



ANNE LIMA DE LARA

**COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE CRIOPRESERVAÇÃO DE GAMETAS E
EMBRIÕES**

SANTA MARIA – RS

2020

ANNE LIMA DE LARA

**COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE CRIOPRESERVAÇÃO DE GAMETAS E
EMBRIÕES**

Trabalho final de graduação (TFG) apresentado ao
Curso de Biomedicina, Área de Ciências da Saúde, da
Universidade Franciscana – UFN, como requisito
parcial para aprovação na disciplina TFG II.

Orientador: Prof^a Dra. Larissa Finger Schaffer

SANTA MARIA – RS

2020

Resumo

Nos últimos anos houve uma grande procura por métodos de preservação da fertilidade em virtude do aumento de casos de infertilidade, cerca de 15% da população mundial, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), e gestações tardias. Sendo assim, técnicas de criopreservação de gametas ou de embriões excedentes de ciclos de estimulação ou fertilizações *in vitro* são utilizadas para esse fim. Desta forma, este estudo, tem como objetivo analisar, descrever e comparar os métodos utilizados para a criopreservação, o congelamento lento e a vitrificação. Para isso, foram consultados artigos das bases de dados da Scielo, *Pubmed*, *Science Direct* e Google Acadêmico. Foram usados os descritores: “oócito”, “espermatozoide”, “gametas”, “embriões”, “criopreservação”, “congelamento lento” e “vitrificação”. De acordo com o levantamento de dados existentes na literatura, o uso da vitrificação possui mais vantagens em relação ao congelamento lento, principalmente em relação ao tempo necessário para realização da técnica e os resultados obtidos em ciclos de fertilização, além de minimizar a formação de cristais de gelo e possuir taxas de sobrevivência celular, fertilização, desenvolvimento do embrião e gravidez melhores quando comparado ao congelamento lento.

Palavras-chave: congelamento lento; vitrificação; infertilidade; fertilização.

1. INTRODUÇÃO

A infertilidade, atualmente, afeta entre 50 e 80 milhões de pessoas no mundo, e cerca de 8 milhões de brasileiros, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). Estima-se que a causa da infertilidade relacionada à mulher é de 35%, ao homem 35%, relacionada a ambos é de 20% e com causa desconhecida é de 10% ¹.

Entre as causas de infertilidade feminina estão: síndrome do ovário policístico, insuficiência ovariana prematura, endometriose, obstrução tubária, muco cervical

incompetente, anomalias no cariótipo, patologias uterinas, tumores malignos, malformações anatômicas, gravidez ectópica, abortos de repetição, auto-anticorpos e causa idiopática. Enquanto as causas masculinas incluem alterações no espermograma, criptorquidia, anomalias endócrinas, anomalias de cariótipo, ejaculação retrógrada, anejaculação, azoospermia obstrutiva, causa idiopática, anomalias anatômicas e congênitas, tumores malignos e azoospermia secretora².

Sendo assim, os métodos para preservação da fertilidade têm grande importância, não só para casais inférteis, como para pessoas que desejam ter filhos com idade mais avançada ou que irão passar por algum tratamento que comprometa a fertilidade, como, por exemplo, a quimioterapia³, ou ainda mulheres sem parceiro, que podem recorrer ao banco de sêmen.

Para realizar a preservação dos gametas e embriões, são usados dois métodos de criopreservação, o congelamento lento, a primeira técnica desenvolvida para este fim, sendo usada até hoje, que consiste no uso de baixas concentrações de agentes crioprotetores e equipamentos com taxa de resfriamento controlada⁴, e a vitrificação, técnica mais recente que utiliza maiores concentrações de crioprotetores e alta velocidade de resfriamento⁵. Existem dois tipos de crioprotetores, os intracelulares (penetrantes), como glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO) e propanodiol (PROH), possuem pequenas moléculas que atravessam a membrana celular e substituem a água intracelular; e os extracelulares (não penetrantes), como sacarose, polivinilpirrolidina (PVP) e dextran, que são moléculas grandes que mantêm um gradiente osmótico extracelular que auxilia na desidratação⁶.

