

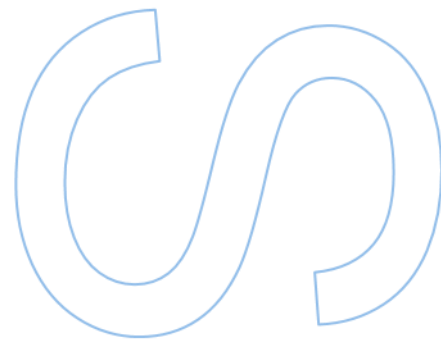
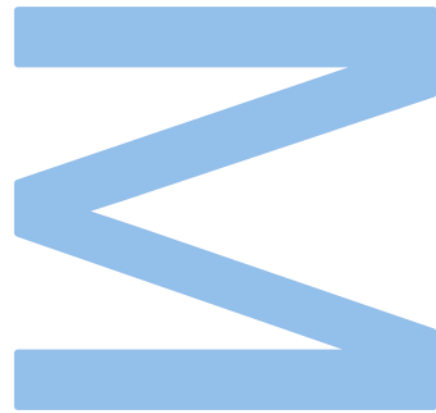
Os Ciclos Mistos FIVc/ ICSI no Tratamento da Infertilidade

Alexandra Borges Cardoso

Mestrado em Biologia Celular e Molecular
Departamento de Biologia
2023

Orientador

Prof. Vasco Manuel Leal Martins de Almeida, Professor auxiliar e diretor de laboratório de Procriação Medicamente Assistida, FCUP

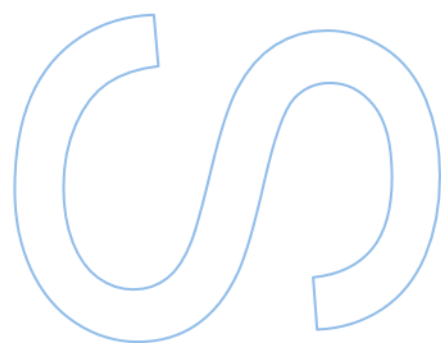
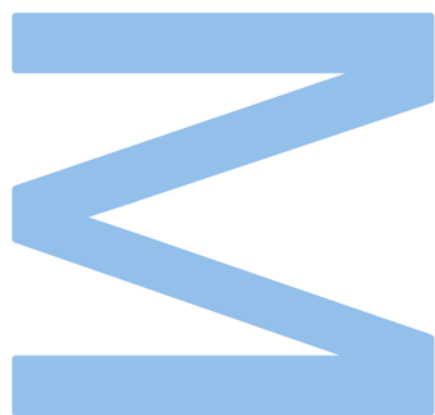




SÃO JOÃO



PORTO
FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO



Agradecimentos

Em primeiro lugar, um forte agradecimento ao meu orientador Prof. Vasco Almeida, pela oportunidade e por ter sido o elo de contacto que possibilitou a realização do Estágio nesta área, por mim tão admirada. A sua grande dedicação pela Reprodução desperta ainda mais o meu gosto e motivação para continuar a traçar este caminho.

Agradeço também ao Prof, José Américo Sousa, diretor de Mestrado pela disponibilidade, sem horário, para qualquer esclarecimento de dúvidas e acompanhamento.

Um especial e enorme agradecimento à equipa de Biólogas do Centro de Responsabilidade Integrada - Medicina da Reprodução do Centro Hospitalar Universitário de São João por me terem acolhido de braços abertos desde o primeiro dia. À Ana Patrícia Martins, Beatriz Vieira, Renata Leite, Sofia Xavier, Yone Reis e a Maria Garcia o meu muito obrigada pela vossa grande dedicação, profissionalismo e acompanhamento em todo o processo. Pelo acolhimento, toda a disponibilidade para atenderem às minhas dúvidas, pelos momentos de descontração e boa disposição e também o grande sentido de responsabilidade e espírito de equipa que me ensinaram. A todas e cada uma delas por me dedicarem um pedacinho do seu conhecimento e tornarem esta experiência tão rica. Saio “pronta para a vida” e para receber novas oportunidades, levando esta bem guardada no coração.

Partilho um forte sentimento de gratidão a toda a equipa do CRI-MR do Centro Hospitalar Universitário de São João, por me acolherem durante este período de Estágio sempre com alegria. Às médicas, às administrativas, às auxiliares, obrigada, Dona Fátima, Dona Conceição e Dona Cármen pelos calorosos abraços ao começo da manhã, por si um carinho especial.

Agradeço ao João Faria pela disponibilidade e grande apoio com a análise estatística, partilhando os seus conhecimentos e perspectiva, procurando sempre apelar ao meu sentido crítico para o tema de investigação.

Para além de todos profissionais em contexto direto de estágio, obrigada à minha equipa de trabalho pela preocupação, carinho e força que sempre me dedicaram. Vocês foram a lufada de ar fresco de tantas circunstâncias. O vosso sentido de união, pertença e responsabilidade despertaram a minha capacidade de resiliência e o empenho necessário para este grande desafio da minha vida. A toda a energia, amizade e diversão que sempre partilhamos.

A vocês amigos, não posso deixar de demonstrar o meu forte agradecimento. Obrigada por toda a companhia, por todos os momentos e memórias que criámos ao longo desta etapa desafiante. Por todas as vezes que me permitiram descontraír, rir e ganhar forças para seguir em frente nesta caminhada. Pelo vosso ombro que sempre esteve disponível, por permanecermos juntos nos bons e maus momentos e por me mostrarem maturidade para enfrentar todos os desafios.

Um enorme obrigada ao meu namorado por ser o meu ponto de abrigo em todos os momentos que precisei de conforto. Ao teu apoio incondicional e perspectiva descontraída, mas séria para os desafios da vida. Por seres um bom ouvinte, mas também por teres sempre uma palavra reconfortante e de coragem. Agradeço-te por acreditares sempre em mim e ainda por me ajudares sempre a dar e ser o melhor de mim.

Um final e grande obrigada aos meus pais, vocês são a minha força todos os dias, a qualquer hora e sempre com aquele abraço de perseverança. Obrigada por todo o apoio e confiança. À minha família, a vocês avós pela lembrança e preocupação na concretização desta desafiante etapa.

Resumo

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a infertilidade é definida como uma doença do sistema reprodutivo caracterizada pela ausência de gravidez clínica após 12 meses de relações sexuais regulares e desprotegidas. Foi desde 1978, com o nascimento de Louise Brown, que se estabeleceram os primeiros grandes passos na área da Procriação Medicamente Assistida, tornando possível a realização de um sonho de milhões de casais até à atualidade: a parentalidade.

A realização do Estágio no CRI-MR do Centro Hospital Universitário do São João (CHUSJ) teve como objetivos o desenvolvimento de conhecimento científico e prático das técnicas de PMA, procurando compreender e integrar a rotina e a sua dinâmica laboratorial. Foram aprendidas técnicas como o espermograma, o procedimento da punção folicular, preparação da amostra espermática para utilização nas técnicas das várias linhas de tratamento, aprendizagem da Inseminação Intra Uterina (IIU), técnica de Fertilização in Vitro convencional (FIVc) e Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide (ICSI), Biópsia Embrionária (PGT), Biópsia Testicular (TESE), Monitorização do desenvolvimento embrionário, Transferência embrionária, Criopreservação de espermatozoides, ovócitos e embriões. Paralelamente, este estudo permitiu a compreensão e o desenvolvimento autónomo de um tema de investigação da área da Reprodução Humana.

A conceção do tema do projeto teve em linha a necessidade de aplicação de técnicas de FIV que respondam eficazmente às necessidades crescentes dos casais inférteis, surgindo uma exponencial e incongruente tendência global para a aplicabilidade da ICSI que supera a FIVc. Tal situação tem se verificado nas mais diversas indicações clínicas, para além da infertilidade masculina severa. A análise comparativa dos resultados laboratoriais de ambos os métodos é crucial para compreender este fenómeno. Os ciclos mistos revelam-se uma ferramenta diagnóstica e informativa para o casal e a equipa clínica, enquanto oferece a oportunidade de conceção com menor risco de cancelamento do ciclo e sem necessidade de múltiplas tentativas. Numa abordagem laboratorial controlada, os ovócitos e, consecutivamente os embriões seguirão o desenvolvimento sob condições de cultura semelhantes, tempos específicos e síncronos de avaliação, juntamente com a variabilidade genética controlada (do mesmo casal), minimizando a introdução de possíveis fatores de confusão. Os dados reunidos evitam o enviesamento da análise, conferindo confiabilidade e poder estatístico.

Este estudo retrospectivo e prospetivo revelou que, no modelo misto, na ausência de infertilidade masculina grave, a FIVc é capaz de produzir maiores taxas de fecundação e aproveitamento embrionário. Apesar da técnica convencional resultar num maior número de embriões disponíveis para transferir, a qualidade entre os embriões, de ambas as técnicas, é equiparável, tal que, ambas demonstram desfechos clínicos semelhantes. A ICSI não demonstrou superioridade clínica nas diferentes indicações investigadas no estudo sendo, por isso, necessário avaliar outros aspetos relevantes como o custo, complexidade técnica e eficácia. Os casais podem beneficiar de uma abordagem mista como primeiro tratamento, maximizando a disponibilidade de embriões para tentativas futuras, evitando o risco de múltiplas tentativas de estimulação hormonal. Este projeto demonstra que os ciclos mistos exibem eficácia em termos de custo-benefício e aumentam teoricamente as taxas cumulativas de gravidez, o que adverte para a necessidade de uma investigação alargada futura para comprovar tal hipótese.

Palavras-chave: Ciclos Mistos, Fertilização *in Vitro* Convencional, Microinjeção Intracitoplasmática de Espermatozoide, Taxa de Fecundação, Aproveitamento Embrionário, Idade Materna, Infertilidade feminina.

Abstract

According to the World Health Organisation, infertility is defined as a disease of the reproductive system characterised by the absence of clinical pregnancy after 12 months of regular, unprotected sexual intercourse. It was in 1978, with the birth of Louise Brown, that the first major steps were taken in the field of Medically Assisted Procreation, allowing millions of couples to achieve their dream of parenthood.

The aim of the internship at the Reproductive Medicine Unit of the São João Hospital Centre (CHSJ) was to develop scientific and practical knowledge of PMA techniques, seeking to understand and integrate the routine and its laboratory dynamics. They learnt techniques such as the spermogram, the pick-up procedure, preparing the sperm sample for use in the techniques of the various treatment lines, learning Intra Uterine Insemination (IUI), the In Vitro Fertilisation technique and Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI), Embryo Biopsy, Testicular Biopsy, Monitoring embryo development, Embryo Transfer, Cryopreservation of sperm, oocytes, and embryos. At the same time, this study enabled the understanding and autonomous development of a research topic in the Human Reproduction field.

The project's theme was conceived in line with the need to apply IVF techniques that respond effectively to the increasing needs of infertile couples, with the emergence of an exponential and incongruous global trend towards the applicability of ICSI that surpasses cIVF. This situation has been observed in the most diverse clinical indications, in addition to the initial one, severe male infertility. Comparative analysis of the laboratory results of both methods is crucial to understanding this phenomenon. Mixed cycles prove to be a diagnostic and informative tool for the couple and the clinical team, while offering the opportunity for conception with a lower risk of cycle cancellation and without the need for multiple attempts. In a controlled laboratory approach, the oocytes and consecutively the embryos will follow development under similar culture conditions, specific and synchronous evaluation times, along with controlled genetic variability, minimising the introduction of possible confounding factors. The pooled data avoids bias in the analysis, conferring reliability and statistical power.

This retrospective and prospective study revealed that in the mixed model, in the absence of severe male infertility, cIVF can produce higher fertilisation and embryo utilisation rates. Although the conventional technique results in a greater number of embryos available for transfer, the quality of the embryos from both techniques is

comparable and therefore both show similar clinical outcomes. ICSI did not demonstrate clinical superiority in the different indications investigated in the study, so it is necessary to evaluate other relevant aspects such as cost, technical complexity, and efficacy. Couples may benefit from a mixed approach as a first treatment, maximising the availability of embryos for future attempts and avoiding the risk of multiple attempts at hormonal stimulation. This project demonstrates that mixed cycles are cost-effective and theoretically increase cumulative pregnancy rates, which warns of the need for future extensive research to prove this hypothesis.

Keywords: Split Cycles, Conventional in Vitro Fertilisation, Intracytoplasmic Sperm Injection, Fertilisation Rates, Clinically Usable Embryos, Maternal Age, Female Infertility.

