imura, Thomas W. Clarkson. *Advances in Mercury Toxicology* editado por Tsuguyoshi Suzuki, Nobumasa Imura, Thomas W. Clarkson. 1992. pag 453-454. Disponível em <http://books.google.pt/books?id=pMVezB0Uo0MC&pg=PA454&dq=%C2%ABMinamata+disease%C2%BB&hl=pt-PT&sa=X&ei=cBciU5e4FaO00wXSqICAAG&ved=0CC4Q6AEwAw#v=onepage&q=%C2%ABMinamata%20disease%C2%BB&f=false>
252. UNESCO, Declaração universal sobre bioética e direitos humanos. 2005.
253. Van Rensselaer Potter II, «Bioethics: The science of Bioethics: Bridge to the future » 1971
254. Van Rumste, M.M.E., Evers, J.L.H., Farquhar, C.M. Intra-cytoplasmic sperm injection versus conventional techniques for oocyte insemination during in vitro fertilisation in patients with non-male subfertility [Full Review]. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2003, Issue 2. Art. No.: CD001301..
255. Verhulst, S.M., Cohlen, B.J., Hughes, E., et al. Intra-uterine insemination for unexplained subfertility [Full Review]. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2006, Issue 4. Art. No.: CD001838.
256. Vergouw, C.G., Kosteljik, E.H., Doejaaren, E., Hompes, P.G., Lambalk, C.B., Schats, R. The influence of the type of embryo culture medium on neonatal birthweight after single embryo transfer in IVF. *Hum Reprod.* 2012 Sep; 27 (9):2619-26.
257. Vitiello, D., Patrizio, P. Implantation and early embryonic development: implications for pregnancy. *Semin Perinatol.* 2007;31(4):204–7.
258. Volpe, J. *Neurology of the newborn.* W.B.Saunders company. 2001. pp 3. 4th edition.
259. Von Känel, T., Huber, A.R. DNA methylation analysis. *Swiss Med Wkly.* 2013 May 28;143:w13799. doi: 10.4414/smw.2013.13799.
260. Wang, Y.A., Sullivan, E.A., Black, D., Dean, J., Bryant, J., Chapman, M. Preterm birth and low birth weight after assisted reproductive technology-related pregnancy in Australia between 1996 and 2000. *Fertil Steril* 2005; 83:1650-1658.
261. Wang, J., Sauer, M. V. In vitro fertilization (IVF): a review of 3 decades of clinical innovation and technological advancement. *Ther Clin Risk Manag.* 2006 December; 2(4): 355–364.
262. Warkany J: *Congenital malformations*, Chicago, 1971, Mosby.
263. Weerasekera, D.S., Udugama, S.G., Pregnancy at 40 and over: a case-control study in a developing country. *J Obstet Gynaecol.* 2003 Nov; 23 (6):625-7.
264. Weil, E., Sibony, C., Cornet, D., Ravel, C., Fiori, O., Berthaut, I., De Larouzière, V., Mandelbaum, J. Embryo donation: a repeated donation? free communication, Session

- 57: Psychology and counselling . Abstracts of the 23rd Annual Meeting of the ESHRE, Lyon, France, 1–4 July 2007
265. Weizmann Institute of Science (2013, September 18). Stem cell reprogramming made easier. Science Daily. Disponível em <http://www.sciencedaily.com/releases/2013/09/130918132449.htm>
266. Wennerholm B.U., Cryopreservation of embryos and oocytes: obstetric outcome and health in children Hum. Reprod. (2000) 15 (suppl 5): 18-25.
267. Wennerholm, U.B., Söderström-Anttila, V., Bergh C.et al. Children born after cryopreservation of embryos or oocytes: a systematic review of outcome data. Hum Reprod. 2009 Sep;24 (9):2158-72.
269. Whitman-Elia, G.F., Baxley EG (2001) A Primary Care Approach to the Infertile Couple, Journal of American Board of Family Practice, 14 (1): 33-45
270. Wikland, M., Hardarson, T., Hillensjo, T., Westin, C., Westlander, G., Wood, M., Wennerholm, U.B.. Obstetric outcomes after transfer of vitrified blastocysts. Hum Reprod 2010;25:1699-1707.
271. Wilson, C., Check, J.H., Summers-Chase, D., Swenson, K. Successful pregnancies from embryos cryopreserved more than ten years: two case reports. Clin Exp Obstet Gynecol. 2006;33(2):79-80.
272. Wright, R., Robert A. Saul, R.A. Epigenetics and Primary Care. Pediatrics Vol. 132 No. Supplement 3 December 1, 2013 pp. S216 -S223 (doi: 10.1542/peds.2013-1032F)
273. Women's practice nº 14 janeiro/fevereiro 2011, p. 30-31, Aniversário do SEMER: há 25 anos a investigar e a inovar na área da PMA.
274. Yue-hong Lu, Ning Wang, Fan Jin . Long-term follow-up of children conceived through assisted reproductive technology. Journal of Zhejiang Univ Sci B. May 2013; 14(5): 359–371.

OUTRAS PUBLICAÇÕES E RECURSOS ACEDIDOS ON-LINE

LIVROS E REVISTAS:

http://bioethics.georgetown.edu/pcbe/reports/past_commissions/>

<https://books.google.pt/>

<http://www.cochranelibrary.com/>

http://www.ufrgs.br/espmat/disciplinas/midias_digitais_II/modulo_II/fisiologia2.htm

<http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/NADPH>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>

<http://www.oxfordjournals.org/en/our-journals/medicine-and-health.html>

<http://www.pediatrics.emory.edu/divisions/neonatology/dpc/faq.html>

https://www.ucl.ac.uk/cpru/documents/review_of_measures_of_child_development

DIVERSOS

Acesso à informação de boa evidência em saúde. Portal Cochrane BVS. Disponível em
<http://cochrane.bvsalud.org>

APEA- Associação portuguesa de engenharia do ambiente.

<http://www.aepa.pt/scid/webaepa/defaultArticleViewOne.asp?articleID=3101&categoryID=810>

<http://www.bioeticaweb.com/aies-lascito-adoptar-embriones-congelados-para-salvar-su-vida/>

<http://www.bioeticaweb.com/rescate-y-adopcion-de-embriones-criopreservados-solidaridad-o-encarnizamiento-reproductivo/>

<http://www.agence-biomedecine.fr/Procedes-et-techniques-d-AMP?lang=fr>

<http://www.apfertilidade.org/web/tecnicas-de-reproducao/134-fecundacao-in-vitro-fiv>

Cryobiology. (ip+ja) unesco/iubs/eubios living bioethics dictionary version 1.3 , pag 115
<http://www.uhcw.nhs.uk/ivf/treatments/cryopreservation>

<http://www.pro-criar.com.br/tratamentos/congelamento-de-embrioes>

http://inseminacaoefertilizacao.blogspot.pt/2009_08_01_archive.html

Portal médico <http://www.portalmedico.org.br./revista/bio1v4/fundament.html>

Research Council and Institute of Medicine. Em

<http://www.nap.edu/catalog/12211.html> pag 73

Questionário de capacidades e dificuldades (SDQ-Por) [Strengths and Difficulties Questionnaire, Portuguese Version]. Disponível em www.sdqinfo.org.