Em virtude disso, o estudo e análise de ambas as técnicas é de suma importância para obtenção de melhores resultados na criopreservação de gametas e embriões. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo é realizar a comparação entre estas técnicas.

2. METODOLOGIA

O trabalho foi construído através do levantamento de dados e informações encontrados na literatura existente, onde foram realizadas pesquisas nas bases de dados da Scielo, *PubMed*, *Science Direct* e Google Acadêmico. Para a consulta bibliográfica foram usados os seguintes descritores: “oócito”, “espermatozoide”, “gametas”, “embriões”, “criopreservação”, “congelamento lento”, “vitrificação” e suas combinações, em inglês e português, durante os meses de agosto e setembro de 2020.

Os artigos selecionados foram avaliados de modo a verificar os critérios de inclusão, ou seja, texto na íntegra, idioma (português e inglês), publicados de 1972 a 2020 e apresentar dados sobre os métodos de criopreservação. Foram excluídos os estudos que não obedeceram aos critérios de inclusão citados acima.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O congelamento lento foi uma técnica pioneira para a criopreservação de gametas e embriões, descrita por Whittingham, Leibo e Mazur⁷ permanece sendo utilizada até hoje na prática clínica, com poucas alterações nas técnicas usadas.

Essa técnica utiliza baixas concentrações de crioprotetores, uma velocidade de resfriamento lenta (o que faz com que o tempo necessário para sua realização seja mais longo, em torno de 3 horas) e utiliza a técnica de *seeding* (indução da formação de cristais de gelo). Para realização do congelamento geralmente são necessários freezers programáveis, tornando o custo para sua realização mais alto.

A vitrificação é uma metodologia mais recente, que utiliza uma alta concentração de crioprotetores e um rápido congelamento, e foi desenvolvida por Rall e Fahy⁸, porém só obteve sucesso após alterações por Ali e Shelton⁹. Essa é uma técnica extremamente rápida, levando

em média 15 minutos para ser realizada, além de ser mais segura e ter menor custo em relação ao congelamento lento.

Os artigos citados nas tabelas 1 e 2, demonstram uma similaridade em relação aos crioprotetores utilizados, como o propanodiol (PROH), dimetil sulfóxido (DMSO), etileno glicol (EG) e sacarose, tanto no congelamento lento, quanto na vitrificação.

Na tabela 1, foi realizada uma comparação das técnicas descritas em relação a criopreservação de embriões. Uma análise geral dos dados mostra uma maior sobrevivência de embriões após a vitrificação em relação ao congelamento lento, bem como no número de gestações.

No estudo de Debrock *et al*¹⁰. foram usadas 307 pacientes no total, dessas, 155 pacientes (480 embriões) foram designadas para congelamento lento e 152 pacientes (495 embriões) para vitrificação. Após a criopreservação e descongelamento, nota-se uma maior taxa de sobrevivência nos embriões que foram vitrificados (84%) em relação aos que passaram por congelamento lento (52%). A taxa de embriões que permaneceram intactos após o descongelamento também foi maior na vitrificação, 75%, enquanto no congelamento lento foi de 28%.

Wilding *et al*¹¹. analisou os dados de 262 ciclos de reprodução assistida, nesse estudo, é observada uma taxa de nascidos vivos levemente maior após transferência utilizando embriões vitrificados, 37%, do que as criopreservações por congelamento lento, 35%.

Ao contrário dos demais estudos, Zhu *et al*¹². conclui que a vitrificação não deve substituir totalmente o congelamento lento para criopreservação de embriões, visto que o potencial de implantação de embriões forneceu evidências adicionais para a continuidade do uso do congelamento lento.

O estudo de Li *et al*.¹³ demonstra um maior número de gestações oriundas de transferência de embrião vitrificado (32%) do que as gestações por embrião que passou por congelamento

lento (23%). Além disso, os embriões vitrificados obtiveram melhores resultados em relação aos embriões transferidos a fresco.