Índice

Lista de Tabelas	X
Lista de Gráficos.....	xiii
Lista de Figuras	xv
Lista de Abreviaturas	xvii
Introdução	1
1. A infertilidade.....	2
2. A Procriação Medicamente Assistida.....	2
2.1. Enquadramento Histórico e Epidemiológico.....	2
2.2. Enquadramento Legal	3
2.3. Bioética na aplicação das técnicas	4
2.4. Abordagem ao casal infértil	4
2.4.1. Idade.....	5
2.4.2. Fatores exógenos e estilo de vida.....	6
2.4.3. Exame físico	6
2.5. Fator feminino.....	7
2.6. Fator masculino	8
3. Tratamentos	10
3.1. Inseminação Intra Uterina.....	10
3.2. Fertilização <i>in Vitro</i>	11
3.2.1. Fertilização <i>in Vitro</i> Convencional	12
3.2.2. Microinjeção Intracitoplasmática de Espermatozoide	13
4. Cultura e Desenvolvimento Embrionário.....	15
4.1. Dia 0 - Monitorização do ovócito.....	17
4.2. Dia 1 - Fecundação e Formação do zigoto	19
4.3. Dia 2 e 3 da cultura – Embriões em fase de clivagem	21
4.4. Dia 4 – Mórula	22
4.5. Dia 5 e 6 – Blastocisto.....	23

5. Seleção e transferência embrionária.....	25
6. Implantação	27
7. Técnicas complementares aplicadas:	28
7.1. Eclosão assistida.....	28
7.2. <i>Preimplantation Genetic Testing</i> (PGT)	29
8. Criopreservação	31
9. A tendência ICSI em relação à FIV convencional	33
10. Os ciclos mistos FIVc/ ICSI	35
Objetivos	40
Material e Métodos	44
1. Seleção de Pacientes	45
2. Procedimento Laboratorial.....	45
2.1. Recuperação de ovócitos	45
2.2. Preparação da amostra seminal	46
2.3. Fertilização	47
2.3.1. Fertilização por FIVc	47
2.3.2. Fertilização por ICSI.....	48
2.4. Avaliação da Fecundação.....	49
2.5. Desenvolvimento da Cultura Embrionária.....	50
2.6. Transferência Embrionária.....	51
2.7. Criopreservação de embriões excedentários.....	51
3. Análise Estatística	52
Resultados	55
Análise Descritiva da População.....	56
Fecundação.....	57
Desenvolvimento da Cultura Embrionária.....	58
Transferência Embrionária.....	59
Vitrificação de Embriões Excedentários.....	63
Gravidez Bioquímica e Clínica	65

Influência da idade feminina nos resultados laboratoriais dos ciclos.....	65
Influência da infertilidade feminina nos resultados laboratoriais dos ciclos	68
Discussão dos Resultados	70
Considerações futuras	83
Conclusão	84
Referências Bibliográficas	88
Anexos	103
Anexo 1	104
Anexo 2	105
Anexo 3	106
Anexo 4	107

Lista de Tabelas

Tabela 1. Requisitos fisiológicos do embrião em fase de clivagem, ocorrendo no oviduto materno <i>in vivo</i> , em comparação com as necessidades na fase após a compactação celular aproximadamente 4 dias após a fecundação, quando se encontra no útero materno.	16
Tabela 2. Parâmetros representativos de uma amostra espermática considerada normal avaliada aquando da preparação para início de ciclo de FIV. Valores referidos por World Health (38).....	34
Tabela 3. Descrição da população total incluída no estudo: média (M), desvio padrão (DP), valor absoluto (n).....	56
Tabela 4. Taxas de Fecundação referentes ao quociente entre o número de zigotos (2PN e 2 GP) observados a Dia 1 e o número de ovócitos inseminados. Os valores estão apresentados segundo a % M ± DP. O Teste Não Paramétrico de Wilcoxon (Z) foi realizado por não se cumprirem os pressupostos da normalidade. As taxas foram comparadas de forma emparelhada para cada caso, tendo resultado em valores de teste Z descritos abaixo. Os valores estatisticamente significativos (p < 0,05) encontram-se destacados.....	58
Tabela 5. Desenvolvimento embrionário dos ciclos. A variável escalar aproveitamento embrionário encontra-se apresentada com o valor absoluto médio: n (M) ± DP; a variável escalar taxa de alta qualidade embrionária está apresentada sob a forma de percentagem média: % (M) ± DP. O Teste Não Paramétrico de Wilcoxon foi realizado por não se cumprirem os pressupostos da normalidade. As taxas foram comparadas de forma emparelhada para cada caso tendo resultado em valores de teste Z descritos abaixo. Os valores estatisticamente significativos (p < 0,05) encontram-se destacados.	59
Tabela 6. Transferências a fresco (TE) e com embriões criopreservados (TEC). Teste de McNemar (a) para comparação do número de Transferências que envolveram embriões do grupo FIVc ou de ICSI, incluindo as 10 transferências que envolveram embriões de ambos os grupos (Mista). O número de embriões transferidos cuja origem foi FIVc ou ICSI, incluindo também transferências mistas foi analisado recorrendo ao teste Não Paramétrico de Wilcoxon (Z). Os valores estatisticamente significativos (p < 0,05) encontram-se destacados.....	60
Tabela 7. Vitrificação de embriões excedentários. (a) Teste de McNemar para comparação do número de Vitrificações que envolveram embriões do grupo FIVc ou de ICSI, incluindo os ciclos com vitrificação mista de embriões. O número de embriões	

transferidos cuja origem foi FIVc ou ICSI, incluindo também as vitrificações mistas foi analisado recorrendo ao teste Não Paramétrico de Wilcoxon (Z). Denota-se que foram realizadas 21 vitrificações envolvendo 1 embrião de FIVc e 1 embrião de ICSI. Os valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) encontram-se destacados..... 63

Tabela 8. Número de embriões vitrificados relativo a cada método. A análise do teste de Wilcoxon permitiu comparar o número de embriões vitrificados de cada método, em exclusivo e, estes com a vitrificação mista. Os valores estatisticamente significativos considerados quando $p < 0,05$ encontram-se destacados. (*) O valor ajustado de p representado é aproximadamente 1. 64

Tabela 9. Testes com resultado positivo de gravidez. Foram incluídos resultados de TE e TEC para o cálculo cumulativo. A tabela de contingência do Qui-Quadrado (χ^2) reflete os casos positivos absolutos (n) de teste hCG para determinado método do qual foi realizada a transferência embrionária. Entre parêntesis está representada a dada taxa em % que corresponde à soma de valores positivos sobre o total de transferências realizadas, segundo o determinado método. Não foram detetados valores de p significativos a um nível de significância de 5%..... 65

Tabela 10. Parâmetros laboratoriais de sucesso comparados entre FIVc e ICSI nos ciclos mistos nos diferentes grupos etários femininos. Os resultados foram obtidos após uma análise de Teste t para amostras emparelhadas ou, o Teste de Wilcoxon (Z) nos casos em que não foram atendidos os pressupostos da normalidade. Os valores estatisticamente significativos considerados quando $p < 0,05$ encontram-se destacados. 67

Tabela 11. Parâmetros laboratoriais de sucesso comparados entre FIVc e ICSI nos ciclos mistos considerando a sobpopulação de casais em que o fator de infertilidade foi diagnosticado como feminino. Para a Taxa de Fecundação e a Taxa de Alta Qualidade Embrionária os valores encontram-se apresentados segundo a % $M \pm DP$. O Aproveitamento embrionário está representado pelo valor absoluto, $n \pm DP$. O Teste Não Paramétrico de Wilcoxon (Z) foi realizado por não se cumprirem os pressupostos da normalidade. Não foram detetados valores de p significativos a um nível de significância de 5%. 68

Tabela 12. Anexo 1. Número de transferências realizadas em TE e TEC para cada método. Por linha estão representados o número de TE e TEC realizadas por cada método com o número de embriões respetivo a cada condição entre parêntesis. O Total representado na última linha descreve o número total de transferências por método e respetivo número de embriões entre parêntesis. O Total representado na

coluna à direita representa o número total de transferências realizadas em TE e TEC e
respetivo número total de embriões transferidos..... 104

Tabela 13. Anexo 2. Fase de desenvolvimento embrionária do total de 61
transferências realizadas, com um total de 86 embriões transferidos, 47 embriões de
FIVc e 19 de ICSI e 20 embriões. As transferências podiam englobar uma das 3
opções: embriões derivados apenas de FIVc, apenas de ICSI ou transferência mista, 1
embrião derivado de FIVc em conjunto com 1 derivado de ICSI. A escolha é baseada
no(s) melhor(es) embrião(ões) disponível(eis) dependendo da fase de
desenvolvimento e qualidade embrionária e não do método no qual o embrião teve
origem. Por coluna está representado o nº de embriões transferidos de determinado
método para cada fase de desenvolvimento com a percentagem face ao nº total de
embriões transferidos desse método. O Total representado na última linha descreve o
número total de transferências por método e respetiva percentagem relativa. O Total
representado na coluna à direita representa o número total de transferências por fase
de desenvolvimento embrionário. 105

Tabela 14. Anexo 3. Qualidade dos embriões selecionados para transferência
embrionária. Por coluna está representado o número de transferências realizadas de
determinado método para cada fase categoria de qualidade embrionária e, entre
parêntesis, a percentagem face ao nº total de embriões transferidos desse método. O
Total representado na última linha descreve o número total de transferências por
método. O Total representado na coluna à direita representa o número total de
transferências por categoria de desenvolvimento embrionário..... 106

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Relação entre a fase de cultura embrionária e o método de fertilização no momento da transferência, em termos de valor percentual de transferências realizadas (%). O cálculo resultou do quociente entre o número de transferências com embriões de determinada fase de cultura de cada método e o total de transferências realizadas com embriões com origem no dado método. O teste exato de Fisher não revelou diferenças significativas entre os diferentes grupos (valores de $p > 0,05$)..... 62

Gráfico 2. Relação entre a qualidade embrionária e o método de fertilização no momento da transferência, em termos de valor percentual de transferências realizadas (%). A transferência embrionária pode abranger a seleção de 1 ou 2 embriões, baseados na disponibilidade embrionária, conforme a qualidade e fase da cultura. Através de uma tabulação cruzada com o teste Exato de Fisher foi possível realçar um maior número de transferências envolvendo embriões selecionados originários de FIVc com qualidade embrionária B ou quando transferido 1 embrião tipo B em conjunto com 1 embrião tipo C em comparação com embriões de ICSI da mesma categoria. As letras diferentes **a** e **b** representam diferenças estatisticamente significativas ($p=0,014$).....**Erro! Marcador não definido.**

Gráfico 3. Anexo 4. Relação do fator idade feminina no aproveitamento embrionário de acordo com os métodos de fertilização nos ciclos mistos. Os dados refletem o aproveitamento embrionário em valor absoluto (n) incluindo o Desvio Padrão representado pelas barras de erro. O estudo da influência da idade feminina no aproveitamento embrionário com o Teste de Kruskal-Wallis revelou diferenças significativas, representadas pelas letras diferentes (**a** e **b**) apenas para o aproveitamento de embriões de ICSI ($H=10,002$; $p=0,007$). Registou-se, por meio de comparações múltiplas entre grupos, um decréscimo entre o grupo <30 anos e o grupo 31-35 ($H=25,167$; $p= 0,006$) e entre o primeiro e para pacientes de idade mais avançada ($H= 14,956$; $p= 0,036$)..... 107

Gráfico 4. Anexo 4. Relação do fator idade feminina na taxa de fecundação de acordo com os métodos de fertilização nos ciclos mistos. A variável categórica idade feminina encontra-se dividida em 3 subgrupos: < 30 anos considerada jovem (N= 6); 31-35 anos (N= 8); > 35 anos considerada avançada (N= 44). Os dados refletem a taxa de fecundação média em % incluindo o Desvio Padrão representado pelas barras de erro. Para o estudo da influência da idade feminina na taxa de fecundação o Teste de Kruskal-Wallis não revelou quaisquer diferenças significativas entre os grupos etários,

tanto para ovócitos fertilizados por FIVc ($H=0,118$; $p= 0,943$) como por ICSI ($H= 4,619$; $p= 0,099$). 107