Questões Éticas sobre o Congelamento de Embriões. Disponível em <http://www.pro-criar.com.br/tratamentos/congelamento-de-embrioes>

LISTA DE QUADROS, TABELAS E FIGURAS

A – Quadros

- 1) Quadro 1 - Classificação de Oxford Centre for Evidence - Based Medicine. Pag. 40
- 2) Quadro 2 – Resultados nacionais relativos à IG em que ocorreram os partos após transferência de embriões criopreservados (TECs provenientes de FIV/ICSI – ano de 2011) . Dados de http://www.cnpma.org.pt/cnpma_documentacao.aspx#. Da pág. 109
- 3) Quadro 3 – N° de embriões criopreservados e acumulados em Portugal entre 2009 a 2013. Pág. 110. Disponível em http://www.cnpma.org.pt/cnpma_documentacao.aspx#.
- 4) Quadro 4 – Quadro remissivo dos principais estudos incluídos na revisão de U.B. Wennerholm et al. - 2009 em que foram analisados centenas de artigos registados na PubMed, Cochrane e Embase entre 1984 e setembro de 2008. Da pág. 140-142
- 5) Quadro 5 - número de partos e de recém-nascidos (RNs) após transferência de embriões criopreservados (provenientes de FIV/ICSI – ano de 2011 em Portugal em 2011). Da pág. 223
- 6) Quadro 6 – Resultados do grupo A nas EDMG (TEC; M = masculino; F = feminino). Pág. 243
- 7) Quadro 7 – Resultados do grupo B nas EDMG (Transferência a fresco; M = masculino; F = feminino). Pág. 245
- 8) Quadro 8 – Resultados do grupo C nas EDMG (Fertilização natural; M = masculino; F = feminino). Pág. 247
- 9) Quadro 9 – modelo de cotação do SDQ-Por preenchido pelos pais. Pág. 251
- 10) Quadro 10 – Distribuição dos grupos em função dos resultados da cotação nos questionários SDQ-Por. Pág. 253.

B - Tabelas

Tabela 1: Graus de Recomendação (adaptado e traduzido de www.escardio.org).

Pag.41

Tabela 2: Níveis de Evidência (adaptado e traduzido de www.escardio.org). Pag. 41

C – Figuras

- 1) Fig. 1 - *Mandrágora* – Fotografia de duas raízes antropomórficas de Mandrágora. Pág. 51
- 2) Fig. 2 - Ilustração do manuscrito do séc XV "*Tacuinum Sanitatis*" em <http://bruxaria-tradicional.blogspot.pt/2011/04/bruxaria-tradicional-mandragora.html>. Pág. 51
- 3) Fig. 3 - “Prevalence of primary infertility among women who seek a child, in 2010“. Disponível em “<http://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.1001356>“. Pág 61
- 4) Fig. 4 – Representação esquemática da ovogénese. Disponível em <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Citologia2/nucleo16.php>. Pág. 71
- 5) Fig. 5 – Processo de segmentação embrionária. Disponível em
 - a. <http://www.infoescola.com/wp-content/uploads/2009/08/segmentacao1.jpg>. Pág. 79
- 6) Fig 6 - Técnica de ICSI (intracitoplasmatic sperm injection). Disponível em <http://fertileweb.com/reproductive-medicine/icsi/>. Pág. 81
- 7) Fig. 7 – Esquema da técnica de transferência de embriões com controle ecográfico. Pág. 97. Disponível em <http://procriacao medicamenteadassistida.blogspot.pt/2012/01/fases-da-fertilizacao-in-vitro.html>
- 8) Fig. 8 - Criopreservação de embriões. Pág. 103. Disponível em <http://jus.com.br/revista/texto/22778/a-personalidade-juridica-dos-embrioes-excedentarios-e-a-dignidade-da-pessoa-humana>
- 9) Fig. 9 – Blastocisto de 4 células (fotografia de C. Wong). Pág.112
- 10) Fig. 10 - Mecanismos epigenéticos (Powledge, T.M. Bioscience; 61:588-592. 2011). Pág.118

- 11) Fig.11 - A síndrome de Prader-Willi (SPW) é determinado pelo pai, a síndrome de Angelman (SA) tem origem materna (...). Pág.127. disponível em <http://dhsgenetics.wikispaces.com/Sex>
- 12) Fig.12 - Embrião de 5 dias ou blastocisto (em fase de transferência). Pág.131 <http://procriacao medicamenteadministrada.blogspot.pt/2012/01/fases-da-fertilizacao-in-vitro.html>
- 13) Fig.13 - Denúncia dum polémico e bem conhecido estudo que envolveu experimentação humana, iniciada em 1932 com 600 afroamericanos. Pág 158. Disponível em <http://www.popfi.com/wp-content/uploads/tuskegee2.jpg>
- 14) Fig. 14 - Modelo nacional de avaliação do desenvolvimento infantil (CNPMA). Pág. 202. Disponível em http://www.cnpma.org.pt/Docs/Modelo_DesenvolvimentoCrianca.pdf
- 15) Fig 15 – pág 235. Kit Griffiths 0-2 anos
- 16) Fig. 16 – pág. 235. Kit Griffiths 2-8 anos

ANEXOS

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 - Classificação social segundo Graffar.

Anexo 2 – Modelo de questionário de capacidades e de dificuldades (SDQ-Por).

Anexo 3 – Organização do SDQ-por e cotação do questionário de capacidades e dificuldades (SDQ-por) - versão de pais/ professores.

Anexo 4 – Projeto de estudo submetido à CNPD.

Anexo 5 - Modelo do consentimento informado submetido à CNPD.

Anexo 6 - Modelo da história clínica submetido à CNPD.

Anexo 7 – Autorização nº 3616/15 da CNPD.

Anexo 8 – Resposta ao pedido de apoio à investigação, feito à Associação Portuguesa de Fertilidade (APF).

Anexo 9 – Escala de Desenvolvimento Mental de Griffiths.

ANEXO 1 - CLASSIFICAÇÃO SOCIAL SEGUNDO GRAFFAR (Bruxelas)

Este método de estratificação social do indivíduo ou da família observada, baseia-se no estudo dum conjunto de cinco critérios:

1. A profissão;
2. O nível de instrução;
3. As fontes de rendimentos familiares;
4. O conforto da habitação;
5. A qualidade do local de residência.

Atribui-se uma pontuação relativa a cada um dos cinco critérios enumerados, e procede-se à soma dessas pontuações para definir o escalão social.

1. A profissão – as famílias são classificadas em cinco categorias segundo a profissão exercida pelo pai, servindo-nos da classificação britânica, tal como se descreve na obra ‘Classification of Occupations’, General Register Office (London Stationary Office 1951); no caso da mãe de família exercer uma profissão de nível mais elevado do que a do pai, será essa a que servirá de base para a classificação da família.

Nota – A pontuação dada na classificação britânica não é equivalente a todos os países pelo que são aceites adaptações regionais equiparáveis. O estatuto de algumas profissões difere de país para país.

- 1º. Grau – Directores de bancos, directores técnicos de empresas, profissionais com títulos universitários ou de escolas especiais e militares de alta patente.
- 2º. Grau – Chefes de secções administrativos ou de negócios de grandes empresas, subdirectores de bancos, peritos e técnicos
- 3º. Grau – Ajudantes técnicos, desenhadores, caixeiros, contramestres, oficiais de primeira, encarregados, capatazes e mestres-de-obras.
- 4º. Grau - Motoristas, polícias, cozinheiros, etc.
- 5º Grau - Jornaleiros, mandaretes, ajudantes de cozinha ou de limpeza, etc.

2. O nível de instrução: as categorias estabelecidas são as seguintes:

- 1º. Grau - Ensino universitário ou equivalente
- 2º. Grau - Ensino médio ou técnico superior
- 3º. Grau - Ensino médio ou técnico inferior
- 4º. Grau - Ensino primário completo
- 5º. Grau - Ensino primário incompleto ou nulo

Exemplos de graus de instrução

- 1º. Grau - Catedráticos e assistentes, doutores, títulos universitários ou de escolas superiores ou diplomas especiais, economistas, notários, juízes, magistrados, agentes do Ministério Público, militares de Academia.
- 2º. Grau - Técnicos e peritos
- 3º. Grau - Cursos de liceu, industrial ou comercial, militares de baixa patente ou sem Academia
- 4º. Grau - Ensino primário completo
- 5º. Grau - Saber ler e escrever ou analfabetos.