Tabela 1 – Comparação entre congelamento lento e vitrificação de embriões

Autor/ Ano	Período	Criopreservação	Crioprotetor	Embriões congelados	Embriões descongelados	Embriões sobreviventes	Nº de transferências	Nº de gestações/nascidos vivos
Debrock <i>et al.</i> (2015)	Setembro 2011 –	Congelamento lento	PROH; sacarose	-	200	105	-	10
	março 2013	Vitrificação	DMSO, EG, sacarose	-	217	183	-	35
Wilding <i>et al.</i> (2010)	Julho – dezembro 2009	Congelamento lento	-	382	162	141	48	17
	Janeiro 2010 –	Vitrificação	-	320	158	147	51	19
Zhu <i>et al.</i> (2015)	dezembro 2013	Congelamento lento	PROH, sacarose	-	-	-	526	184
	janeiro 2012 – junho 2014	Vitrificação	EG, DMSO, sacarose	-	-	-	485	198
Li <i>et al.</i> (2014)	Janeiro 2009-	Congelamento lento	-	-	18971	-	26351	2766/2065
	dezembro 2011	Vitrificação	-	-	13548	-	22265	6537/4955

Na tabela 2 está representada a comparação entre congelamento e vitrificação em relação a criopreservação de oócitos, assim como no caso da criopreservação de embriões, a vitrificação aparece como melhor alternativa de congelamento para esses gametas.

O estudo de Nagy *et al.*¹⁴. analisou 193 pacientes que passaram por fertilização *in vitro* utilizando oócitos criopreservados (doados ou próprios), através do registro HOPE (do inglês, *Human Oocyte Preservation Experience*), desenvolvido para coletar informações sobre resultados de ciclos de técnicas de reprodução assistida que usaram oócitos criopreservados. Nesse estudo, foi notado uma maior taxa de gestações a partir de ciclos com oócitos vitrificados (60%) em relação aos ciclos com oócitos que foram congelados lentamente (30%).

A análise dos estudos de Fadini *et al.*¹⁵ e de Grifo *et al.*¹⁶. mostra uma maior sobrevivência após o descongelamento de oócitos que foram vitrificados (78% e 95%,

respectivamente), enquanto a sobrevivência após o congelamento lento foi de 57% e 88%, respectivamente.

Tabela 2 – Comparação entre congelamento lento e vitrificação de oócitos.

Autor/ Ano	Período	Criopreservação	Crioprotetor	Nº de ciclos	Oócitos descongelados	Oócitos sobreviventes	Nº de transferências de embrião	Nº de gestações
Nagy <i>et al.</i> (2017)	Junho 2008 – maio 2012	Congelamento lento	-	40	312	-	-	12
		Vitrificação	-	94	694	-	-	57
Fadini <i>et al.</i> (2009)	Abril 2004 – dezembro 2006	Congelamento lento	PROH, sacarose	286	1348	780	224	17
	Janeiro – dezembro 2007	Vitrificação	EG, PROH, sacarose	59	285	225	55	10
Grifo <i>et al.</i> (2010)	Setembro 2004 – agosto 2006	Congelamento lento	PROH, sacarose	-	159	140	28	-
		Vitrificação	EG, DMSO	-	163	155	25	-

A tabela 3 apresenta um comparativo entre amostras de espermatozoides que passaram por criopreservação (congelamento lento ou vitrificação) e amostras frescas.

A motilidade é o principal parâmetro de avaliação usado nos estudos presentes na tabela, na maioria dos casos, houve menor perda na motilidade nos espermatozoides que foram vitrificados, exceto no estudo de Le *et al.*¹⁷, onde a menor perda de motilidade ocorreu nos espermatozoides que passaram por congelamento lento, apesar disso, a viabilidade dos espermatozoides vitrificados foi maior nesse estudo.

Karthikeyan *et al.*¹⁸ avaliou a vitalidade, que apresentou menor perda após a vitrificação, enquanto Riva *et al.*¹⁹ avaliou a concentração de espermatozoide, onde houve pouca diferença entre a vitrificação e o congelamento lento, porém apresentou grande diferença se comparada as amostras frescas.