Gráfico 5. Anexo 4. Relação do fator idade feminina na taxa de alta qualidade embrionária de acordo com os métodos de fertilização nos ciclos mistos. Os dados refletem a taxa de alta qualidade embrionária em % incluindo o Desvio Padrão representado pelas barras de erro. O estudo da influência da idade feminina na melhor qualidade dos embriões com o Teste de Kruskal-Wallis revelou diferenças significativas, representadas pelas letras diferentes (**a** e **b**) apenas para o aproveitamento de embriões de ICSI ($H=8,429$; $p=0,015$). Registou-se, por meio de comparações múltiplas entre grupos, um decréscimo entre o grupo <30 e o de 31-35 anos ($H=22,683$; $p= 0,015$). 108

Lista de Figuras

- Figura 1.** Aspiração do líquido folicular e o CCO com o auxílio de uma agulha transvaginal ecoguiada no momento da punção. Adaptado de Girsh (19). 12
- Figura 2.** Procedimento de FIVc. A seta aponta para espermatozoides móveis após processamento e capacitação da amostra espermática. Imagem cedida pelo CRI-MR do CHUSJ..... 13
- Figura 3.** ICSI. A pipeta de sustentação, do lado esquerdo permite posicionar o ovócito (H). A pipeta de microinjeção permite seleccionar o espermatozoide previamente immobilizado (M). A microinjeção é realizada preferencialmente numa posição perpendicular ao GP. A entrada da pipeta ao atingir o centro do ovócito, aproximadamente, causa o rompimento do mesmo, permitindo a aspiração e expulsão do citoplasma juntamente com o espermatozoide (seta). Estes eventos desempenham uma função crítica na ativação do ovócito. Captação cedida pelo CRI-MR do CHUSJ. 14
- Figura 4.** (A) É visível o conjunto das camadas de células foliculares que formam a camada granulosa ou Cumulus-coroa-ovócito antes da desnudação. A camada mais externa designa-se por *cumulus oophorus* e a mais interna a *coroa radiata*. (B) Após este processo é possível a observação do ovócito. É possível identificar a maturidade do ovócito (MII) com a presença de 1 GP bem definido no EPV com a camada protetora a rodear, a ZP. Imagens cedidas pelo CRI-MR do CHUSJ. 18
- Figura 5.** Zigoto com fecundação normal, apresentando 2 GP e 2 PN de tamanho semelhante, membranas bem definidas e justapostos com localização central. Imagem cedida pelo CRI-MR do CHUSJ. 20
- Figura 6.** Embriões em fase de clivagem. (A) Embrião de Dia 2 de desenvolvimento com 4 blastómeros com 1 núcleo bem definido em cada um. (B) Embrião de Dia 3 com 8 blastómeros. Imagem cedida pelo CRI-MR do CHUSJ. 21
- Figura 7.** Mórula em compactação. O limite das células já não é praticamente distinguível e as junções intercelulares tornam-se mais fortes, evidenciando grande adesão celular. Imagem cedida pelo CRI-MR do CHUSJ. 23
- Figura 8.** Blastocistos. (A) É visível um blastocisto expandido em Dia 5 de desenvolvimento. A massa celular interna encontra-se bem definida e a trofoectoderme constitui algumas células individualizadas. (B) Um blastocisto totalmente expandido com a ZP fina e pouco visível. A massa celular interna está bem compacta e observa-se a trofoectoderme com várias células bem definidas, sendo notável o núcleo no interior de algumas delas. (C) Um blastocisto em Dia 6 a eclodir,

expulsando o embrião para fora da ZP, cuja espessura se encontra ainda aumentada. Imagens cedidas pelo CRI-MR do CHUSJ..... 24

Figura 9. Representação ilustrativa do transporte do embrião pela trompa de Falópio até ao corpo e implantação no endométrio uterino. Adaptado de Moore, Persaud (1).28

Figura 10. Ao Dia 3 de cultura é realizada uma abertura numa porção da ZP de forma a facilitar a eclosão do embrião. Imagem cedida pelo CRI-MR do CHUSJ. 29

Figura 11. Biópsia da Trofoectoderme a um blastocisto em eclosão. A técnica é realizada num microscópio invertido com recurso a uma pipeta de sustentação (seta branca) que posiciona o blastocisto com a MCI o mais afastada possível do local de biópsia. A pipeta de Biópsia (seta preta) aspirará as células selecionadas após aplicação de pulsos de laser para corte das ligações intercelulares de forma a isolar a massa de células selecionada. Imagem cedida pelo CRI-MR do CHUSJ. 31

Figura 12. Esquema do procedimento de Fertilização mista FIVc/ ICSI no laboratório. Após recuperação dos CCO e do processamento da amostra espermática, os CCO disponíveis são divididos aleatoriamente para serem inseminados por FIVc ou ICSI cerca de 4h após a punção folicular. O grupo de ovócitos de ICSI são desnudados cerca de 3h-3,5h após a recuperação, sendo avaliados quanto à sua maturação nuclear. A fecundação é analisada cerca de 16h-18h após a inseminação, pelo que é nesse momento que é realizada a desnudação dos ovócitos de FIVc. 47

Figura 13. Realização de FIV. Os espermatozoides são adicionados ao meio onde se encontra o CCO em cultura para que ocorra a fertilização. É visível o ovócito (O) rodeado por todas as camadas envolventes que serão penetradas e dispersas pelo espermatozoide. 48

Figura 14. Após a avaliação da Fecundação os CCO de FIVc são desnudados e passados, seguidamente, para a placa com meio apropriado à fase de clivagem (placa à direita). No caso do grupo ICSI, os zigotos são passados de uma placa semelhante à da direita para uma nova placa de meio renovado. Os zigotos são lavados em gotas maiores por sucessivas passagens e cultivados individualmente em gotas mais pequenas até ao Dia 3 de cultura. Cada placa contém no máximo 6 embriões e coberta por óleo mineral denso..... 50

Lista de Abreviaturas

ART	<i>ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY</i>
ASEBIR	ASOCIACIÓN PARA EL ESTUDIO DE LA BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN
CCO	<i>CUMULUS OOPHORUS- COROA RADIATA- OVÓCITOS</i>
CHUSJ	CENTRO HOSPITALAR UNIVERSITÁRIO DE SÃO JOÃO
CNPMA	CENTRO NACIONAL DE PROCRIAÇÃO MEDICAMENTE ASSISTIDA
CRI-MR	CENTRO DE RESPONSABILIDADE INTEGRADA - MEDICINA DA REPRODUÇÃO
DIP	DOENÇA INFLAMATÓRIA PÉLVICA
DNA	DEOXYRIBONUCLEIC ACID
EA	ECLOSÃO ASSISTIDA
EPV	ESPAÇO PERIVITELINO
FIVC	FERTILIZAÇÃO IN VITRO CONVENCIONAL
FTF	FALHA TOTAL DE FERTILIZAÇÃO
GNRH	<i>GONADOTROPIN-RELEASING HORMONE</i>
GP	GLÓBULO POLAR
HCG	HORMONA CORIÓNICA HUMANA
ICSI	MICROINJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDE
IIU	INSEMINAÇÃO INTRA UTERINA
MCI	MASSA CELULAR INTERNA
MII	METÁFASE II
OMS	ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE
ON	<i>OVERNIGHT</i>

PGT	<i>PREIMPLANTATION GENETIC TESTING</i>
PMA	PROCREAÇÃO MEDICAMENTE ASSISTIDA
PN	PRONÚCLEOS
RPM	ROTAÇÕES POR MINUTO
SHO	SÍNDROME DE HIPERESTIMULAÇÃO OVÁRICA
SOP	SÍNDROME DE OVÁRIOS POLIQUÍSTICOS
TE	TRANSFERÊNCIA EMBRIONÁRIA
TF	TROFOECTODERME
TEC	TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES CRIOPRESERVADOS
VG	VESÍCULA GERMINATIVA
ZP	ZONA PELÚCIDA

Capítulo I

Introdução

1. A infertilidade

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a infertilidade é definida como uma doença do sistema reprodutivo caracterizada pela ausência de gravidez clínica após 12 meses de relações sexuais regulares e desprotegidas (2). Esta doença pode caracterizar-se como primária ou secundária. A infertilidade primária consiste na ausência total de concepção pelo casal. Já a infertilidade secundária significa que, pelo menos um dos elementos do casal atingiu uma gravidez em algum momento, mesmo em caso de esta ser ectópica, isto é, fora do útero, ou tenha resultado em aborto (2).

Estima-se que cerca de 48 milhões de casais sejam atualmente afetados pela infertilidade (2, 3). Em Portugal, à semelhança do que acontece na Europa, esta doença já afeta cerca de 15% da população sexualmente ativa e, segundo a Sociedade Portuguesa da Medicina da Reprodução (SPMR), esta percentagem tem tendência a aumentar, já que surgem perto de dez mil novos casos por ano (4).

A conjugação de fatores como o estilo de vida das sociedades modernas e o adiamento da maternidade em prol, por exemplo, da carreira profissional, tem impactado negativamente na fertilidade (5, 6). Dessa forma, são cada vez mais os casais que se deparam com dificuldades em atingir uma gravidez natural (2, 7).

2. A Procriação Medicamente Assistida

2.1. Enquadramento Histórico e Epidemiológico

Os estudos conjuntos dos cientistas nos anos 60 e 70 sobre a reprodução e a reunião de condições para a cultura *in vitro* levaram a grandes avanços na área (7). O primeiro grande sucesso da Fertilização *in Vitro* (FIV) ocorreu no ano de 1978 com o nascimento da primeira bebé, Louise Brown (8). Desde, então verificou-se a dispersão das tecnologias da PMA a nível internacional (9).

A Procriação Medicamente Assistida (PMA) diz respeito ao conjunto de técnicas de tratamento aplicadas a casos de infertilidade conjugal realizadas em laboratório. Estas visam a concepção de uma gravidez de termo e o nascimento de um bebé saudável. A forte procura por estas metodologias demonstra a relevância individual, conjugal e até social que representa o projeto da parentalidade.

A PMA tem auxiliado milhões de pacientes em todo o mundo em busca de construir uma família, sendo já contabilizados mais de 8 milhões de bebés concebidos (10). Em 40 anos as taxas de implantação com embriões resultantes de FIV dispararam de 5% para mais de 50% (11, 12). Entretanto, os sérios riscos de gravidez múltipla e o Síndrome de Hiperestimulação Ovária (SHO) associados a protocolos pouco controlados de estimulação ovária foram praticamente resolvidos (9).

Foi a nível europeu que o número de tratamentos realizados em Reprodução Assistida aumentou mais entre os anos de 1997 e 2016, com um aumento registado de 5,3 vezes, quando comparado com os EUA, Austrália e Nova Zelândia (13). Estima-se que 5% das crianças nascidas em países europeus resultam de tratamentos de PMA, o que demonstra a relevância das técnicas atuais para a natalidade (7).

Em Portugal a primeira criança resultante de um ciclo de FIV aconteceu em 1986. A partir daí, surgiram outras abordagens, como a possibilidade de criopreservação de embriões, em 1990 e, mais tarde, em 1994 a Microinjeção Intracitoplasmática de Espermatozoide (ICSI), pela equipa dirigida pelo Prof. Doutor Alberto Barros. Atualmente, Portugal encontra-se, a nível tecnológico e científico ao nível de países mais desenvolvidos, graças ao desempenho das equipas profissionais. O grande avanço da PMA leva a que no nosso país sejam contabilizadas mais de 3% de crianças nascidas resultantes dos tratamentos (4).

2.2. Enquadramento Legal

O crescente impacto e expansão da PMA em todo o mundo tem gerado questões éticas, apelando à atualização constante de dados que facilitem o debate e construção do enquadramento legal adequado a cada país. Em Portugal, a primeira lei da PMA surgiu em 2006, originando a Lei n.º 32/2006, tendo sido fundada a entidade reguladora destes procedimentos, o Centro Nacional de Procriação Medicamente Assistida (CNPMA). Esta entidade define a aplicação das técnicas de PMA como um método subsidiário e não alternativo de procriação, aplicadas conforme o diagnóstico de infertilidade ou aplicado ao tratamento de doença grave ou de risco de transmissão de doenças de origem genética, infecciosa ou outras.

Os Centros habilitados a praticar as técnicas de PMA devem seguir condições exigidas no que diz respeito a organização, recursos humanos, instalações e equipamentos. Desta forma, pretende-se a mais alta qualidade nos serviços prestados, bem como o cumprimento de boas práticas laboratoriais e clínicas. Toda a

equipa deve ser qualificada e desenvolver experiência prática em técnicas de PMA. Os laboratórios devem ser periodicamente auditados no que respeita ao cumprimento de todos os fatores mencionados, incluindo a qualidade do ar. Esta deve ser específica e controlada respeitando também as condições de assepsia, de forma a proteger o processamento dos gâmetas e minimizar os riscos de contaminação (14, 15).