3. Os rendimentos familiares – é considerada a principal fonte de rendimentos da família. Adoptam-se as cinco categorias seguintes:

- 1º. Grau - A fonte principal mais fortuna herdada ou adquirida.
- 2º. Grau - Os rendimentos consistem em lucros de empresas, altos honorários, lugares bem remunerados, etc.
- 3º. Grau - Os rendimentos correspondem a um vencimento mensal fixo. Tipo funcionário
- 4º. Grau - Os rendimentos resultam de salários; ou seja remuneração por semana, jornal, horas a tarefa.
- 5º. Grau - Beneficiência pública ou privada e que sustenta o indivíduo ou a família. Não se incluem as pensões de desemprego ou de incapacidade

Exemplos de rendimentos familiares

- 1°. Grau – Pessoas que vivem de rendimentos, proprietários, grandes industriais ou grandes estabelecimentos comerciais.
- 2°. Grau – Encarregados e gerentes, lugares com adição de rendimentos igual aos Encarregados e gerentes, representantes de grandes firmas comerciais. Profissões liberais com grandes vencimentos.
- 3°. Grau – Empregados do Estado, Governos Cívicos ou Câmaras Municipais, oficiais de primeira, subgerentes ou cargos de responsabilidade em grandes empresas. Profissões liberais de mediano rendimento. Caixeiros – viajantes.
- 4°. Grau – Operários, empregados de comércio e escriturários.
- 5°. Grau – Desempregados ou sem rendimentos

4. O conforto da habitação – avalia-se o conjunto, ainda que seja um pouco subjectivo.

Estabeleceram-se cinco categorias:

- Grupo 1 – Casas ou andares luxuosos ou muito grandes oferecendo aos moradores o máximo conforto.
- Grupo 2 – Categoria intermédia: casas ou andares que sem serem tão luxuosas como as da categoria precedente são, não obstante, espaçosas e confortáveis
- Grupo 3 – Casas ou andares modestos, bem construídos e em bom estado de conservação, bem iluminadas e arejadas, com cozinha e casa de banho.
- Grupo 4 – Categoria intermédia entre a 3 e a 5
- Grupo 5 – Alojamentos impróprios. Choças, barracas ou andares desprovidos de ventilação, iluminação ou sobrelotados.

5. Qualidade do bairro habitado

- Grupo 1 – Bairro residencial elegante, onde o valor do terreno ou os alugueres são elevados
- Grupo 2 – Bairro residencial bom, de ruas largas com casas confortáveis e bem conservadas.
- Grupo 3 – Ruas comerciais ou estreitas e antigas com casas de aspecto geral menos confortável e zonas rurais não degradadas

- Grupo 4 – Bairro operário, populoso, mal arejado ou bairro em que o valor do terreno está diminuído como consequência da proximidade de oficinas, fábricas, estações de caminho de ferro, etc.

No caso em que haja uma notória diferença entre o bairro relativamente confortável e a residência miserável deve ser considerada esta última.

6. Classificação social

Aplicando coeficientes de ponderação de 1 a 5 em cada um dos grupos encontrados, obteremos a seguinte classificação:

- Classe I – Famílias cuja soma de pontos vai de 5 a 9
- Classe II – Famílias cuja soma de pontos vai de 10 a 13
- Classe III – Famílias cuja soma de pontos vai de 14 a 17
- Classe IV – Famílias cuja soma de pontos vai de 18 a 21
- Classe V – Famílias cuja soma de pontos vai de 22 a 25

ANEXO 2

	QUESTIONÁRIO DE CAPACIDADES E DE DIFICULDADES (SDQ-Port) (PERGUNTAS PARA RESPONDER)	Não é verdade	É um pouco verdade	É muito verdade.
1	É sensível aos sentimentos dos outros			
2	É irrequieto, muito mexido e nunca está quieto			
3	Queixa-se frequentemente de dores de cabeça, de barriga ou vômitos			
4	Partilha facilmente com as outras crianças (guloseimas, brinquedos, lápis, etc)			
5	Enerva-se muito facilmente e faz muitas birras			
6	Tem tendência a isolar-se, gosta mais de brincar sozinho/a			
7	Obedece com facilidade, faz habitualmente o que os adultos lhe mandam			
8	Tem muitas preocupações, parece sempre preocupado/a			
9	Gosta de ajudar se alguém está magoado, aborrecido ou doente			
10	Não sossega. está sempre a mexer as pernas ou as mãos			
11	Tem pelo menos um bom amigo/uma boa amiga			
12	Luta frequentemente com as outras crianças, ameaça-as ou intimida-as			
13	Anda muitas vezes triste, desanimado/a ou choroso/a			
14	Em geral as outras crianças gostam dele/a			
15	Distrai-se com facilidade, está sempre com a cabeça no ar			
16	Em situações novas é receoso/a, muito agarrado/a e pouco seguro/a			
17	É simpático/a e amável com crianças mais pequenas			
18	Mente frequentemente ou engana			
19	As outras crianças metem-se com ele/a, ameaçam-no/a ou intimidam-no/a			
20	Sempre pronto a ajudar os outros (pais professores ou outras crianças)			

	QUESTIONÁRIO DE CAPACIDADES E DE DIFICULDADES (SDQ-Por) (PERGUNTAS PARA RESPONDER)	Não é verdade	É um pouco verdade	É muito verdade.
21	Pensa nas coisas antes de as fazer			
22	Rouba em casa, na escola ou em outros sítios			
23	Dá-se melhor com adultos do que com outras crianças			
24	Tem muitos medos, assusta-se com facilidade			
25	Geralmente acaba o que começa, tem uma boa atenção			

Tem algum comentário ou preocupação? Descreva.

Em geral, parece-lhe que o seu filho/a tem dificuldades em algumas das seguintes áreas: **Emoções, concentração, comportamento ou na relação com outras pessoas?** (assinale com x)

- Não.....
- Sim, dificuldades pequenas.....
- Sim, dificuldades grandes.....
- Sim, dificuldades muito grandes....

Se respondeu «sim», por favor responda às seguintes questões sobre essas dificuldades:

1 – Há quanto tempo existem essas dificuldades?

- Menos de 1 mês
- 1 a 5 meses
- 6 a 12 meses
- Mais de 1 ano

2 – Essas dificuldades incomodam ou fazem sofrer o seu filho/a?

- Nada
- Pouco
- Muito
- Imenso

3 - Essas dificuldades perturbam o dia a dia do seu filho/a nas seguintes áreas?

3.1 – Em casa

- Nada
- Pouco
- Muito
- Imenso

3.2 – Com os amigos

- Nada
- Pouco
- Muito
- Imenso

3.3 – Na aprendizagem na escola

- Nada
- Pouco
- Muito
- Imenso

3.4 – Nas brincadeiras e nos tempos livres

- Nada
- Pouco
- Muito
- Imenso

4 – Essas dificuldades são uma sobrecarga para si ou para a família?

- Nada
- Pouco
- Muito
- Imenso

Assinatura... / Data.../ Mãe/pai/outro (por favor indique quem respondeu):

MUITO OBRIGADA PELA SUA COLABORAÇÃO

ANEXO 3 – ORGANIZAÇÃO DO SDQ-Por

COTAÇÃO DO QUESTIONÁRIO DE CAPACIDADES E DIFICULDADES (SDQ-Por) - VERSÃO DE PAIS/ PROFESSORES

Os 25 itens que constituem o SDQ, estão organizadas em 5 escalas, cada uma composta por 5 itens. Geralmente é mais fácil cotar as 5 escalas, antes de calcular a pontuação total de dificuldades.

Cada item tem, como referimos, 3 opções de resposta:

- Não é verdade
- É um pouco verdade
- É muito verdade

A opção «é pouco verdade» é sempre cotada com 1. Cada uma das outras 2 opções pode ser cotada com 0 ou 2 pontos, conforme o item, tal como é apresentado no quadro da página seguinte, escala por escala.

A pontuação total de cada uma das 5 escalas pode variar entre 0 e 10, se os 5 itens tiverem sido todos respondidos. O resultado de cada escala pode ser considerado desde que, pelo menos 3 itens tenham sido respondidos.