Tabela 3 – Comparação entre amostras frescas e criopreservadas por congelamento lento ou vitrificação de espermatozoides.

Autor/ Ano	Período	Nº de amostras	Criopreservação	Motilidade (%)	Vitalidade (%)	Viabilidade (%)	Concentração de espermatozoide (10 ⁶ /ml)
Karthikeyan <i>et al.</i> (2019)	Novembro 2013 – junho 2014	40	Fresco	49,5	72	-	-
	Congelamento lento		8	20,5	-	-	
	Vitrificação		27	42	-	-	
Riva <i>et al.</i> (2018)	Fevereiro – dezembro 2015	42	Fresco	51	-	-	88,3
	Congelamento lento		16,6	-	-	39	
	Vitrificação		34,7	-	-	38,8	
Mohamed ²⁰ (2015)	Abril – outubro 2013	33	Fresco	56	-	-	-
	Congelamento lento		31	-	-	-	
	Vitrificação		34	-	-	-	
Le <i>et al.</i> (2019)	Outubro 2016 – abril 2017	105	Fresco	29	-	86	-
	Congelamento lento		14,91	-	55,46	-	
	Vitrificação		9,78	-	41,35	-	

Os valores de referência para os parâmetros utilizados são: motilidade de $\geq 40\%$ de espermatozoides móveis, vitalidade $\geq 58\%$ e concentração de $\geq 15 \times 10^6$ espermatozoides/mL²¹.

4. CONCLUSÃO

A partir da análise dos estudos pode-se concluir que apesar da grande importância do congelamento lento para a criopreservação, a técnica tem sido amplamente substituída pela vitrificação, mesmo que não totalmente. E foi observada uma similaridade em relação aos crioprotetores utilizados, tanto no congelamento lento, quanto na vitrificação de oócitos e embriões.

A rápida velocidade de congelamento da técnica, além do baixo custo e não necessitar de equipamentos específicos, são as grandes vantagens da vitrificação sobre o congelamento, além disso, apresenta desvantagens, como a alta concentração de crioprotetores, o que pode apresentar toxicidade para as células.

Em conclusão, apesar da vitrificação apresentar melhores resultados e possuir diversos benefícios, o congelamento lento não deve ser deixado de lado, pois ainda apresenta grande utilidade para criopreservação de embriões e gametas, principalmente devido a baixa

concentração de crioprotetores necessária, o que evita danos celulares decorrentes da toxicidade dos crioprotetores, que pode ocorrer na vitrificação.

5. REFERÊNCIAS

- [1] *Mulheres e saúde: evidências de hoje, agenda de amanhã*. (n.d.). Retrieved December 17, 2020, from <https://iris.paho.org/handle/10665.2/7684?show=full>
- [2] Cardona, Diana Raquel Veloso. Estudo epidemiológico da infertilidade: prevalência e importância médico-legal. 2013. 103 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biomédicas, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade de Porto, Porto, 2013.
- [3] Martinez F, Andersen CY, Barri PN, Brannigan R, Cobo A, Donnez J, et al. Update on fertility preservation from the Barcelona International Society for Fertility Preservation–ESHRE–ASRM 2015 expert meeting: indications, results and future perspectives. In: *Fertility and Sterility*. Elsevier Inc.; 2017. p. 407-415.e11.
- [4] Keros V, Fuller BJ. Cryopreservation of mammalian oocytes. *Methods Mol Biol*. 2015;1257:289–304.
- [5] Liebermann J. Human embryo vitrification. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2017. p. 141–59.
- [6] Sparks AET. Human embryo cryopreservation-methods, timing, and other considerations for optimizing an embryo cryopreservation program. *Semin Reprod Med*. 2015 Mar 1 33(2):128–44.
- [7] Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196° and -269°C . *Science* (80-). 1972 Oct 27;178(4059):411–4.
- [8] Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*. 1985;313(6003):573–5.
- [9] Ali J, Shelton JN. Vitrification of preimplantation stages of mouse embryos. *J Reprod Fertil*. 1993 Jul 1;98(2):459–65.