2.3. Bioética na aplicação das técnicas

A crescente procura por estas técnicas em PMA tem levantado questões relativamente à saúde e desenvolvimento dos seus descendentes, levando a crer que haveria um risco aumentado relativamente a crianças concebidas naturalmente. Porém, não se verifica uma diferença significativa no risco de desfechos perinatais, parto prematuro nomeadamente hemorragias pós-parto, baixo peso, malformação neonatal (16-18). Para além disso, os descendentes de FIVc ou ICSI apresentam um desenvolvimento normal, sem apresentar qualquer alteração cognitiva, motora ou a nível de desenvolvimento social e emocional (19). Segundo revisão bibliográfica, confirma-se que os procedimentos de FIV atualmente são seguros, sendo o reflexo de melhorias nas práticas laboratoriais de maior qualidade, incluindo a vitrificação, melhorando as taxas de gravidez cumulativa por ciclo (20).

2.4. Abordagem ao casal infértil

Perante a dificuldade na conceção, o casal deve ser encaminhado a um centro de PMA. O estudo deve iniciar, geralmente, após decorridos 12 meses de infertilidade em mulheres com idade inferior a 35 anos ou aos 6 meses em idade igual ou superior a 35 (21).

A abordagem inicial inclui a história clínica de ambos os membros e a realização de exames físicos (6). Estes permitirão ao corpo clínico a identificação dos fatores associados à etiologia da infertilidade do casal em prol de um tratamento mais direcionado.

A história clínica deve incidir sobre a duração da infertilidade, a regularidade dos ciclos menstruais, os métodos de contraceção utilizados, histórico cirúrgico, possível existência de infeções sexualmente transmissíveis e a frequência das relações sexuais. O planeamento das relações sexuais deve ocorrer considerando o período fértil do ciclo menstrual que, aumenta a probabilidade de ocorrer uma gravidez

espontânea (fecundidade). Para além disso, é necessário avaliar a existência de histórico familiar de infertilidade, presença de mutações genéticas e a ocorrência de patologias do aparelho reprodutor ou endócrino, que tais serão abordadas mais adiante.

2.4.1. Idade

A idade é considerada um fator não patológico importante, sendo a feminina o principal, considerando que o pico de fertilidade é atingido aos 25 anos (6). A partir dos 30 anos a capacidade de conseguir uma gravidez sofre um decréscimo que se acentua a partir dos 35 (22). Esta diminuição da fertilidade está associada a um esgotamento acelerado de ovócitos, bem como o seu envelhecimento, impactando na qualidade ovocitária (23, 24). Tais aspetos estão relacionados com uma diminuição da probabilidade de implantação e, conseqüente aumento da ocorrência de aborto espontâneo (19, 24). Dados recentes indicam que mais de 40% das mulheres em ciclos de PMA têm idade superior a 38 anos (23, 25). Sabe-se que nestes contextos, características como a diminuição da qualidade ovocitária são consideradas comuns estando relacionadas com um potencial decréscimo da fertilização (19). De facto, foi identificada uma relação entre a idade feminina e a arquitetura do fuso meiótico. Mais concretamente, existem evidências de que mulheres com idade avançada apresentam menor densidade dos microtúbulos que constituem o fuso meiótico (20). Esta instabilidade do fuso favorece o estabelecimento de ligações incorretas entre as cromátides irmãs durante a meiose II (26). Tal evento parece estar associado a um maior risco para produzir embriões aneuploides (24, 26, 27) aproximando-se de uma taxa de 50% quando a idade se aproxima dos 40 anos (26). Contudo, este mecanismo ainda não está completamente esclarecido.

Apesar de não estar definida uma interrupção clara da capacidade reprodutiva, a idade masculina é um fator que tem sido cada vez mais valorizado como impactante na fertilidade (28). A idade avançada do homem tem um efeito negativo na concentração, motilidade e na morfologia dos espermatozoides (29-31). Tal parece ser o resultado de fatores como o decréscimo do número e função das células de Leydig, a diminuição dos níveis de testosterona e, conseqüentemente impacto na espermatogénese (29). Paralelamente, o envelhecimento ao nível das glândulas anexas, como a vesícula seminal e a próstata pode impactar no volume do ejaculado (29). Para além disso, o avanço da idade masculina é reconhecido como fator crítico para a integridade do DNA espermático, tendo sido associado a um índice de fragmentação mais elevado

(30, 31). Mais concretamente, o núcleo dos espermatozoides tende a apresentar níveis desproporcionalmente baixos de cromatina condensada, relacionados com a presença anómala de metilação e histonas (28). Esta imaturidade nuclear anormal das células reflete-se em maiores falhas durante os ciclos de FIV e atrasos no desenvolvimento embrionário (30, 32). Para além disso, foram reportadas maiores taxas de abortamento em casais em que o elemento masculino tinha idade superior a 40 anos (33).

2.4.2. Fatores exógenos e estilo de vida

O estilo de vida do casal moderno atual será, em parte responsável pelo insucesso reprodutivo. Os hábitos alimentares desequilibrados associados a obesidade podem afetar o metabolismo e a regulação hormonal com um decréscimo nas taxas de gravidez (6). O tabagismo pode acelerar a incidência de Falência Ovárica Precoce (FOP), aumentar a incidência de abortamentos e de anomalias congénitas na descendência (34). Porém, nos homens afeta os parâmetros espermáticos e alterações genéticas nos espermatozoides (35). Além disso, o consumo de tabaco foi reconhecido como prejudicial para a qualidade dos gâmetas, afetando inclusive as taxas de sucesso de FIV associados a mau desenvolvimento embrionário (36). A exposição a poluentes ambientais demonstra cada vez mais um impacto negativo, nomeadamente pesticidas, compostos voláteis presentes em tintas e vernizes, ftalatos componentes de cosméticos e perfumes (2). A vida profissional pode também ser prejudicial, quando exigem, por exemplo, a exposição a elevadas temperaturas.

Além disso, a ansiedade, depressão e *stress*, impactam negativamente a fertilidade, afetando ainda a qualidade de vida (37). Casais em tratamento de PMA estão sujeitos a elevados níveis de *stress*, sendo por isso, imprescindível o acompanhamento psicológico em todo o processo.

2.4.3. Exame físico

O exame físico deve avaliar sinais de possíveis causas de infertilidade. A este nível podem ser avaliados o Índice de Massa Corporal (IMC), desenvolvimento dos caracteres secundários ou de outros órgãos como a tiroide que possam indicar alguma disfunção endócrina, ou outros sinais que possam incitar a presença de certas patologias. A consulta inicial, deve também incluir a realização de exames complementares de diagnóstico.

No caso do elemento masculino é requisitado um espermograma para uma análise da função masculina e despiste de causas masculinas associadas. Este estudo citobioquímico do esperma inclui diversas análises que permitem avaliar os principais parâmetros do ejaculado, seguindo as diretrizes mais recentes da OMS (38). Englobam-se os parâmetros macroscópicos como por exemplo cor, cheiro, liquefação, viscosidade, pH e volume. Adicionalmente, os parâmetros microscópicos, a motilidade, a concentração, morfologia e, aspetos como a presença de aglutinação ou outros elementos celulares (leucócitos e células da linhagem germinativa).

O estudo do elemento feminino envolve a realização de ecografia ginecológica transvaginal. Para o estudo da cavidade uterina é prescrita uma histerossalpingografia para despiste de oclusão tubária ou alterações na cavidade uterina. Caso não haja riscos para patologias das trompas é recomendada apenas a realização de uma histeroscopia diagnóstica, eficaz no diagnóstico e, caso necessário, tratamento de anomalias da cavidade intrauterina (39). O estudo hormonal ao 3º dia do ciclo menstrual para determinação da reserva ovárica é outro parâmetro solicitado, medido através de doseamentos de FSH, LH e níveis de estradiol com contagem de folículos antrais. É também pertinente a avaliação da função ovulatória através do doseamento de progesterona na fase lútea ao 21º dia (6). O estudo a ambos os elementos do casal engloba ainda informações como o grupo sanguíneo e fator RH, VDRL para despiste de sífilis e outros marcadores biológicos como antigénios e anticorpos virais relevantes (VIH, hepatite B e C).

2.5. Fator feminino

Os fatores de infertilidade feminina identificáveis mais comuns são os distúrbios ovulatórios, endometriose, aderências pélvicas, obstrução tubária, entre outras anomalias tubárias e hiperprolactinemia (6).

As disfunções ovulatórias, responsáveis por cerca de 30 a 40% deste fator, podem, geralmente, relacionar-se com alterações no período menstrual (40). As patologias ovulatórias mais prevalentes são a Síndrome do Ovário Poliquístico (SOP) que afeta 5 a 10% das mulheres e a Insuficiência Ovárica Prematura, causada por um esgotamento precoce dos folículos antrais (6). Na génese destas irregularidades podem estar 3 causas principais distintas, por falência do eixo hipotálamo-hipófise, disfunção do eixo hipotálamo-hipófise-ovário ou por falência ovárica (2).

O fator tubário engloba as condições que impedem o transporte normal do ovócito e do espermatozoide através das trompas de Falópio. As principais causas de infertilidade por este fator incluem a Doença inflamatória pélvica (DIP), endometriose, tuberculose pélvica ou diverticulose tubar. A obstrução tubária pode originar hidrossalpinges (trompa de Falópio dilatada e cheia de líquido) que diminuem a taxa de sucesso da FIV (21). Por um lado, devido à obstrução à passagem espermática, por outro lado, pelo fluxo retrógrado do conteúdo tubário para a cavidade endometrial, criando um ambiente hostil à implantação (41). Assim, a histerossalpingografia, um procedimento pouco invasivo que permite a visualização radiográfica do canal cervical, da cavidade uterina e do lúmen das trompas, torna-se atualmente indispensável para mulheres nestas condições, antes de iniciar tratamento em PMA com ciclo de FIV.

A DIP, bem como outras causas de fator tubar estão muitas vezes associadas a infecções por *Chlamydia trachomatis* e a *Neisseria gonorrhoeae*. Estas devem ser rapidamente disseminadas, pois são sexualmente transmissíveis e são causadoras de inflamação, danos e cicatrizes tecidulares (42).

A endometriose pode ser diagnosticada através de laparoscopia, um procedimento mais invasivo, mas com maior eficácia também no tratamento. Esta é uma patologia que afeta cerca de 30% das mulheres inférteis (6). Os mecanismos que podem estar na gênese desta patologia incluem a distorção anatômica secundária devido a aderências pélvicas, recessão cirúrgica, anomalias endócrinas e alterações imunológicas (6). Nesta condição crónica verifica-se a produção de substâncias envolvidas em processos inflamatórios e proliferação do tecido semelhante ao endometrial (epitélio e estroma) fora dessa zona (21). Por sua vez, os normais processos de ovulação, fertilização e implantação serão prejudicados (43).

As complicações cervicais estão relacionadas com malformações congénitas ou traumas no colo do útero que geram alterações ao muco cervical, prejudicando a fertilidade (6).

2.6. Fator masculino

Após análise em espermograma, os valores são comparados com os valores de referência da OMS permitindo o diagnóstico. Ao nível dos parâmetros microscópicos, pode identificar-se oligospermia ligeira ou grave (diminuição da concentração espermática) azoospermia (ausência de espermatozoides no ejaculado),

teratozoospermia (morfologia alterada) ou astenozoospermia (decréscimo na motilidade progressiva) (38).

A causa mais frequente de infertilidade masculina é explicada por disfunções testiculares que podem ser congénitas ou adquiridas (6). Nas primeiras estão incluídas causas como a criptocardia (falha na descida testicular para posição escrotal) e anomalias genéticas, sendo as mais comuns a síndrome de Klinefelter e as microdeleções do cromossoma Y. Como disparidades adquiridas podem resultar o histórico prévio de cirurgias que podem danificar a anatomia testicular, infeções, medicação recente e questões endógenas como varicocele (44). Esta última representa uma condição comum, reconhecida como impactante na produção testicular normal de espermatozoides, por alteração na função das células de Leydig (29). Também alterações hormonais resultantes de distúrbios ao nível das glândulas anexas devido, por exemplo, a cancros testiculares, estão relacionadas com disparidades na produção espermática (45).