COTAÇÃO DO QUESTIONÁRIO DE CAPACIDADES E DIFICULDADES (SDQ-Por) - VERSÃO DE PAIS/ PROFESSORES¹⁵⁴	Não	Às vezes	Sim
ESCALA DE SINTOMAS EMOCIONAIS			
Queixa-se frequentemente de dores de cabeça, dores de barriga ou vômitos	0	1	2
Tem muitas preocupações, parece sempre preocupado/a	0	1	2
Anda muitas vezes triste, desanimado/a ou choroso/a	0	1	2
Em situações novas é receoso/a, muito agarrado/a e pouco seguro/a	0	1	2
Tem muitos medos, assusta-se com facilidade	0	1	2
ESCALA DE PROBLEMAS DE COMPORTAMENTO			
Enerva-se muito facilmente e faz muitas birras	0	1	2
Obedece com facilidade, faz habitualmente o que os adultos lhe mandam	2	1	0
Luta frequentemente com as outras crianças, ameaça-as ou intimida-as	0	1	2
Mente frequentemente ou engana	0	1	2
Rouba em casa, na escola ou em outros sítios	0	1	2
ESCALA DE HIPERACTIVIDADE			
É irrequieto, muito mexido e nunca está quieto	0	1	2
Não sossega. está sempre a mexer as pernas ou as mãos	0	1	2
Distrai-se com facilidade, está sempre com a cabeça no ar	0	1	2
Pensa nas coisas antes de as fazer	2	1	0
Geralmente acaba o que começa, tem uma boa atenção	2	1	0
ESCALA DE PROBLEMAS DE RELACIONAMENTO COM OS COLEGAS			
Tem tendência a isolar-se, gosta mais de brincar sozinho/a	0	1	2
Tem pelo menos um bom amigo/uma boa amiga	2	1	0
Em geral as outras crianças gostam dele/a	2	1	0
As outras crianças metem-se com ele/a, ameaçam-no/a ou intimidam-no/a	0	1	2
Dá-se melhor com adultos do que com outras crianças	0	1	2
ESCALA DE COMPORTAMENTO PRÓ-SOCIAL			
É sensível aos sentimentos dos outros	0	1	2
É Partilha facilmente com as outras crianças (guloseimas, brinquedos, lápis, etc)	0	1	2
Gosta de ajudar se alguém está magoado, aborrecido ou doente	0	1	2
É simpático/a e amável com crianças mais pequenas	0	1	2
Sempre pronto a ajudar os outros (pais professores ou outras crianças)	0	1	2

154

1 - Pontuação total de dificuldades

A pontuação total de dificuldades é obtida pela soma da pontuação total de todas as escalas, com excepção da escala pró-social. Deste modo a pontuação resultante pode variar entre zero e 40 (e não pode ser computado caso a pontuação de alguma das escalas, excepto a pró-social, esteja ausente).

2 - Interpretação da pontuação dos sintomas e definição de «caso»

Os intervalos provisórios, apresentados em baixo, foram estabelecidos de tal forma que, aproximadamente 80% das crianças na comunidade são normais, 10% são limítrofes e 10% apresentam desvios da normalidade. Em estudos com amostras de alto risco, onde os falsos positivos não constituam a maior preocupação, os possíveis «casos» podem ser identificados por uma pontuação alta ou limítrofe, em uma das quatro escalas de dificuldades. Em estudos com amostras de baixo risco, onde é mais importante reduzir a taxa de falsos positivos, os possíveis «casos para estudo» podem ser identificados por uma pontuação alta em uma das quatro escalas de dificuldades.

PREENCHIDO PELOS PAIS	NORMAL	LIMÍTROFE	ANORMAL
Pontuação total das dificuldades	0-13	14-16	17-40
Pontuação dos sintomas emocionais	0-3	4	5-10
Pontuação de problemas de comportamento	0-2	3	4-10
Pontuação para hiperactividade	0-5	6	7-10
Pontuação para problemas com colegas	0-2	3	4-10
Pontuação para comportamento pró-social	6-10	5	0-4
PREENCHIDO PELO PROFESSOR/A			
Pontuação total das dificuldades	0-11	12-15	16-40
Pontuação dos sintomas emocionais	0-4	5	6-10
Pontuação de problemas de comportamento	0-2	3	4-10
Pontuação para hiperactividade	0-5	6	7-10
Pontuação para problemas com colegas	0-3	4	5-10
Pontuação para comportamento pró-social	6-10	5	0-4

3 - Pontuação e interpretação do impacto

Quando é usada a versão de SDQ que inclui o «suplemento de impacto», os itens relativos ao sofrimento global e às dificuldades sociais podem ser somados para se obter a pontuação do impacto, que pode variar entre zero e 10 na versão para pais e entre 0 e 6 na versão para professores.

	NADA	POUCO	MUITO	IMENSO
AVALIAÇÃO DOS PAIS				
As dificuldades incomodam/ fazem sofrer a criança	0	0	1	2
Interferem em casa	0	0	1	2
Interferem com os amigos	0	0	1	2
Interferem na aprendizagem na escola	0	0	1	2
Interferem nas brincadeiras/ tempos livres	0	0	1	2
AVALIAÇÃO DO PROFESSOR				
As dificuldades incomodam/ fazem sofrer a criança	0	0	1	2
Interferem com os colegas	0	0	1	2
Interferem na aprendizagem na escola	0	0	1	2

As respostas às questões sobre cronicidade e sobrecarga para os outros não são incluídas na cotação de impacto. Quando os entrevistados tiverem respondido «não» à primeira questão do suplemento de impacto (i.e. quando não se considerarem como tendo alguma dificuldade emocional ou de comportamento), não deverão responder às questões sobre sofrimento ou dificuldades e, nestas circunstâncias, a pontuação do impacto será automaticamente zero.

Uma pontuação total do impacto igual ou maior do que 2 é anormal, uma pontuação de 1 é limítrofe e uma pontuação de zero é normal.

ANEXO 4 – PROJECTO DE ESTUDO SUBMETIDO À CNPD

Projecto de estudo - Criopreservação embrionária e neurodesenvolvimento infantil

(Effect of cryopreservation of embryos on developmental outcome)

1.1 – Área científica principal – Bioética

1º Curso de Doutoramento em Bioética

Universidade Católica Portuguesa – Lisboa

1.2 – Áreas científicas secundárias

- Neurociências
- Medicina da Reprodução
- Prática clínica baseada na evidência

1.3 - Autoria - Célia Francisca Iglésias Batista Neves

Documentos em anexo

A - Sinopse do estudo

B - Descrição sucinta dos objectivos e metodologia do estudo com o impresso de consentimento informado, segundo o modelo que será entregue aos pais ou seus representantes legais.

C – Modelo de história clínica que idealmente irá ser colectada para cada participante no estudo.

D – Descrição sucinta do método psicométrico de Ruth Griffiths ® e do Inventário do Comportamento da Criança para Pais (ICCP)¹⁵⁵

¹⁵⁵ Posteriormente optou-se pelo SDQ-Por facto esse que não introduziu qualquer necessidade de revisão do pedido, tanto mais que este instrumento é de utilização gratuita.

A – SINOPSE DO ESTUDO APRESENTADA E APROVADA PELA CNPD



UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA

BIOÉTICA

**CRIOPRESERVAÇÃO EMBRIONÁRIA E
NEURODESENVOLVIMENTO INFANTIL**

Célia Francisca Iglésias Batista Neves

Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa (UCP) no cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Bioética, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Daniel Serrão, Docente Emérito da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e da UCP. 2014

CRONOGRAMA

Estando a autora deste projecto na fase final da elaboração da dissertação sobre «CRIOPRESERVAÇÃO EMBRIONÁRIA E NEURODESENVOLVIMENTO INFANTIL» vem por este meio confirmar o seu desejo de a concluir no presente ano lectivo (2013-2014) e dar conhecimento da sua estrutura conforme foi solicitado pelo Coordenador Científico.