- [10] Debrock S, Peeraer K, Fernandez Gallardo E, De Neubourg D, Spiessens C, D'Hooghe TM. Vitrification of cleavage stage day 3 embryos results in higher live birth rates than conventional slow freezing: A RCT. *Hum Reprod.* 2015 May 22; 30(8):1820–30.
- [11] Wilding MG, Capobianco C, Montanaro N, Kabili G, Di Matteo L, Fusco E, et al. Human cleavage-stage embryo vitrification is comparable to slow-rate cryopreservation in cycles of assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet.* 2010 Sep;27(9–10):549–54.
- [12] Zhu HY, Xue YM, Yang LY, Jiang LY, Ling C, Tong XM, et al. Slow freezing should not be totally substituted by vitrification when applied to day 3 embryo cryopreservation: an analysis of 5613 frozen cycles. *J Assist Reprod Genet.* 2015 Sep 1;32(9):1371–7.
- [13] Li Z, Wang YA, Ledger W, Edgar DH, Sullivan EA. Clinical outcomes following cryopreservation of blastocysts by vitrification or slow freezing: a population-based cohort study. *Hum Reprod.* 2014 Dec 1;29(12):2794–801.
- [14] Nagy ZP, Anderson RE, Feinberg EC, Hayward B, Mahony MC. The human oocyte preservation experience (HOPE) registry: Evaluation of cryopreservation techniques and oocyte source on outcomes. *Reprod Biol Endocrinol.* 2017 Feb 7;15(1).
- [15] Fadini R, Brambillasca F, Mignini Renzini M, Merola M, Comi R, De Ponti E, et al. Human oocyte cryopreservation: Comparison between slow and ultrarapid methods. *Reprod Biomed Online.* 2009;19(2):171–80.
- [16] Grifo JA, Noyes N. Delivery rate using cryopreserved oocytes is comparable to conventional in vitro fertilization using fresh oocytes: potential fertility preservation for female cancer patients. *Fertil Steril.* 2010 Jan 15;93(2):391–6.
- [17] Le MT, Nguyen TTT, Nguyen TT, Nguyen VT, Nguyen TTA, Nguyen VQH, et al. Cryopreservation of human spermatozoa by vitrification versus conventional rapid freezing: Effects on motility, viability, morphology and cellular defects. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2019 Mar 1;234:14–20.

- [18] Karthikeyan M, Arakkal D, Mangalaraj A, Kamath M. Comparison of conventional slow freeze versus permeable cryoprotectant-free vitrification of abnormal semen sample: A randomized controlled trial. *J Hum Reprod Sci.* 2019 Apr ;12(2):150–5.
- [19] Riva NS, Ruhlmann C, Iaizzo RS, López CAM, Martínez AG. Comparative analysis between slow freezing and ultra-rapid freezing for human sperm cryopreservation. *J Bras Reprod Assist.* 2018;22(4):331–7.
- [20] Mohamed MSA. Slow cryopreservation is not superior to vitrification in human spermatozoa; an experimental controlled study. *Int J Reprod Biomed.* 2015 Oct 1;13(10):633–44.
- [21] World Health Organization: WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.

Normas para publicação na revista Human Reproduction Archives

About the journal

Human Reproduction Archives is an online only open access journal published by the Brazilian Society of Human Reproduction.

This journal is the continuation of Reprodução & Climatério.

Mission and scope

Our mission is to promote continuing medical education for members of the Brazilian Society of Human Reproduction and worldwide professionals interested in areas related to human reproduction, including gynecologists, urologists, biologists, psychologists, nurses and other health professionals. Researches in the areas of assisted reproduction, reproductive health, infertility, endometriosis, menopause, sexual and gender violence, adolescence, contraception, fetal medicine and gynecological endocrinology will be accepted in English for evaluation in the form of Research, Review, Update and Systematic Review articles, as well as Case Reports as detailed in our Section Policies.

Editorial policies

Human Reproduction Archives supports the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) (<http://www.icmje.org/recommendations/>).