3. Tratamentos

São várias as opções terapêuticas com o objetivo de tratar a infertilidade. Estas dividem-se em tratamentos de 1ª linha e tratamentos de 2ª linha. Na primeira, está incluída a Inseminação Intrauterina (IIU). Já os de 2ª linha dizem respeito às técnicas em que a junção dos gametas masculinos e femininos ocorre em ambiente laboratorial. Nestas estão incluídas a Fertilização *in Vitro* convencional (FIVc) e a Microinjeção Intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI). O tratamento deve iniciar pelo método menos invasivo, avançando para os mais complexos, caso necessário. Para a ponderação da terapêutica mais indicada é necessário recolher toda a informação revelada pela avaliação inicial aos elementos do casal e estes devem estar envolvidos nessa etapa. Assim, fatores como a idade, o estudo de infertilidade, dados anteriores de ciclo, efetividade do tratamento, segurança e custos financeiros associados são preponderantes para a escolha clínica.

3.1. Inseminação Intra Uterina

A IIU é uma técnica de PMA não invasiva, encarada como uma técnica de 1ª linha, visto que a fecundação ocorre no interior da cavidade uterina. Está especificamente indicada para situações de causa de infertilidade inexplicada, causas masculinas como ejaculação retrógrada, disfunção sexual, impotência de causa neurológica, a presença de anticorpos anti-espermatozoide ou volumes ejaculatórios reduzidos (46). Para além destes, é também adequada em casos de fator cervical ou endometriose leve. Na impossibilidade de utilizar espermatozoide do próprio parceiro, é possível recorrer a um dador. A perspetiva de sucesso da IIU é de 10-15% por ciclo (46).

Durante este processo a amostra espermática do parceiro é introduzida diretamente no útero com recurso a um cateter de inseminação. Essa amostra deve ser previamente processada de forma a separar o plasma seminal. Este contém fatores que impedem a capacitação espermática, assim como espermatozoides morfológicamente alterados, imóveis e outras células da linha germinativa (47). A capacitação envolve a alteração das proteínas de membrana do espermatozoide, facilitando mais tarde os processos de reação acrossómica e, posteriormente a fertilização (48).

Deste modo, é ultrapassada a primeira barreira à passagem dos espermatozoides – o muco cervical (19). Encontrando-se diretamente na cavidade uterina, as células masculinas começam a corrida já em direção às trompas de Falópio, onde ocorrerá a reação quimiotática. Durante esta reação as substâncias químicas produzidas pelas células foliculares induzem a atração ao ovócito. Os espermatozoides capacitados atravessam essas camadas (CCO) até atingir a ZP (47). Neste momento ocorrem uma série de alterações na permeabilidade da membrana do espermatozoide, bem como a concentração de íons intracelulares, fundamentais para a ligação específica ao ovócito (48). Incluem, portanto, a reação acrossômica, que permite a penetração do espermatozoide até o oolema e, posterior fusão dos dois gâmetas, culminando na ativação do ovócito.

3.2. Fertilização *in Vitro*

A Fertilização *in Vitro* diz respeito às técnicas que requerem a união dos gâmetas feminino e masculino fora da cavidade uterina, em ambiente *in vitro*. Por esse motivo, estas são já consideradas como Técnicas de PMA de 2ª Linha. Surgiram nos anos de 60 e 70, tendo evoluído ao longo do tempo (48).

Um ciclo de FIV requer um protocolo de estimulação hormonal da ovulação envolvendo a administração de gonadotrofinas. Deste modo, é ultrapassado o processo de dominância folicular e atresia dos restantes folículos, induzido o desenvolvimento multifolicular (19). Posteriormente, a administração de Hormona Coriônica Humana (hCG) induzirá a maturação final dos folículos, assim como o retorno da meiose, simulando o pico de LH do ciclo ovário natural. Este procedimento permite um maior recrutamento de folículos logo, maior probabilidade de recuperação ovocitária, e conseqüentemente, um aumento considerável das taxas de gravidez (19). No entanto, o protocolo deve ser controlado e adequado a cada paciente, evitando possíveis riscos como o aumento prematuro da LH ou a SHO (49). Esta última condição pode dever-se à hipersensibilidade à administração de hCG, produzindo um excesso de produtos vasoativos (ex. VEGF) pelas células da granulosa. Tal evento resultará no assincronismo da maturação ovocitária, podendo causar efeitos adversos graves para a paciente (19).

Cerca de 35-38 horas após a injeção com hCG será o momento de recuperação dos folículos que terão completado a sua maturação, encontrando-se em meiose II (MII).

Os ovócitos recolhidos durante a punção folicular são manipulados em laboratório e posteriormente inseminados com a amostra espermática masculina, previamente processada.

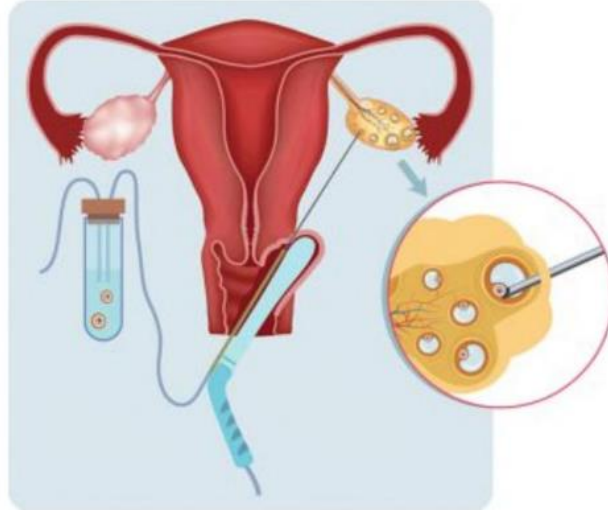


Figura 1. Aspiração do líquido folicular e o CCO com o auxílio de uma agulha transvaginal ecoguiada no momento da punção. Adaptado de Girsh (19).

É necessário ter em conta que estas técnicas requerem a manipulação dos gâmetas e embriões no Laboratório de Embriologia num ambiente de temperatura, humidade, luz, pressão e qualidade do ar controlada. O material biológico apenas deve ser manipulado em Câmaras de Fluxo Laminar, onde as bancadas permitam uma temperatura da cultura aproximada àquela encontrada *in vivo* a $\pm 37^{\circ}\text{C}$, no menor tempo possível. O interior das incubadoras deve armazenar os gâmetas e embriões a uma atmosfera controlada de $\pm 37^{\circ}\text{C}$, 5-6% de O_2 e 5-6% de CO_2 .

3.2.1. Fertilização *in Vitro* Convencional

Durante esta técnica a fecundação ocorre em condições laboratoriais, necessitando de obtenção dos gâmetas femininos e masculinos, como referido. Após a recuperação dos CCO na punção folicular e processamento da amostra masculina, estes são co inseminados juntamente com os espermatozoides em placa com meio adequado à sua cultura e fecundação (50).

Esta técnica surgiu com vista à resolução de vários fatores de infertilidade femininos, nomeadamente na tentativa de ultrapassar a impossibilidade de uma gravidez devido à obstrução ou ausência bilateral das trompas. Contudo, rapidamente a prática da FIVc estendeu-se a outras indicações não só de caráter ginecológico como também casos de infertilidade masculina leve causada por alterações no número, morfologia e motilidade dos espermatozoides (20). Atualmente está indicada para situações de ausência de trompas de Falópio, obstrução tubar, aderências, endometriose, fator cervical, fator masculino leve associado, ou insucesso em 3 ciclos prévios de IIU.

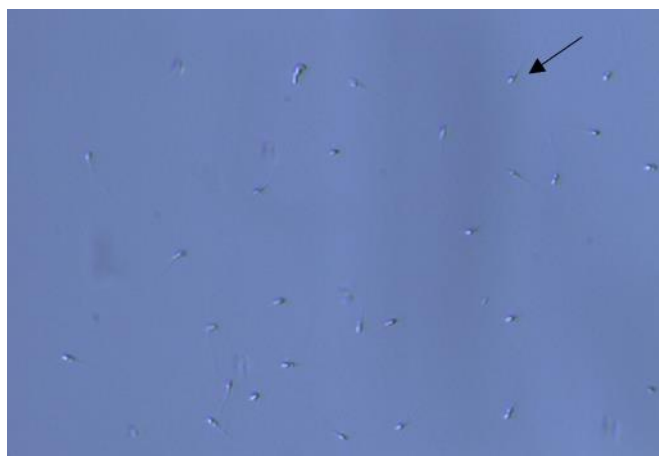


Figura 2. Procedimento de FIVc. A seta aponta para espermatozoides móveis após processamento e capacitação da amostra espermática. Imagem cedida pelo CRI-MR do CHUSJ.

3.2.2. Microinjeção Intracitoplasmática de Espermatozoide

A micromanipulação de ovócitos tinha já sido iniciada anteriormente, com recurso a uma técnica que pretendia alterar a zona pelúcida, ou uma abordagem mais mecânica para manipulação da Zona Pelúcida (ZP) e a injeção de espermatozoides para o Espaço Perivitelino (EPV). Muitas dessas técnicas mostravam-se limitadas para casos em que se verificavam especificamente disfuncionalidades ao nível dos gâmetas masculinos (9). No entanto, só o surgimento da ICSI no ano de 1992 por Palermo (51) permitiu uma técnica mais precisa e seletiva, evitando a polispermia (50).

Encarada como uma metodologia que permitiu um dos avanços mais impactantes a nível das técnicas da Reprodução Assistida, prometia contornar muitos dos obstáculos à conceção natural. A falta de motilidade em amostras espermáticas em alguns casos de astenozoospermia, ou casos de azoospermia, beneficiam da sua aplicação.

Permitiu ainda as primeiras concepções com espermatozoides obtidos diretamente do testículo obtidos após Biopsia Testicular (47).

Este procedimento é realizado num microscópio invertido com platina aquecida, base antivibratória e microinjetores, permitindo a manutenção da temperatura e estabilidade. Devem ser selecionados espermatozoides com melhor morfologia, indicadora de melhor qualidade (38, 47). É importante considerar que essa seleção dos espermatozoides é feita pelo embriologista, tendo em conta os parâmetros da OMS em vigor atualmente, sendo por isso uma seleção subjetiva (38). Os espermatozoides devem ser imobilizados previamente à injeção, evitando perturbações do fuso acromático do ovócito. Por outro lado, este é um passo importante para a descondensação da região da cabeça, promovendo a permeabilidade membranar e consequente libertação dos fatores citosólicos do espermatozoide para o início da ativação ovocitária (19). Estes passos representam um papel essencial na melhoria das taxas de fertilização (52).

Durante a injeção a posição da pipeta em relação ao GP deve ser tida em consideração, de forma a evitar danos no fuso acromático (19). De facto, a incorreta posição do Glóbulo Polar (GP) poderá provocar a deslocação do fuso meiótico, impactando a fertilização, a orientação do primeiro plano de clivagem e, consequentemente, o desenvolvimento embrionário (20). O espermatozoide é injetado diretamente no citoplasma do ovócito como é apresentado na **Figura 3**. A aspiração do citoplasma deve ser cumprida para confirmar a rotura da membrana do ovócito, bem como para estimular a ativação do mesmo (52).

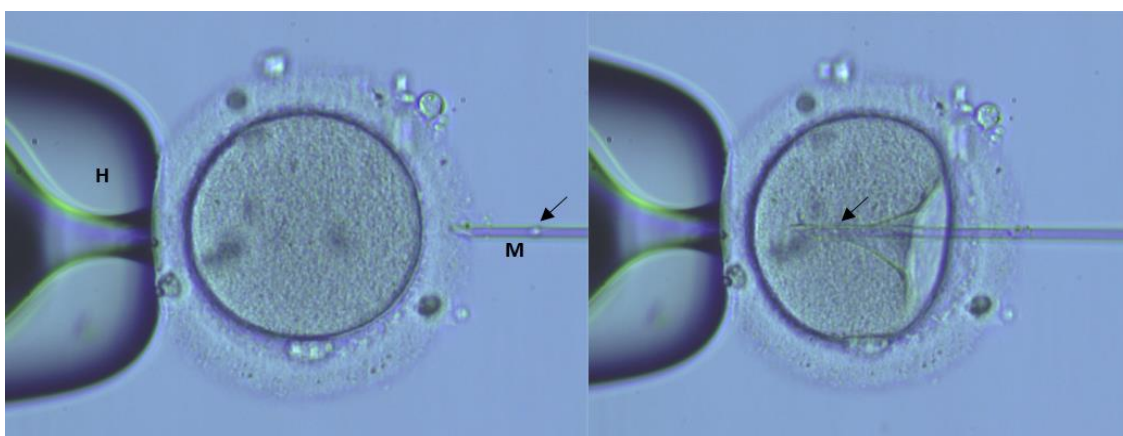


Figura 3. ICSI. A pipeta de sustentação, do lado esquerdo permite posicionar o ovócito (H). A pipeta de microinjeção permite selecionar o espermatozoide previamente imobilizado (M). A microinjeção é realizada preferencialmente numa posição perpendicular ao GP. A entrada da pipeta ao atingir o centro do ovócito, aproximadamente, causa o rompimento do mesmo, permitindo a aspiração e expulsão do citoplasma juntamente com o espermatozoide (seta). Estes eventos desempenham uma função crítica na ativação do ovócito. Captação cedida pelo CRI-MR do CHUSJ.