PREÂMBULO

Esta dissertação reúne um conjunto de reflexões e estudos realizados pela autora, no âmbito do Programa de Doutoramento em Bioética, apresentado à Universidade Católica Portuguesa (UCP) e realizado sob a orientação do Professor Doutor Daniel Serrão, docente emérito da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e da UCP.

O presente trabalho, como o seu título ilustra, foi idealizado e desenvolvido, com o intuito de melhor conhecer o neurodesenvolvimento de crianças cujos embriões foram criopreservados e promover a discussão crítica, dum possível impacto das técnicas de procriação medicamente assistida (PMA), sobre a integridade e desenvolvimento do ser humano em início de vida e consequentemente sobre o futuro da nossa espécie.

O objectivo central foi investigar o neurodesenvolvimento de crianças entre os 18 meses e os oito anos, comparando grupos de crianças concebidas umas naturalmente e outras com recurso à PMA sendo que algumas estiveram submetidas a criopreservação na sua fase embrionária. Os resultados encontrados na avaliação dos vários grupos de crianças, usando um conjunto de instrumentos com reconhecida especificidade para a obtenção do resultado pretendido, foram relacionados à existência ou não de processos de criopreservação embrionária, que os pudessem ter condicionado. Na prática, recorreu-se à anamnese clínica complementada pelo recurso a instrumentos.

Na avaliação psicométrica foi utilizada a versão portuguesa das Escalas de Desenvolvimento Mental de Ruth Griffiths (EDMG - a que aludiremos no texto). Apesar da autora deste estudo se encontrar reconhecida¹⁵⁶ para a aplicação das EDMG, entendeu como mais adequado minimizar um eventual mas importante viés, e recorreu a uma profissional especializada na utilização do instrumento. A Mestre Dr^a Lília Brito, experiente psicóloga na

¹⁵⁶ A «Association for Research in Infant and Child Development» (ARICD) supervisiona e assegura que a utilização das EDMG, seja feita apenas por profissionais com formação específica (<http://www.aricd.org.uk/about-the-griffiths-scales/>).

área do desenvolvimento infantil, fez todas as avaliações e pode actuar de forma cega, visto desconhecer os objectivos da investigação.

Complementou-se a avaliação com o Inventário de Competências Sociais e de Problemas do Comportamento em crianças (Child Behavior Checklist - CBCL) originalmente criado por Thomas Achenbach nos Estados Unidos da América e revisto pelo autor em 1991 mas disponível na versão portuguesa adaptada por Fonseca et al. em 1994, em que o inventário destinado a pais passou a designar-se por «Inventário do Comportamento da Criança para Pais (ICCP)¹⁵⁷».

Embora já exista alguma investigação sobre factores de risco da PMA e da criopreservação embrionária, e tenha sido publicada uma importante **meta análise em 2013** (Michele Hansen, Jennifer J. Kurinczuk, Elizabeth Milne, Nicholas de Klerk, and Carol Bower. Assisted reproductive technology and birth defects: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*. Vol.19, No.4 pp.330-354, 2013), sentimos que a informação ainda é escassa e que é possível ir um pouco mais longe, nomeadamente na avaliação do neurodesenvolvimento das crianças submetidas a tais técnicas. O estudo realizado e revisto após a publicação da supracitada meta análise, propôs-se contribuir para a avaliação do resultado de técnicas cada vez mais divulgadas mas, de efeitos pouco conhecidos. Pretendeu-se igualmente promover a defesa do embrião humano chamando a atenção para a necessidade e o direito a um estatuto ético jurídico, à semelhança de outros autores, que nos inspiraram e motivaram para a realização deste trabalho.

Esta dissertação está organizada em três partes principais que integram vários capítulos:

Na Parte 1 é apresentado um resumo do projecto de investigação e, na Parte 2 é feita a fundamentação teórica do tema em estudo englobando aspectos médicos, socio-jurídicos e bioéticos. A Parte 3 integrou a parte empírica e de contribuição pessoal.

A vertente direccionada à Medicina da Reprodução, ocupou a maior parte do estudo exploratório, focado nas etapas da PMA e é composto por uma revisão da literatura acerca das variáveis em estudo e a formulação das principais hipóteses de investigação. Aspectos do neurodesenvolvimento humano e os instrumentos psicométricos utilizados na avaliação das crianças estudadas também foram descritos. A existência de índices bibliográficos de literatura científica e técnica, bem como de revisões internacionais disponibilizadas e facilmente acedíveis

¹⁵⁷ Idem 142

«on-line», em locais de referência (Medline, Pubmed e Cochrane entre os principais)¹⁵⁸ proporcionou uma significativa economia temporal e um notável auxílio à investigação.

Na Parte 3 é exposta toda a parte prática e teórico-prática utilizada no âmbito da investigação. São referidos os métodos de recrutamento dos grupos de estudo e é feita a caracterização das amostras utilizadas. A descrição dos instrumentos de avaliação e dos procedimentos estatísticos utilizados, foi realizada e foi também referida a validação psicométrica das versões portuguesas das Escalas de Desenvolvimento Mental de Ruth Griffiths (EDMG) e do Inventário do Comportamento da Criança para Pais (ICCP).

A discussão, foi precedida pela apresentação em texto e em tabelas dos resultados encontrados e pretendeu contribuir para a avaliação do efeito das técnicas de criopreservação embrionária sobre o neurodesenvolvimento infantil. No final, são enunciados os principais resultados obtidos, quer próprios quer comparados de uma forma integrada.

Após a conclusão que ocupou a Parte 4 deste trabalho, mencionaram-se as referências bibliográficas e anexos, onde se incluem dados sobre os instrumentos de avaliação psicométrica utilizados.

Concluindo, salientamos que, paralelamente à difícil decisão de aderir ou não ao acordo ortográfico, procuramos utilizar uma linguagem acessível e assente nos princípios gerais que orientam a redação de trabalhos científicos.

B - DESCRIÇÃO SUCINTA DOS OBJECTIVOS E METODOLOGIA DO ESTUDO E ANEXO DO IMPRESSO DE CONSENTIMENTO INFORMADO, SEGUNDO O MODELO QUE SERÁ ENTREGUE AOS PAIS OU SEUS REPRESENTANTES LEGAIS.

¹⁵⁸ MEDLINE - é uma base de dados da literatura médica e biomédica, produzida pela NLM (National Library of Medicine, USA) e que contém referências bibliográficas e resumos de mais de 6.000 títulos de revistas publicadas nos USA e em mais de 70 países. Contem referências desde 1966 e a sua actualização é mensal.

Biblioteca Cochrane - está integrada no Portal de Evidências da BVS. Possui informação atualizada sobre medicina baseada na evidência, incluindo a Base de Dados Cochrane de Revisões Sistemáticas preparadas pelos Grupos da Colaboração Cochrane.

SciELO - Scientific Electronic Library Online - é um projeto seguindo o modelo de Open Access, que disponibiliza de modo gratuito, os textos completos dos artigos de mais de mil revistas científicas Ibero Americanas.

Numa primeira fase, foi solicitada autorização à Comissão Nacional de Protecção de Dados assim como aos próprios indivíduos de maior idade, envolvidos neste estudo. Nos pedidos de autorização e participação foi integrada informação, elaborada com o intuito de esclarecer os participantes dos objectivos do estudo e obter da sua parte um comprovativo do seu consentimento informado..

A história clínica e a respectiva colheita dos dados, foi feita sempre e só pela autora do estudo, que é licenciada em Medicina e se encontra inscrita na Ordem dos Médicos com o número 28846. Os participantes no estudo foram recrutados maioritariamente entre os seus utentes habituais já que a investigadora possui a especialidade de Pediatria. Não foram consultados processos clínicos institucionais. Os dados demográficos e relativos às técnicas de PMA, inscritos no estudo limitaram-se aqueles que eram conhecidos dos participantes ou constavam dos seus documentos pessoais.

ANEXO 5 - MODELO DO CONSENTIMENTO INFORMADO

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

(ETHICAL STATEMENT

The author has indicated that, in defense of ethics, all infants and their families in this study are anonymous and patients were not randomized.