General policies

Human Reproduction Archives accepts original manuscripts submitted in the form of original articles, reviews, update articles and case reports that follow our editorial policies and formatting guidelines. Manuscripts submitted evaluation should not be under evaluation nor submitted to another journal. Furthermore, manuscripts that have already undergone evaluation by another journal should also send the corresponding rejection letter with the submission.

The journal will only consider submitted manuscripts written in English, and depending on the editorial evaluation, authors may be asked to resubmit the manuscript after it has gone through a professional English language editing service.

Concepts presented in accepted and published articles are the sole responsibility of the authors, and do not necessarily reflect the opinion of the journal or its Editorial Board.

Authors information, authors contribution, conflict of interest and financial support statements will be published as stated by the authors.

Peer review

Submitted manuscripts will be reviewed by the Editorial Board and possible evaluation results are rejection, immediate acceptance or accepted with revisions, in which case they will be returned to the authors for correction and resubmission.

After the definite acceptance authors will be requested to send a letter signed by all authors stating that the manuscript has not been previously published and that they agree to transfer the copyrights to Human Reproduction Archives.

Language policies

Human Reproduction Archives will only consider submitted manuscripts written in English, and depending on the editorial evaluation, authors may be asked to resubmit the manuscript after it has gone through a professional English language editing service.

The Editor-in-Chief reserve the right to make language and structure edits they deem required to manuscripts under evaluation and after acceptance.

Articles that have been translated into English or written by non-natives must be submitted with a certificate stating that professional translation and/or revision has been done. For convenience we list a couple of service providers that may be used by authors. Note: authors may choose other service providers as long as they provide a service certificate for the revision and/or translation.

Editora Cubo

- Translation and revision.
- <http://www.editoracubo.com.br/language>

Cortezzi Pesquisa Cientifica

- Translation
- sylviacortezzi@hotmail.com

Section policies

Manuscripts submitted should be structured according to their type as described below:

Research articles: Scientific research papers presenting original data about clinical or experimental research including medical, biological and psychosocial aspects regarding human reproduction and its concerns. Clear methodology, descriptive statistical analysis and inferences of own data should be presented if applicable. Text should be structured as follows:

- Title page, Structured Abstract, Keywords, Text (Introduction, Methods, Results, Discussion and Conclusion) and References.
- Maximum 3,500 words.

Review articles: Papers whose aim is to summarize, analyze, evaluate or synthesize investigative papers already published in scientific journals. They must include a synthesis and critical analysis of the researched literature and cannot be confused with update articles. Text should be structured as follows:

- Title page, Abstract, Keywords, Text and References.
- Maximum 3,500 words.

Update articles: Papers reporting usually current information on themes of interest to certain specialties (such as a new technique or method). They have different characteristics from

reviews, since they do not display critical analysis of the literature. Text should be structured as follows:

- Title page, abstract and keywords, text, references
- Maximum 3,500 words.

Case reports: Articles representing descriptive data of one or more clinical cases. The selected cases should be of great interest, with unusual disease or evolution or submitted to unexpected or alternative treatments. They must involve humans or animals and should present the studied individual's characteristics (gender, age, etc.). Text should be structured as follows:

- Title page, Abstract, Keywords, Text (Introduction, Case Description and Discussion or equivalent), and References
- Maximum 3,500 words.

Systematic Review and meta-analysis: This type of research seeks to clearly answer specific questions based on relevant scientific publications. Authors should preferably use studies based on randomized controlled trials - RCTs and use the PICO (Patient, Intervention, Comparison and Outcomes) process to clearly state the review question with the least possible bias. Systematic review manuscripts should be formatted following the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) checklist which is available at <http://www.prisma-statement.org/PRISMAStatement/Default.aspx>. The checklist must be filled in and submitted with the manuscript and text should be structured as follows:

- Title page, Abstract, Keywords, Text (introduction, methods, results and discussion) and References.
- Maximum 3,500 words.

Copyright and publishing license

After the final acceptance the journal requests that an agreement and copyright transfer signed by all authors is sent stating that the manuscript is original and was not previously published.