Assim, a técnica implica maior manipulação do ovócito, sendo por isso mais invasiva comparativamente à FIV convencional. Todavia, a sua segurança e efetividade têm vindo a ser demonstradas cientificamente (53, 54).

Esta metodologia começou então por ser a mais indicada para casos graves de infertilidade associada ao fator masculino, associados a baixas taxas de fertilização encontradas pela FIVc na presença de parâmetros espermáticos alterados (11). Porém, a sua indicação dispersou-se para casais sem fator de infertilidade masculino, mas com ocorrência de falha total de fertilização em ciclos prévios de FIVc com o objetivo de minimizar essa possibilidade. É também comumente utilizada quando é necessário recorrer a Preimplantation Genetic Testing (PGT ou em português Diagnóstico Genético Pré-Implantação, DGPI) e para a fertilização de ovócitos ou espermatozoides criopreservados (55). Contudo, a superioridade da ICSI relativamente à FIV convencional ainda não se encontra completamente esclarecida e, a reflexão sobre essa matéria será apresentada mais adiante.

4. Cultura e Desenvolvimento Embrionário

São diversos os fatores que estão envolvidos no sistema de cultura e que impactam no sucesso de implantação e gravidez. Não está incluído apenas a interação entre o embrião e o meio físico envolvente, mas também os próprios parâmetros laboratoriais associados. Este engloba os tipos de meios utilizados, o tipo de óleo utilizado para cobrir o ambiente do meio de cultura e os volumes dos mesmos, o material utilizado para a cultura, os equipamentos para a incubação, a qualidade do ar envolvente, entre outros. Todas estas componentes devem ser adequadas para o desenvolvimento de embriões viáveis. O objetivo deve ser, por isso, minimizar o *stress* induzido pelas condições laboratoriais, otimizando o sistema de cultura para aproximar do ambiente *in vivo* e procurar atingir os melhores resultados no ciclo (56).

É imprescindível a manutenção e o controlo das condições da cultura, nomeadamente a incubação, cuja temperatura deve de ser regulada para $\pm 37^{\circ}\text{C}$ de forma a simular as condições *in vivo* (20). Os níveis de CO_2 mantidos a 5-6%, de forma a manter um pH constante de 7,2-7,4 no meio de cultura, assegurando o melhor desenvolvimento embrionário. Os níveis de O_2 entre 5-6% simulam as condições de hipoxia

encontradas na cavidade uterina (57). Para além disso, as condições de humidade devem ser controladas e a luminosidade reduzida para menor perturbação embrionária (56).

O desenvolvimento embrionário é um processo contínuo, pelo que a monitorização deve ser uma ação constante e cuidadosa, realizada no menor tempo possível, evitando ao máximo qualquer tipo de perturbação. A extensão da cultura até à fase de blastocisto tem se mostrado positiva no que respeita a melhores resultados nas taxas de implantação e gravidez, bem como menos abortamentos (19). Assim, tem se verificado um foco crescente pelo aperfeiçoamento das condições laboratoriais que suportem a cultura longa, nomeadamente a utilização de meios de composição adequada.

O meio de cultura deve ser adequado a cada fase do desenvolvimento embrionário, respeitando os requisitos fisiológicos específicos do embrião, próximo ao encontrado *in vivo*. Os requisitos nutricionais do embrião são concordantes com as mudanças da fisiologia materna (**Tabela 1.**). Nomeadamente antes da compactação, este encontra-se no oviduto e 4 dias após a fecundação, após a compactação, quando se encontra já no útero (9). Nessa primeira fase o desenvolvimento embrionário é apenas guiado pelo genoma materno armazenado no citoplasma do ovócito. Com a passagem para a cavidade uterina é ativada a expressão de genes nucleares importantes para o suporte do seu desenvolvimento, diferenciação e implantação (19, 58).

Tabela 1. Requisitos fisiológicos do embrião em fase de clivagem, ocorrendo no oviduto materno *in vivo*, em comparação com as necessidades na fase após a compactação celular aproximadamente 4 dias após a fecundação, quando se encontra no útero materno.

Antes da compactação	Após a compactação
Baixa atividade biossintética	Elevada atividade biossintética
Baixo consumo de O ₂	Elevado consumo de O ₂
Necessidade de piruvato e lactato	Preferência nutricional por glicose
Aminoácidos não essenciais	Aminoácidos essenciais e não essenciais
Genoma materno	Genoma embrionário ativo

De forma geral, os meios devem ser dotados de aminoácidos, essenciais e não essenciais e macromoléculas (9). Contudo, podem ser utilizados dois tipos de meios distintos, os sequenciais ou apenas um meio único.

As composições químicas dos meios sequenciais respeitam as necessidades metabólicas do embrião. Ou seja, estes devem ser adaptados ao estado específico do embrião mimetizando a disponibilidade de nutrientes do trato reprodutivo materno. Assim, implica que, inicialmente, na fase de clivagem, enquanto o desenvolvimento é guiado pelo genoma materno e ocorre na trompa, o meio deve conter piruvato e lactato como principal requisito para o metabolismo (20). Enquanto, após a compactação, a partir do 4º dia de cultura, verifica-se um aumento da atividade metabólica, e, por isso, o meio deve ser alterado, constituindo a glicose como hidrato de carbono preferencial (9).

Em contrapartida, a utilização de meios contínuos permite ao embrião selecionar quando e quais os nutrientes que necessita em determinada etapa, pelo que fornecem todos os compostos de forma equilibrada (20). Portanto, a sua composição não é específica ao estado do embrião.

Todos os fatores envolvidos na cultura implicarão na qualidade embrionária, que deve ser continuamente avaliada (59). A avaliação morfológica, apesar de ser propensa a variabilidade entre observadores, continua a mais praticada (3, 60) e pode ser uma ferramenta prognóstica na predição da ploidia (19, 61, 62). No presente projeto, a avaliação morfológica é realizada utilizando o protocolo de classificação da ASEBIR (63), baseando-se nos parâmetros de cada fase do desenvolvimento embrionário e a relação com o seu potencial de implantação. Para além disso, estão documentados os tempos específicos para avaliação das diferentes etapas do desenvolvimento embrionário, tendo como referência a hora da inseminação (64).

4.1. Dia 0 - Monitorização do ovócito

A avaliação da qualidade ovocitária é baseada no aspeto dos CCO, bem como a morfologia do citoplasma e aspetos extracitoplasmáticos como a ZP, a presença de 1 GP e o EPV (19). Esta monitorização só é possível após a desnudação da matriz extracelular da *coroa radiata* e *cumulus*, já que estas camadas dificultam a visualização e representam fracos marcadores de maturidade (65, 66). Essa remoção geralmente ocorre antes da inseminação em caso de ICSI, pelo que a observação se torna mais desafiante durante a FIV convencional.

A desnudação é um procedimento que engloba a combinação de um tratamento químico e mecânico. A fase química é realizada recorrendo à enzima hialuronidase recombinante humana. Esta degrada o ácido hialurónico responsável pelas ligações celulares estabelecidos entre as várias camadas que formam a granulosa, a *coroa radiata* e *cumulus oophorus* (66, 67). Posteriormente, os ovócitos são lavados em meio de cultura com uma pipeta adequada para a desnudação mecânica.

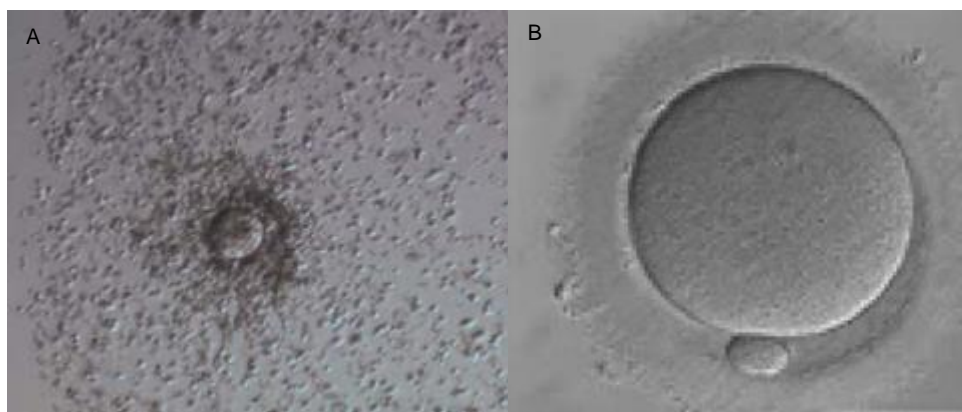


Figura 4. (A) É visível o conjunto das camadas de células foliculares que formam a camada granulosa ou Cumulus-coroa-ovócito antes da desnudação. A camada mais externa designa-se por *cumulus oophorus* e a mais interna a *coroa radiata*. (B) Após este processo é possível a observação do ovócito. É possível identificar a maturidade do ovócito (MII) com a presença de 1 GP bem definido no EPV com a camada protetora a rodear, a ZP. Imagens cedidas pelo CRI-MR do CHUSJ.

A presença de 1 GP no EPV é geralmente indicativa de maturidade nuclear, já que a sua extrusão ocorre no momento de recomeço da meiose com entrada em meiose II (19). A morfologia normal do GP foi associada como preditor de boa qualidade embrionária após FIV, bem como maior probabilidade de atingir a fase de blastocisto (68). A presença de glóbulos polares anormais poderá ser indicativa de anomalias celulares e moleculares, visto que este está relacionado com a formação do fuso meiótico e o ciclo celular (19).

A sincronia da meiose em conjunto com a maturação citoplasmática é relevante para a fertilização, visto que o oposto pode resultar em anomalias morfológicas (69, 70). A maturação citoplasmática inclui todos os eventos que preparam o ovócito para uma fecundação bem sucedida, desde a aquisição da ZP, regulação mitocondrial, síntese de proteínas envolvidas no crescimento do ovócito e alterações do citoesqueleto (19). Um ovócito MII apresenta os cromossomas alinhados na região equatorial do fuso

meiótico, sendo este um fator imprescindível para a fecundação e a correta divisão meiótica (26). A recuperação, manipulação e incubação destas células deve ser cuidadosa, visto que os microtúbulos do fuso são estruturalmente sensíveis a qualquer perturbação química ou física, podendo resultar em consequências deletérias para a organização dos cromossomas (19).

O tamanho do ovócito quando muito superior ao normal ($> 200 \mu\text{m}$) geralmente reflete anomalias genéticas. Para além disso, um GP de grande tamanho é também indicativo de aneuploidias (60).

Apenas os ovócitos maduros podem ser fertilizados, logo, serão estes que seguirão o desenvolvimento *in vitro*. A percentagem de ovócitos maduros está relacionada com o tempo de administração de hCG, pelo que é recomendado que a recuperação ovocitária deve ocorrer 36 horas após (20, 71). Já no que respeita o tempo para a inseminação, ainda se levantam muitas questões. Por um lado, é possível que a incubação do ovócito com os CCO seja positiva para a maturação final do ovócito, devido à regulação e expressão de genes associados a essas camadas envolventes. Concretamente, as células foliculares do cúmulo estimulam a secreção de hormonas e fatores de crescimento, através de mecanismos de controlo parácrino, que promovem a maturação final dos ovócitos (72). Um estudo revelou que a incubação pode ocorrer durante 2-4h até a inseminação, o que poderá, mais tarde, melhorar a taxa de embriões de alta qualidade. Contudo, períodos mais alargados poderão aumentar a produção de espécies reativas de oxigénio, acelerando o envelhecimento do ovócito e a ocorrência de aneuploidias (73). Este mecanismo carece, porém, de investigação mais alargada.