There were not financial relationships relevant to this article to disclose.)

[Conforme a “Declaração de Helsínquia” da Associação Médica Mundial (Helsínquia 1964; Tóquio 1975; Veneza 1983; Hong-kong 1989, Somerset West 1996, Edimburgo 2000, Tóquio 2004, Seul 2008)]

INFORMAÇÃO PARA PARTICIPAR EM PROJECTO DE INVESTIGAÇÃO

1 – Título do projecto: criopreservação embrionária e neurodesenvolvimento infantil

(Effect of cryopreservation of embryos on developmental outcome)

1.1 – Área científica principal – Bioética

1.2 – Áreas científicas secundárias

- Neurociências
- Medicina da Reprodução
- Prática clínica baseada na evidência

2 – Autoria - Célia Francisca Iglésias Batista Neves

1º Curso de Doutoramento em Bioética

Universidade Católica Portuguesa – Lisboa

Este projecto de investigação tem como objectivo identificar factores de êxito e de risco associados aos processos e técnicas de Procriação Medicamente Assistida (PMA) na perspectiva do pediatra.

Pretende-se, fazer uma avaliação comparada do desenvolvimento psico-motor de crianças com idade entre um e seis anos nascidas por processo natural e por recurso a PMA. Para além da recolha e análise dos dados fornecidos pelos pais ou presentes nos boletins de saúde infantil de que são titulares, faremos a avaliação do desenvolvimento das crianças integradas neste estudo, utilizando a avaliação clínica e o método de Ruth Griffiths. Este instrumento psicométrico consiste numa bateria de testes padronizados e maioritariamente aferidos para a população portuguesa e internacionalmente reconhecida. A aplicação dos testes será feita por uma psicóloga com muita experiência nesta área e que, para potenciar a total isenção do seu trabalho, intencionalmente nada saberá sobre os antecedentes familiares e pessoais das crianças, até ao fim da investigação.

As informações acerca da gravidez e da saúde da(o) sua/seu filho(a) serão para nós, fundamentais. Mesmo conservando os dados totalmente anónimos, poderemos vir a identificar factores de êxito ou de risco, associados às técnicas de PMA e, ao mesmo tempo proporcionaremos uma avaliação útil e isenta de encargos, sobre o desenvolvimento do(s) seu(s) filho(a, os, as).

Eu, abaixo assinado,

Compreendi os objectivos do estudo que se vai realizar e foi-me dada a oportunidade de tirar quaisquer dúvidas relacionadas. Tomei conhecimento que a informação recebida, versou os objectivos, os métodos, os benefícios previstos e que será assegurada a máxima confidencialidade dos dados. As circunstâncias do nascimento permanecerão sempre confidenciais, nos termos que a lei exige, e foram-me fornecidos todos os contactos para que posteriormente possa modificar ou actualizar os dados.

A minha identidade assim como a do meu filho nunca serão associadas a nenhum dos grupos estudados e, só será divulgada se eu assim o entender, para fins de agradecimento.

Naquelas circunstâncias, aceito participar neste estudo, autorizando que o meu filho realize uma avaliação profissional e possa ser futuramente contactado(a) para prestar informação médica relativa ao seu desenvolvimento.

Local-----dia/mês-----ano-----

Assinatura-----

Pelos investigadores responsáveis

Assinatura-----

ANEXO 6 - MODELO DA HISTÓRIA CLÍNICA

Nome _____

Morada _____

Data e local de nascimento _____

Constituição do agregado familiar

Pais coabitantes sim/não

Idade, profissão e grau académico da mãe

Idade, profissão e grau académico do pai

Sexo e idade dos irmãos

CONCEPÇÃO SEM INTERVENÇÃO MÉDICA PROCRIAÇÃO MEDICAMENTE ASSISTIDA (PMA) INFERTILIDADE CAUSA MATERNA INFERTILIDADE CAUSA PATERNA AMBOS/MISTA DESCONHECIDO PMA 1 - FIV COM TRANSFERÊNCIA A FRESCO

A – Homólogo; B – Homólogo. ICSI; C – Sémen heterólogo; D – Ovócitos heterólogos;

E - Ambos heterólogos

PMA 2 – EMBRIÃO CONGELADO

A – Homólogo; B – Homólogo. ICSI; C – Sémen heterólogo; D – Ovócitos heterólogos;

E - Ambos heterólogos

ANTECEDENTES FAMILIARES

Mãe

Patologia da gravidez

Pai

Irmãos

Outros

ANTECEDENTES PESSOAIS

I.G. Parto: Eutócico Fórceps Ventosa Cesariana

Período pós-natal: I.A.1'= 5'=

PN = C = PC =
Patologia malformativa sim não desconhecido
Infecção neonatal: Não Sim Desconhecida

Tipo

Encefalopatia Não Sim Desconhecida

Tipo:

Convulsões Não Sim Desconhecida

Ap. respiratório: Ventilação Não Sim N°de dias

Ap. Cardio-vascular: Cardiopatia Não Sim Desconhecida

Ap. Gastro-Intestinal: patologia Não Sim Desconhecida

Ap. Genito-urinário: patologia Não Sim Desconhecida

Doença metabólica: Não Sim Desconhecida

DOENÇA NEUROLÓGICA:

Déficit cognitivo Não Sim Desconhecido

Alterações da linguagem e/ou da comunicação

Não Sim Desconhecido

Alterações comportamentais Não Sim Desconhecido

Deficiência motora Não Sim Desconhecido

Deficiência sensorial Não Sim Desconhecido

Tipo

Alteração da sensibilidade Não Sim Desconhecido

Alteração do equilíbrio Não Sim Desconhecido

TERAPÊUTICAS EM CURSO

Farmacológica

Medicina física e reabilitação Sim Não Desconhecido

Outras Não Sim Desconhecido

Estabelecimento de ensino que frequenta

Necessidades educativas especiais Não Sim Desconhecido

D - Descrição sucinta do método psicométrico de Ruth Griffiths ® e do Inventário do Comportamento da Criança para Pais (ICCP)¹⁵⁹

Na escolha dos instrumentos para avaliação do neurodesenvolvimento infantil encontramos oferta suficiente mas, perante a exigência de aferição para a população portuguesa verificámos que o repositório de instrumentos de avaliação existente é mais escasso quando é dirigido às crianças mais jovens.

Para crianças em idade pré escolar e depois de analisados vários instrumentos, optámos pelas «**Escalas de Desenvolvimento Mental de Ruth Griffiths**» (EDMG), que foram concebidas pela reconhecida psicóloga britânica Ruth Griffiths e são um instrumento psicométrico composto por vários testes destinados a crianças desde o nascimento até aos 8 anos (ou desenvolvimento equiparável). Ao longo do texto teremos oportunidade de desenvolver este tema mas antecipamos que a célebre «*Abilities of Babies 0- 2 years*», foi publicada pela primeira vez em 1954 e só posteriormente e em 1970 se lhe seguiu a escala «*Abilities of Young Children*»¹⁶⁰. Ambas as escalas das EDMG foram desenvolvidas em Inglaterra, mas têm sido validadas, e adaptadas, em diversos países onde são muito usadas na avaliação do desenvolvimento infantil.

Resolvido o problema da avaliação do desenvolvimento cognitivo e motor na perspectiva das capacidades intelectuais e neuro sensoriais, sentimos que outros aspectos do desenvolvimento mais ligados ao comportamento podiam estar a ser descuidados ou sub avaliados. Para avaliação de desvios do comportamento neste grupo etário recorreremos por isso a um instrumento auxiliar e escolhemos um muito conhecido, extensamente aplicado em trabalhos de investigação internacionais e validado para a população portuguesa, que é o «*Child Behavior Checklist* » [(CBCL) de Achenbach(1991)]

¹⁵⁹ Idem 142

¹⁶⁰ A practitioner's guide to the Assessment of Mental Development in Infants and Young Children. P. Preston 2006: ISBN 0-88937-296-9, Publishers: Hogrefe.