Manuscript preparation guidelines

Human Reproduction Archives supports and strongly suggests that authors read and follow the manuscript preparation recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) (<http://www.icmje.org/recommendations/browse/manuscript-preparation/preparing-for-submission.html>).

Title page

The Title page should contain the following information:

- Manuscript title.
- Full names of all authors without abbreviations and superscript numbers to indicate their affiliation.
- Institutional affiliation of the authors at the time the work was carried out. Affiliation names must be given in full and in their native language. The affiliation includes department, university, or organizational affiliation and its location, including city, state/province (if applicable), and country.
- Postal and email addresses of the corresponding author.
- Contribution description of each co-author.
- Institution where the article was carried out.
- Financial support disclosure statements for each author.
- Conflict of interest statements for each author.
- Acknowledgments.

Title

The manuscript title is the first thing readers will see and is your best chance of creating a good first impression. A good manuscript title should be short, descriptive, attractive and reflect the study's outcome. (see: [Knight and Ingersoll 1996](#)). Failure to do so might decrease the chances of your abstract being read and your manuscript cited (see: [Paiva et al 2012](#)).

Abstract

The abstract is your second chance of catching the reader's attention and raising the chances of your manuscript being cited. Your abstract should clearly describe the manuscript intent, strategy and the author's results and/or conclusions. Human Reproduction Archives requires (except for update articles) structured abstracts with 150 to 250 words organized in sections according to the manuscript type (see: [Knight and Ingersoll 1996](#)) and do not cite references or use abbreviations.

Keywords

Keywords are used by databases and search engines to index published manuscripts and help Authors find relevant works faster. To achieve that goal Authors should find keywords that describe the thematic content of the work both in respect with it's main objectives and experimental, material and techniques particularities.

Human Reproduction Archives requires up to 6 keywords extracted from the MeSH® National Library of Medicine's (NLM) controlled vocabulary. NLM offers Authors two tools to help with keyword discovery:

- [MeSH on Demand](#): an online service launched by NLM in 2014 that scans your submitted text (abstract or manuscript) and lists suggested MeSH® terms and also lists PubMed similar articles relevant to the submitted text.
- [The MeSH Browser](#): this is the classic online tool that allows users to search directly for MeSH terms.

Manuscript text

Documents must be submitted in MS Word© format. Page size must be A4, with double spacing and 3 cm margins in numbered pages using 12pt Times New Roman font. If you use Microsoft Word we strongly recommend the use of version 2010 or later for Microsoft© has reported a problem with version 2007 of MS Word© which causes a random loss of spaces between some words when opening the new DOCX standard file format (<http://support.microsoft.com/kb/2633585>).

Text structure and sections

The main text should be structured according to the manuscript type as described in our Section policies and should also follow international reporting guidelines recommendations when appropriate. The EQUATOR Network and the NLM's Research Reporting Guidelines and Initiatives are good sources for reporting guidelines as recommended by ICMJE.

When editing your manuscript sections and subsections make sure you use the built-in paragraph styles of MS Word© (Heading 1/Título 1, Heading 2/Título 2 etc) to structure your text.

Abbreviations

Avoid the excess use of abbreviations and always use the spelled-out form followed by the abbreviation in parenthesis on first mention unless the abbreviation is a standard unit of measurement.

Tables

Design each table each on a separate page and use the built-in table editor inside MS Word©. Do not use scanned images of tables. Do not use vertical lines add horizontal lines only below column headings. All tables must be cited in the text and should be numbered consecutively in the order of their first citation in the text. Each table must have a short but self-explanatory title.

Additional information or explanations should be placed in table footnotes, not in the title. When needed use superscript symbols (*, †, ‡, §) or alphabet letters to explain information if needed.

Illustrations

Insert graphics, pictures, schemas and illustrations on separate pages and always cite them as Figures. All Figures must be cited in the text and should be numbered consecutively in the order of their first citation in the text. They must be sent in TIFF or JPG file format with a minimum width of 2500 pixels and allow clear reading of all text and symbols used. All symbols, arrows, numbers, or letters used within figures must be clearly explained in the legend.