4.2. Dia 1 - Fecundação e Formação do zigoto

A fecundação consiste numa série de acontecimentos moleculares e físicos coordenados. O processo começa com a entrada do espermatozoide, seguido de um conjunto de eventos tais como a ativação do ovócito, o retornar da meiose e, por último, a formação dos PN feminino e masculino, com a extrusão do segundo GP (1, 19). A avaliação da fecundação deve ser realizada 16 a 18 horas após o momento da inseminação (60).

Uma fecundação normal é então caracterizada pela presença de 2 PN e 2 GP. Situações raras como a presença de 1PN ou 3PN devem ser tidas em atenção. Zigotos com 1 PN, resultantes de fertilização por ICSI não devem ser considerados,

visto que podem estar associados a aneuploidias ou partenogénese (63). A partenogénese poderá ocorrer por ativação espontânea do ovócito, quando este se divide apenas com a contribuição do genoma materno, mostrando-se sem viabilidade de desenvolvimento (72). Já no caso de FIVc é necessário avaliar o progresso de um embrião com essa característica, considerando a possibilidade de fertilização tardia ou dos PN feminino e masculino já se terem fundido. A observação de zigotos com 3PN ou mais é significativa da presença de triploidia, pelo que não continuarão o desenvolvimento (60).

Para além do número é comum observar a simetria e a posição central dos PN no citoplasma, já que se mostra impactante para a rotação da cromatina e determinação celular (19). Adicionalmente, a localização dos percursos nucleares no interior dos PN deve ser alinhada à zona equatorial, junto ao seu local de justaposição das suas membranas, apresentando número (8 nucléolos densos) e tamanho semelhante, indicativo de conteúdo de material genético equilibrado (20, 60).



Figura 5. Zigoto com fecundação normal, apresentando 2 GP e 2 PN de tamanho semelhante, membranas bem definidas e justapostos com localização central. Imagem cedida pelo CRI-MR do CHUSJ.

4.3. Dia 2 e 3 da cultura – Embriões em fase de clivagem

A avaliação do dia 2 da cultura é realizada entre as 43 e as 45 horas após a inseminação e ao dia 3 é realizada entre as 67 a 69 após a inseminação (63). Nesta fase é possível classificar os embriões de acordo com a qualidade morfológica numa escala de A a D, estando estas categorias relacionadas com o maior ou menor potencial de implantação do embrião, respetivamente. A classificação morfológica é contínua, pelo que a categoria atribuída a dia 3 dependerá da obtida anteriormente, a dia 2.

Para cada embrião deve ser registado o número de blastómeros (19), sendo este um dos indicadores mais importantes para o potencial de desenvolvimento embrionário (60). Embriões com 4 células a dia 2 e, posteriormente, 8 células ao dia 3 apresentam maior potencial de implantação e taxas de nascimento. Aqueles que apresentam ritmos de clivagem mais lenta ou acelerada estão associados a menor taxa de implantação e maior taxa de aneuploidia (74).

Adicionalmente, o tamanho dos blastómeros é outro aspeto a ter em consideração, pelo que é utilizado o termo de estadio-específico atribuído a embriões com tamanhos dos blastómeros consistentes com o seu ciclo de clivagem (63). Neste caso, nos dias de cultura referidos os tamanhos dos blastómeros devem ser semelhantes entre si, caso contrário refletem um padrão de clivagem irregular e divisão assíncrona. Embriões com taxa de clivagem desequilibrada estão associados a menor potencial de implantação e distribuição irregular do material genético (20).

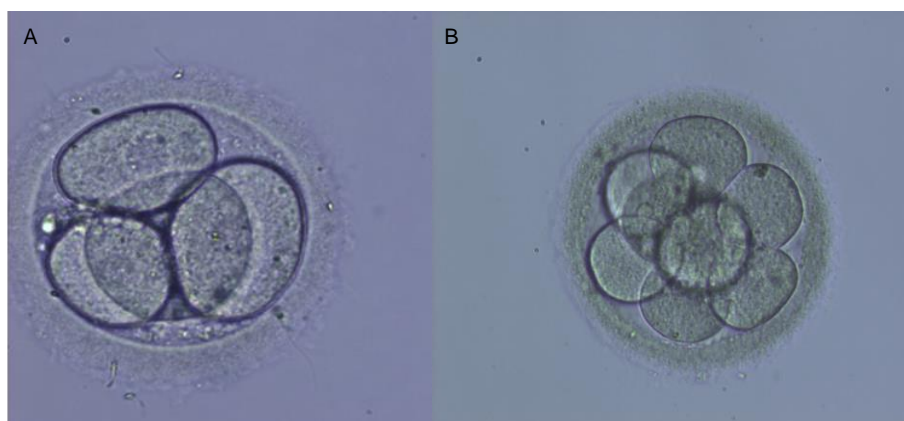


Figura 6. Embriões em fase de clivagem. (A) Embrião de Dia 2 de desenvolvimento com 4 blastómeros com 1 núcleo bem definido em cada um. (B) Embrião de Dia 3 com 8 blastómeros. Imagem cedida pelo CRI-MR do CHUSJ.

A fragmentação celular é relevante durante a avaliação morfológica destes embriões, devendo ser registado o seu grau, assim como o tamanho e distribuição dos fragmentos. Os fragmentos presentes num embrião poderão eventualmente ser reabsorvidos, recuperando a qualidade morfológica (63). Contudo a observação de um elevado grau de fragmentação, está relacionado com pior capacidade de formação do blastocisto e a taxa de implantação. Quando o seu grau é de cerca de 50%, o embrião não deve continuar o desenvolvimento *in vitro*, visto que se prevê uma taxa de implantação praticamente nula (60).

Os 3 fatores mencionados, o número dos blastómeros, o seu tamanho e o grau de fragmentação foram significativamente associados como os mais preditivos em termos de taxa de nascidos vivos. Outros aspetos comuns como a multinucleação, a presença de vacúolos e o aspeto da ZP também requerem análise nesta fase. A deteção de multinucleação nos blastómeros está relacionada com anomalias cromossómicas e maior taxa de abortamento (60). Embriões com mais de 50% dos blastómeros com vacúolos grandes não devem ser selecionados, considerando a sua taxa de implantação praticamente zero. Casos em que se observa uma ZP mais grossa ou escura, associado a condições como idade materna avançada, endometriose ou a resposta ao protocolo de estimulação ovárica, estão apenas relacionados com maior dificuldade na eclosão embrionária (12, 60). Desse modo, nestas situações pode ser equacionada a realização de **eclosão assistida** (7. Técnicas complementares aplicadas).

4.4. Dia 4 – Mórula

Cerca de 90 a 94 horas após a inseminação é observada esta fase em que inicia a quarta ronda das divisões mitóticas, a adesão e a compactação celular (60). Após o estado de 8 células, os blastómeros começam a aderir entre si, aumentando a superfície de contacto entre células vizinhas através de junções intercelulares, até não ser possível discernir as células individualizadas e consistir apenas numa massa compacta (1). A ativação do genoma embrionário é fundamental para estes processos (75). Para além da compactação e observação dos blastómeros são analisadas algumas anomalias características de mau prognóstico como a fragmentação e vacuolização.



Figura 7. Mórula em compactação. O limite das células já não é praticamente distinguível e as junções intercelulares tornam-se mais fortes, evidenciando grande adesão celular. Imagem cedida pelo CRI-MR do CHUSJ.

4.5. Dia 5 e 6 – Blastocisto

A polarização das células leva à formação de 2 tipos de células distintas, a trofoectoderme (TF) e a massa celular interna (MCI). Este processo conduz à cavitação, isto é, a formação de uma cavidade no interior do qual há a concentração de líquido, o blastocélio (1). Assim, o blastocisto de Dia 5 contém uma cavidade, a MCI que originará o feto e a TF que desenvolverá as estruturas extraembrionárias e a placenta (76).

Atualmente os aspetos mais relevantes a avaliar na fase de blastocisto são, de forma geral, a qualidade da MCI e a qualidade da TF (3). Em relação à trofoectoderme, são considerados o número de células que contém, a sua forma e a coesão entre elas. No momento de atribuição da classificação, no caso da utilizada no estudo, esta camada de células tem mais relevância do que a MCI (63). A MCI deve ser oval e compacta (64).

A pressão exercida pelo líquido acumulado induz a expansão do blastocélio e, conseqüentemente a diminuição do espessamento da ZP, atingindo o mínimo quando o blastocisto se encontrar totalmente expandido. O grau de expansão do blastocélio é um aspeto considerado na avaliação e está relacionado com uma boa taxa de implantação (60). Proteases libertadas pela TF serão responsáveis pela digestão da ZP, formando um canal no polo contrário ao que se encontra a MCI. Eventualmente, por decompressão e contractilidade, o blastocisto eclode, saindo da ZP, o que coincide aproximadamente com o dia 6 de desenvolvimento (1).

Nesta fase, ao contrário das anteriores, a classificação da qualidade morfológica do blastocisto é independente da evolução dos dias anteriores, baseando-se somente nas suas características no momento da avaliação (60).

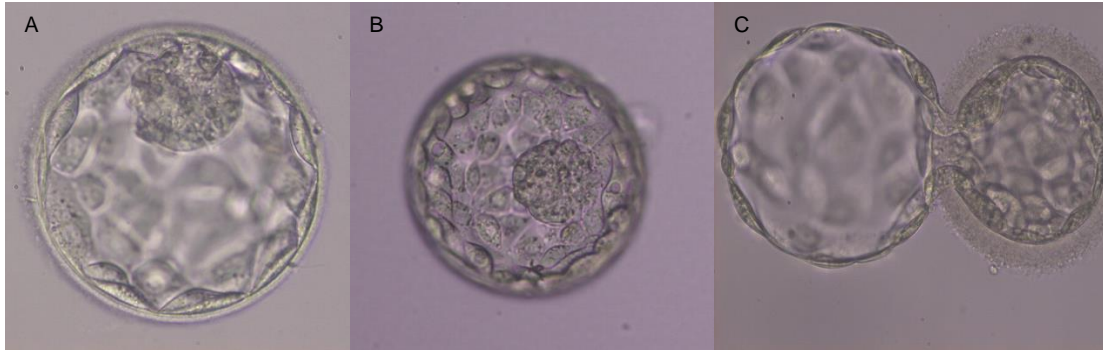


Figura 8. Blastocistos. (A) É visível um blastocisto expandido em Dia 5 de desenvolvimento. A massa celular interna encontra-se bem definida e a trofoectoderme constitui algumas células individualizadas. (B) Um blastocisto totalmente expandido com a ZP fina e pouco visível. A massa celular interna está bem compacta e observa-se a trofoectoderme com várias células bem definidas, sendo notável o núcleo no interior de algumas delas. (C) Um blastocisto em Dia 6 a eclodir, expulsando o embrião para fora da ZP, cuja espessura se encontra ainda aumentada. Imagens cedidas pelo CRI-MR do CHUSJ.

5. Seleção e transferência embrionária

Têm sido desenvolvidas diversas formas para a seleção embrionária, incluindo métodos metabólicos e genéticos. No entanto, as características morfológicas continuam a ser as mais praticadas no laboratório (62). A seleção de embriões com maior qualidade morfológica é um fator preditivo do potencial de implantação e, por isso, da probabilidade de atingir uma gravidez (3, 10, 77).

A transferência é o passo final no ciclo de FIV com vista a uma gravidez. Esta pode ser realizada em diversas fases do desenvolvimento embrionário, mais comumente em fase de clivagem, ao dia 3 ou no estado de blastocisto (dias 5 ou 6).

A extensão da cultura até à fase de blastocisto permite uma maior eficácia no que diz respeito à seleção do melhor embrião (75). Esta prática clínica permite a escolha de menos e melhores embriões para transferir, diminuindo a probabilidade de gravidezes múltiplas (78), associadas a elevados riscos para a paciente e os fetos (76, 79). Um blastocisto apresenta maior complexidade a nível celular, dispondo o seu genoma já ativo, pelo que o embrião que atinja esta fase deverá apresentar maior potencial para o desenvolvimento *in utero* (19, 78). De facto, a transferência nesta fase mimetiza o processo que ocorre em condições naturais durante a implantação, aumentando a sincronia entre as condições hormonais uterinas e o estado de desenvolvimento embrionário (9, 20). Além disso, na fase de blastocisto as contrações uterinas são menores, o que diminui a probabilidade de expulsão e perda do embrião, comparativamente a uma transferência realizada em fase de clivagem (80).