ESCALAS DE DESENVOLVIMENTO MENTAL DE RUTH GRIFFITHS

As «Escala de Desenvolvimento Mental de Ruth Griffiths» (EDMG), são a base do método criado por Ruth Griffiths para avaliação do desenvolvimento infantil. A «Association for Research in Infant and Child Development» (ARICD) supervisiona e assegura que a utilização, seja feita por psicólogos e pediatras do desenvolvimento, a quem é exigida formação específica (consultar ARICD website).

As EDMG identificam as áreas melhor ou pior desenvolvidas, quantificando os desvios padrão relativamente à média do grupo etário porque a bateria de testes possui várias sub-escalas, com itens ordenados sequencialmente que permite estabelecer o perfil de desenvolvimento duma criança e orientar a intervenção.

Entre o nascimento e os dois anos a avaliação é feita a partir de cinco sub-escalas que são:

A – Locomoção/ Desenvolvimento motor: avalia a motricidade global incluindo o equilíbrio, a coordenação e o controle dos movimentos.

B - Desenvolvimento pessoal –social: avalia as competências sociais ao nível da autonomia e a capacidade de interacção com os cuidadores e os pares.

C – Audição/ Linguagem: avalia a linguagem receptiva e expressiva.

D - Coordenação olho-mão: avalia a motricidade fina, a destreza manual e as competências visuo-motoras.

E - Realização (performance): avalia as capacidades visuo-espaciais, incluindo a rapidez de execução e precisão.

Quando em 1970, foi publicada uma 2ª versão das Escalas de Desenvolvimento Mental de Ruth Griffiths, com uma extensão para a faixa etária dos 2-8 Anos, conservou-se a estrutura original mas foi acrescentada uma 6ª subescala:

F – Raciocínio Prático (somente contida na escala para os 2-8 anos) que avalia a capacidade da criança resolver problemas práticos, ordenar sequências e a forma como faz a abordagem de questões morais.

Tem havido actualizações periódicas das EDMG e, em 1996, foi publicada uma revisão para o grupo etário do nascimento aos dois anos (Birth to 2 years Scales) da responsabilidade do Dr Michael Huntley (anterior psicólogo responsável do *Wolfson*

Centre, Institute of Child Health, em Londres) que levou a efeito uma revisão completa e uma padronização das escalas, juntando oito novos itens ao equipamento e revendo igualmente os boletins de registo das observações. Seguidamente, foi revista a EDMG (2-8 anos) e feita a sua aferição com crianças das ilhas britânicas. Em Maio de 2006, a versão alargada e re-padronizada das antigas escalas (Griffiths 2-8 year Scales the GMDS-ER no original inglês) foi publicada em língua inglesa (Extended Revised Scales, Luiz, Barnard, Knoesen, Kotras, Burns, Faragher & Challis, 2006) juntamente com a análise estatística das ilhas britânicas. As GMDS-ER integram algumas mudanças aos itens anteriores e todas as alterações introduzidas, estão perfeitamente descritas nos manuais dos novos equipamentos.

Em Portugal, ainda são muito usadas tabelas de normas britânicas, mas prosseguem estudos que visam a sua validação e melhor adequação à população portuguesa. As primeiras edições em língua portuguesa das duas escalas [EDMG (0-2 anos) e (2-8 anos)] foram publicadas, em 2007 e em 2008 respectivamente. (Patrícia Borges, Inês Pessoa e Costa, Carlota Themudo Ferreira, Iolanda Gil, Inês Carvalhão, Solange Fernandes e Manuela Veríssimo. Escalas de Desenvolvimento Mental de Ruth Griffiths – Adaptação para a população portuguesa. Actas do 12º Colóquio de Psicologia e Educação. Olhares contemporâneos através da investigação e da prática – pag. 922-932 - ISPA 1.ª EDIÇÃO: JUNHO DE 2012).

Concluimos a justificação da nossa escolha, corroborando as palavras do grupo de trabalho português que publicou em 2012 um estudo sobre educação aprendizagem e desenvolvimento em que citou que «as EDMG... têm-se revelado de grande interesse clínico na avaliação do desenvolvimento, no diagnóstico e no aconselhamento educacional e terapêutico de crianças em situação de risco de desvios do desenvolvimento, sendo também utilizadas em diversos trabalhos de investigação»¹⁶¹.

¹⁶¹ In <http://hdl.handle.net/10400.12/1608> de L. Mata, F. Peixoto, J. Morgado, J. C. Silva & V. Monteiro (Eds.), Actas do 12.º Colóquio Internacional de Psicologia e Educação: educação, aprendizagem e desenvolvimento: Olhares contemporâneos através da investigação e da prática (pp. 922-932). Lisboa: ISPA - Instituto Universitário]

Inventário do Comportamento da Criança para Pais (ICCP)

Achenbach criou nos Estados Unidos da América em 1984, o Inventário de Competências Sociais e de Problemas do Comportamento para crianças e adolescentes (Child Behavior Checklist - CBCL) que se destina a avaliar comportamentos problemáticos entre os 4 e os 18 anos. A CBCL foi revista em 1991 pelo próprio autor que estabeleceu uma nova versão. Este inventário constitui um auxiliar clínico muito utilizado a nível internacional (Fonseca et. al., 1995) e pode ser respondido pelos pais ou pelos professores da criança em questão. Há uma versão que pode ser preenchida pela própria criança a partir de certa idade, o que revela a preocupação do autor em avaliar os problemas de comportamento infantil na perspectiva dos diversos informantes (ver Achenbach, 1991a, 1991b).

O inventário de Achenbach na versão original é constituído por duas partes distintas. Há uma primeira parte que inclui 13 itens de resposta livre que são cotados de forma qualitativa. Os primeiros itens do inventário dizem respeito à relação do professor com o aluno bem como ao desempenho deste. A segunda parte do questionário possui 120 frases (itens) dirigidas a problemas de comportamento. Nesta segunda parte 118 itens descrevem problemas verificáveis no grupo etário a que o inventário se dirige e alterações específicas do comportamento infantil consideradas problemáticas pelos pais e ainda 2 itens de resposta aberta destinados a fornecer informação sobre problemas que possam estar em falta no questionário (Achenbach, 1991).

Os vários itens são cotados de 0 a 2 de acordo com uma escala de resposta em que:

- 0 = Não Verdadeiro
- 1 = Às Vezes Verdadeiro
- 2 = Muitas Vezes Verdadeiro

A versão revista em 1991 foi adaptado à população portuguesa por Fonseca, A. C., Simões, A., Rebelo, J. A., Ferreira, J. A. A., & Cardoso, F. (1994).¹⁶² e nesta

¹⁶² Fonseca, A. C., Simões, A., Rebelo, J. A., Ferreira, J. A. A., & Cardoso, F. (1994). Um inventário de competências sociais e de problemas de comportamento em crianças e adolescentes. O Child Behavior Checklist de Achenbach (CBCL). *Psychologica*, 12, 55-78.

versão nacional o inventário destinado a pais passou a designar-se por «Inventário do Comportamento da Criança para Pais (ICCP)».

No presente estudo, não foi utilizada a parte destinada a professores e educadores por razões várias mas sobretudo de acessibilidade. Só foi utilizada a segunda parte do instrumento a qual se manteve inalterada.

ANEXO 7 – AUTORIZAÇÃO 3616/15 DA CNPD



Processo N.º 13846/2014 | 2

k

Os destinatários são ainda informados sobre a natureza facultativa da sua participação e garantia de confidencialidade no tratamento, caso decidam participar, recolhendo responsável o seu consentimento informado para o efeito.

II. Análise

A CNPD já se pronunciou na sua Deliberação n.º 227/2007 sobre o enquadramento legal, os fundamentos de legitimidade, os princípios orientadores para o correto cumprimento da LPD, bem como as condições gerais aplicáveis ao tratamento de dados pessoais para a finalidade de estudos de investigação na área da saúde.