Figures may be sent in color but they will be used as sent by the authors. The journal will not edit the figures. Authors should take special attention when preparing figures for they will not be edited by the journal. It is recommended that the authors keep a uniform use of text size and font family throughout the manuscript. Please also follow the ICMJE recommendations when preparing for submission (<http://www.icmje.org/recommendations/browse/manuscript-preparation/preparing-for-submission.html#i>). Figures should not be manipulated, edited or adjusted in ways that may interfere with its interpretation. We strongly suggest authors to observe and follow the tips and examples shown in "What's in a picture? The temptation of image manipulation" (Rossner and Yamada 2004, *Journal of Cell Biology*, 166:11).

References

All references must be cited in the text and all citations must have a matching entry in the references list.

Number the references consecutively in the order in which they are first cited in the text, tables or figure legends. Identify references by Arabic superscript numerals. Citations that only appear in tables or figure legends should be numbered in accordance with that figure or table citation in the text.

References should include up to six authors followed by et al when there are more than six authors.

The bibliographic references list must follow the NLM's Citing Medicine, 2nd edition style as summarized in https://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html. Below we provide a small sample:

Article in journal

1. Nahas EAP, Pontes A, Nahas Neto J, Traiman P, Luca L, Abbade J. Efeitos da atividade física e da tibolona sobre a densidade mineral óssea em mulheres na pós-menopausa. *Reprod Clim.* 2001;16:47-52.
2. Rose ME, Huerbin MB, Melick J, Marion DW, Palmer AM, Schiding JK, et al. Regulation of interstitial excitatory amino acid concentrations after cortical contusion injury. *Brain Res.* 2002;935(1-2):40-6.
3. Geraud G, Spierings EL, Keywood C. Tolerability and safety of frovatriptan with short- and long- term use for treatment of migraine and in comparison with sumatriptan. *Headache.* 2002;42 Suppl 2:S93-9.

Letter and editorial

1. Kremer J. Yardsticks for successful donor insemination [letter]. *Fertil Steril* 1991;55(5):1023-4.
2. Cancer in South Africa [editorial]. *S Afr Med J* 1994;84:15.

Book

1. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Medical microbiology.* 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002.
2. Norman IJ, Redfern SJ, editors. *Mental health care for elderly people.* New York: Churchill Livingstone; 1996.

Chapter in a book

1. Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 465-78.

Conference paper

1. Rice AS, Farquhar-Smith WP, Bridges D, Brooks JW. Canabinoids and pain. In: Dostorovsky JO, Carr DB, Koltzenburg M, editors. Proceedings of the 10th World Congress on Pain; 2002 Aug 17-22; San Diego, CA. Seattle (WA): IASP Press; 2003. p. 437-68.

Dissertation and thesis

1. Zhao C. Development of nanoelectrospray and application to protein research and drug discovery [dissertation]. Buffalo (NY): State University of New York at Buffalo; 2005. 276 p.
2. Weisbaum LD. Human sexuality of children and adolescents: a comprehensive training guide for social work professionals [master's thesis]. Long Beach (CA): California State University, Long Beach; 2005. 101 p.

Material on the internet

1. Souza SS, Santos RL, Santos ADF, Barbosa MO, Lemos ICS, Machado MFAS. Mulher e climatério: concepções de usuárias de uma unidade básica de saúde. *Reprod Clim* [Internet]. 2017 [cited 2017 Aug 22];32(2):85-9. Available from: <http://recli.elsevier.es/pt/mulher-e-climaterio-concepcoes-usuarias/articulo/S141320871730002X/>
2. Brasil, Ministério da Saúde. Portal da Saúde [Internet]. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2017 [cited 2017 Aug 22]. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/>

Changelog

- Nov. 17, 2017 - Replaced email by online submission link and added paragraph about service providers in the Language policies section.
- Oct. 10, 2017 - Added Systematic Review and meta-analysis article type and updated maximum manuscript length limits.