Porque em grande parte referentes à vida privada e também à saúde, os dados recolhidos pela requerente têm a natureza de sensíveis, nos termos do disposto no n.º 1 do artigo 7.º da LPD.

Em regra, o tratamento de dados sensíveis é proibido, de acordo com o disposto no n.º 1 do artigo 7.º da LPD. Todavia, nos termos do n.º 2 do mesmo artigo, o tratamento de dados da vida privada e de saúde é permitido, quando haja uma disposição legal que consagre esse tratamento de dados, quando por motivos de interesse público importante o tratamento for indispensável ao exercício das atribuições legais ou estatutárias do seu responsável ou quando o titular dos dados tiver prestado o seu consentimento.

Não estando preenchidas as duas primeiras condições de legitimidade, o fundamento de legitimidade só pode basear-se no consentimento dos titulares dos dados ou dos representantes legais, quando os titulares dos dados sejam incapazes.

Assim, é necessário o «consentimento expresso do titular», entendendo-se por consentimento qualquer manifestação de vontade, livre, específica e informada, nos termos da qual o titular aceita que os seus dados sejam objeto de tratamento (cf. artigo 3.º, alínea *h*), da LPD), o qual deve ser obtido através de uma "declaração de consentimento informado" onde seja utilizada uma linguagem clara e acessível.



Processo N.º 13846/2014 | 3

/

Nos termos do artigo 10.º da LPD, a declaração de consentimento tem de conter a identificação do responsável pelo tratamento e a finalidade do tratamento, devendo ainda conter informação sobre a existência e as condições do direito de acesso e de retificação por parte do respetivo titular.

No caso de participantes menores, terá de haver consentimento a prestar pelos representantes legais. Impõe-se, ainda, que a criança seja ouvida e em função da idade, nos termos da lei, ela própria preste a sua anuência à recolha de dados pessoais para participação no estudo. O estudo deve ter em conta o superior interesse da criança.

Os titulares dos dados, de acordo com a declaração de consentimento informado junta aos autos, apõem as suas assinaturas na mesma, deste modo satisfazendo as exigências legais.

Cabe ao Investigador assegurar a confidencialidade dos dados pessoais e da informação tratada, conforme o estatuído na alínea *g*) do artigo 10.º da Lei n.º 21/2014, de 16 de abril (Lei da investigação clínica).

A responsável declarou a existência de comunicação de dados a terceiros, mas apenas são transmitidos dados anonimizados, pelo que aquela não se verifica.

A informação tratada é recolhida de forma lícita (artigo 5.º, n.º1 alínea *a*) da Lei n.º 67/98), para finalidades determinadas, explícitas e legítimas (cf. alínea *b*) do mesmo artigo) e não é excessiva.

O fundamento de legitimidade é o consentimento expresso do titular dos dados.

III. Conclusão



Assim, nos termos das disposições conjugadas do n.º 2 do artigo 7.º, n.º 1 do artigo 27.º, alínea *a*) do n.º 1 do artigo 28.º e artigo 30.º da Lei de Protecção de Dados, com as condições e limites fixados na referida Deliberação n.º 227/2007, que se dão aqui por reproduzidos e que fundamentam esta decisão, autoriza-se o tratamento de dados *supra* referido, consignando-se o seguinte:

Responsável pelo tratamento: Célia Francisca Iglésias Batista Neves;

Finalidade: estudo "Criopreservação Embrionária e Neurodesenvolvimento Infantil";

Categoria de Dados pessoais tratados: código do participante; género; história clínica; características da PMA; tempo de gestação; tipo de parto; patologia perinatal; doenças infantis; problemas de desenvolvimento; terapêuticas em curso; Escalas de Desenvolvimento Mental de Ruth Griffiths; Inventário de Competências Sociais e de Problemas de Comportamento em Crianças.

Em relação aos pais adultos: recurso/não recurso a tratamentos de PMA; tempo de gestação; condições do parto; número de filhos; profissão; dados académicos.

Entidades a quem podem ser comunicados: Não há.

Formas de exercício do direito de acesso e retificação: Junto da responsável.

Interconexões de tratamentos: Não há.

Transferências de dados para países terceiros: Não há.

Prazo de conservação: A chave de codificação dos dados do titular deve ser destruída um mês após o fim do estudo.

Dos termos e condições fixados na Deliberação n.º 227/ 2007 e na presente Autorização decorrem obrigações que o responsável deve cumprir. Deve, igualmente, dar conhecimento dessas condições a todos os intervenientes no circuito de informação.

Lisboa, 17 de abril de 2015

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Filipa', is written over a horizontal line.

Filipa Calvão (Presidente)

ANEXO – 8

PEDIDO- «POR RESPEITO AO VOSSO ESPAÇO»

2009/9/13 Célia Iglésias Neves <celiaiglesiasneves@hotmail.com>

Caros responsáveis da Associação Portuguesa de Fertilidade,

Sou pediatra na Maternidade Dr. Alfredo da Costa (inscrição na Ordem dos Médicos número 28846) e tenho pela vossa Associação uma grande simpatia que tem sido potenciada pelos membros que entretanto se foram tornando pais e não esquecem o apoio que receberam.

Estou a frequentar um curso de doutoramento em Bioética na Universidade Católica e gostaria de entrar em contacto com frequentadores da vossa página, tendo por objectivo ouvir as suas opiniões anónimas (on-line) sobre o estatuto do embrião e a problemática dos embriões excedentários...

Percebo que o acesso ao "blog" e outros "links" é livre mas, sentir-me-ia a desrespeitar o vosso espaço se não vos pedisse autorização para o fazer.

Antecipadamente grata por uma resposta

Subscrevo-me com consideração

Célia Iglésias Neves

RESPOSTA - Re: Por respeito ao vosso espaço

From: **apfertilidade@gmail.com** on behalf of **Associação Portuguesa Fertilidade**
(geral@apfertilidade.org)

Sent: Wednesday, September 16, 2009 9:41:55 AM

To: Célia Iglésias Neves (celiaiglesiasneves@hotmail.com)

"Prezada Dra. Célia Iglésias Neves,

Muito obrigado pelo seu contacto. Antes de tudo, apraz-nos saber que está a desenvolver uma investigação sobre um assunto tão intimamente relacionado com a PMA. O tem em particular é de facto de alguma complexidade e foi, até historicamente, um dos aspectos que mais dificuldades criou na construção do efíquio legislativo que vem regulando a PMA em vários países. Pela nossa ppa experiência de leitura e diálogo, a comunidade que precisa de recorrer à PMA tem uma visão assaz pragmática desta questão, dando prioridade à realização de um projecto de vida com filhos. Pela nossa parte não antecipamos nenhum obstáculo à consulta que desenvolve, desde que assegurada uma

certa reserva que apesar de tudo os foristas por vezes descuidam.
Gostaríamos também de lhe pedir o favor de nos enviar um exemplar do seu projecto, quando estiver concluído, pra que o posmaos integrar num pequeno centro de documentação que queremos abrir em 2010.
Com os desejos de um bom trabalho, os nossos cumprimentos,
APFertilidade"

Actions

associação portuguesa de infertilidade
8/27/2014

Newsletters

To: celiaglesiasneves@hotmail.com

Show this message...



From: **APFertilidade** (geral@apfertilidade.org) You moved this message to its current location.

Sent: Wednesday, August 27, 2014 1:03:05 PM

To: celiaglesiasneves@hotmail.com

Agradecemos a sua inscrição como associado da Associação Portuguesa de Fertilidade. Relembramos os dados para o Pagamento de Serviço no Multibanco:

Entidade: 10241

Referencia: 689 916 258

Valor: 30.00 euros

A inscrição ficará finalizada depois de efectuado e validado o pagamento da referência Multibanco

. Em breve enviaremos por correio o original da declaração da APFertilidade e recibo referente ao pagamento da sua quota.

Associação Portuguesa de Fertilidade
geral@apfertilidade.org