No entanto, é estimado que, apenas 40-60% dos ovócitos fertilizados atinjam a fase de blastocisto e, por isso, ao Dia 5 haverá maior risco de cancelamento do ciclo por indisponibilidade de embriões (60, 78). Efetivamente, em ciclos com baixa disponibilidade embrionária, a transferência nas fases iniciais pode ser uma opção para evitar tal situação (75, 78). Por outro lado, quando sujeitos a uma cultura longa podem estar associados a um maior risco de desenvolver alterações epigenéticas (81). Não obstante, a transferência de um blastocisto de boa qualidade demonstra maiores vantagens, apresentando melhores resultados em termos de taxas de implantação e gravidez, comparativamente à transferência com um embrião em fase de clivagem de boa qualidade (82, 83).

A eleição do número de embriões a transferir dependerá naturalmente da disponibilidade e qualidade dos embriões, como também da idade materna e se existe histórico de gravidez, entre outros fatores (19). A idade materna avançada reflete-se

num decréscimo da viabilidade embrionária relacionada com menor qualidade ovocitária e maiores anomalias genéticas associadas, traduzindo-se numa menor probabilidade de implantação e maior taxa de abortamento (23, 24, 84). Nestes casos, é possível a indicação de transferência de 2 embriões de forma a aumentar a probabilidade de implantação e gravidez (75, 85). Em contrapartida, casais com histórico de gravidez apresentam maior recetividade do endométrio, provando uma clara compatibilidade bioquímica entre esta camada do útero e o embrião, aumentando a possibilidade de uma nova conceção (86). Assim, a transferência de apenas 1 embrião apresenta elevada chance de implantar, reduzindo por outro lado o risco de gravidez múltipla (1).

De facto, o fator endometrial também apresenta elevada importância no sucesso da transferência embrionária. Atualmente, a recetividade endometrial é geralmente avaliada recorrendo a ecografia, de forma a verificar a sua espessura, o padrão do tecido e o fluxo sanguíneo endometrial (59). O doseamento de estradiol e progesterona é um método também muito utilizado. Por um lado, o estradiol induz a proliferação celular e os recetores de progesterona, esta última, promove o aumento da produção secretora pelas células do endométrio (20).

Por depender da conjugação de diversos fatores, não é ainda possível prever de forma precisa a capacidade de implantação de 1 embrião, mesmo que apresente boa qualidade morfológica. Logo, isto não significa que 2 embriões selecionados para transferir apresentem igual probabilidade de implantação, baseando apenas em evidências morfológicas. Contudo, em condições de cultura semelhantes é possível que 2 embriões do mesmo casal (mesma coorte) apresentem menor variabilidade genética e ambiental entre eles (87). Nesse sentido, têm surgido novos modelos computacionais de monitorização constante com recurso *time-lapse*, sem interromper a cultura permitindo a previsão, entre outros aspetos, do potencial de implantação de cada embrião (87, 88). Esta é uma tecnologia moderna que permite capturar imagens precisas de diferentes planos de focagem, obtendo uma perspetiva morfológica e cinética do desenvolvimento do embrião em tempos específicos (88, 89). Não obstante, o estudo contínuo de características morfológicas chave é um ponto essencial para a seleção de embriões num sistema simples, menos dispendioso e universal entre laboratórios, recorrendo a sistemas de classificação regulamentados (62).

Em suma, as decisões são dependentes da recomendação médica, dos embriologistas e do consentimento do casal, pelo que deve ser atualizada sempre que

necessário com o decorrer do ciclo. A seleção embrionária é, de facto, um passo crucial para a transferência e, consecutivamente para o desfecho do tratamento.

6. Implantação

A implantação consiste num processo altamente coordenado envolvendo a participação ativa do embrião e do endométrio. Requer, por isso, uma perfeita sincronia molecular e bioquímica entre ambos, englobando a fase da aposição (direcionamento do blastocisto em direção à parede do útero), ligação (facilitada por integrinas expressas pelo endométrio e o trofoblasto) e invasão (destruição da matriz extracelular e migração no estroma do endométrio). Aliado à seleção dos embriões de melhor qualidade, a recetividade do endométrio é um fator indispensável para o sucesso da implantação, representando uma contribuição de até 64% (75, 90). Este aspeto representa um forte impacto nas taxas de gravidez (85). O estado uterino permissivo corresponde apenas a um período reduzido, designado de janela de implantação, que ocorre cerca de 7 a 10 dias após a fecundação, coincidente com o pico da fase secretora. Nesta fase o útero encontra-se no seu máximo potencial de desenvolvimento, o que facilitará a libertação de substâncias reconhecidas pelo embrião, que irão promover o crescimento e diferenciação do embrião e a sua interação com o endométrio (20).

Após a invasão do estroma uterino ocorre a eclosão, processo no qual um grupo de células da TF liberta enzimas proteolíticas responsáveis pela digestão focal da ZP, passo essencial para a expulsão do embrião (1). Nesse momento é produzida a hormona hCG, responsável pela manutenção do corpo lúteo no ovário. Por sua vez, o corpo lúteo continua a produção das hormonas estrogénio e progesterona, que permitirão o crescimento uterino e a diferenciação das células do TF e MCI (20). Estas serão importantes para o crescimento fetal e o suporte da gravidez. A deteção da hCG permite a deteção da gravidez bioquímica (1).

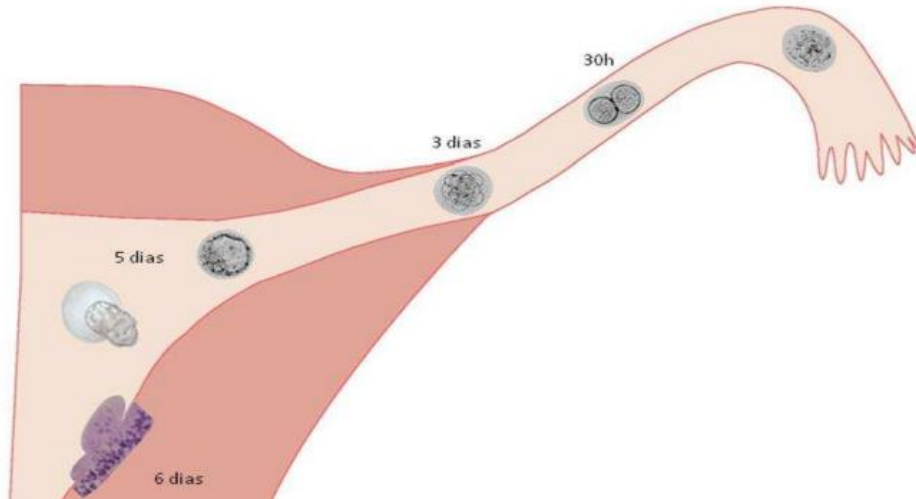


Figura 9. Representação ilustrativa do transporte do embrião pela trompa de Falópio até ao corpo e implantação no endométrio uterino. Adaptado de Moore, Persaud (1).

7. Técnicas complementares aplicadas:

7.1. Eclosão assistida

A ZP protege o embrião de outras células e microrganismos e é importante para a manutenção da integridade do embrião ainda em fase de pré compactação (20). Geralmente, com a expansão dos blastómeros, a acumulação de líquido no interior da cavidade do blastocisto e uma combinação de lisinas produzidas pelo embrião, esta vai se tornando mais fina (1).

Alguns embriões com a ZP mais grossa do que o normal podem apresentar atrasos ou falhas na realização da eclosão, o que ocorre, geralmente, na fase de blastocisto avançado. Por sua vez, este obstáculo pode impossibilitar a implantação no útero materno e, conseqüentemente, uma gravidez (1, 91). Isto ocorre comumente, em casos de idade materna avançada e eventualmente devido às próprias condições de cultura, bem como com a estimulação ovárica para tratamentos de FIV (91).

No laboratório, a Eclosão Assistida (EA) é recomendada não só para estes contextos, como também está indicada para casos de Biopsia Embrionária para PGT e em embriões criopreservados que podem apresentar enrijecimento da ZP (92). A EA consiste na abertura da ZP por meio de micromanipulação mecânica ou química para facilitar a saída do blastocisto e, ao mesmo tempo permitir a entrada de nutrientes (92,

93). Atualmente, esta técnica complementar é mais vulgarmente realizada com recurso a laser, recorrendo a poucos pulsos para abertura da ZP (**Figura 10.**) (9). Para seleção da área deve ser considerado o número de blastómeros, pelo que estes devem ser evitados ao máximo e, se possível, selecionar um local livre de células protegendo-as da possível perturbação do laser. No entanto, dados de estudos randomizados recentes revelam que os benefícios do uso da EA em ciclos de PMA, nomeadamente nas taxas de gravidez e nados vivos ainda não se encontram totalmente demonstrados e esclarecidos (92, 94). Entretanto, outros autores revelam um potencial efeito positivo na taxa de nados vivos em ciclos com TEC de embriões em fase de clivagem (95) e blastocistos (96).

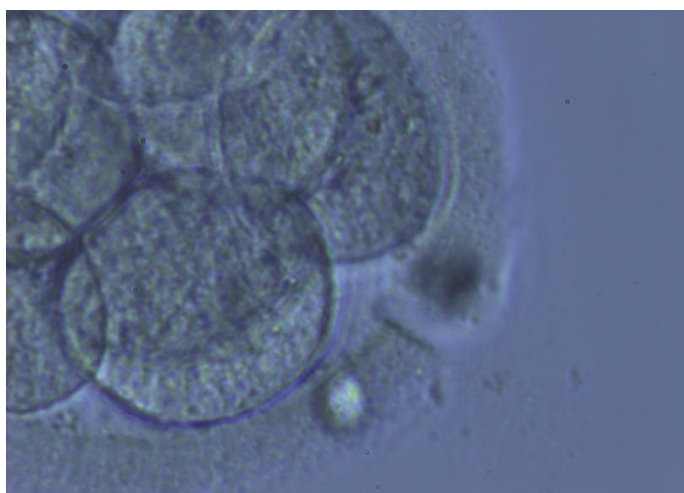


Figura 10. Ao Dia 3 de cultura é realizada uma abertura numa porção da ZP de forma a facilitar a eclosão do embrião. Imagem cedida pelo CRI-MR do CHUSJ.

7.2. *Preimplantation Genetic Testing (PGT)*

O desenvolvimento de técnicas de PGT tem possibilitado a casais portadores de doença genética o nascimento de um bebé saudável, permitindo identificar antecipadamente embriões com anomalias genéticas (93). O PGT pode estar indicado para diversas doenças, nas quais é necessário adaptar o teste genético de diagnóstico. Podem estar incluídas as doenças associadas aos cromossomas sexuais e aneuploidias para as quais é realizado PGT-A (*Preimplantation Genetic Test for Aneuploidies*) doenças monogénicas (causadas por um gene autossómico), nas quais se indica o PGT-M (*Preimplantation Genetic Test for Monogenic Disease*) ou anomalias cromossómicas estruturais, para as quais se efetua PGT-SR

(*Preimplantation Genetic Test for Structural Rearrangements*) (97, 98). Adicionalmente, pode estar indicado para outras situações, de entre os quais abortamentos de repetição, idade materna avançada ou falhas repetidas de implantação em ciclos prévios de FIV, sendo realizado, nestes casos, PGT-A para deteção de possíveis aneuploidias (93). Este é um método que requer a biópsia embrionária prévia para que sejam removidas células para análise genética podendo ser realizados os diferentes tipos:

Biópsia de glóbulo polar: é realizada antes ou depois da fecundação ao 1º GP ou a ambos, respetivamente. Contudo, em nenhuma deles é revela informação relacionada com o material genético paterno ou divisões mitóticas anómalas (97).

Biópsia em fase de clivagem: envolve a remoção de 1 a 2 blastómeros de um embrião com 6-10 blastómeros com EA prévia. No entanto, esta técnica apresenta elevado risco visto que acarreta a remoção de cerca de 30% do conteúdo celular do embrião (97). Noutra perspetiva, esta apresenta menor sensibilidade, podendo levar mais frequentemente a resultados inconclusivos ou erróneos (98).

Biopsia da trofoectoderme: são removidas várias células da TF para análise, sem perturbação da MCI, onde se encontram as células da linhagem fetal (**Figura 11.**) (97). A recolha de maior material genético que por um lado, possibilita uma maior precisão dos resultados e, por outro lado representa uma menor proporção do blastocisto, sem comprometer o seu desenvolvimento (93).

As células obtidas são posteriormente amplificadas pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), sendo atualmente mais frequente o recurso a Sequenciação de Nova Geração (NGS) permitindo um maior número de testes no menor tempo e custo (97).

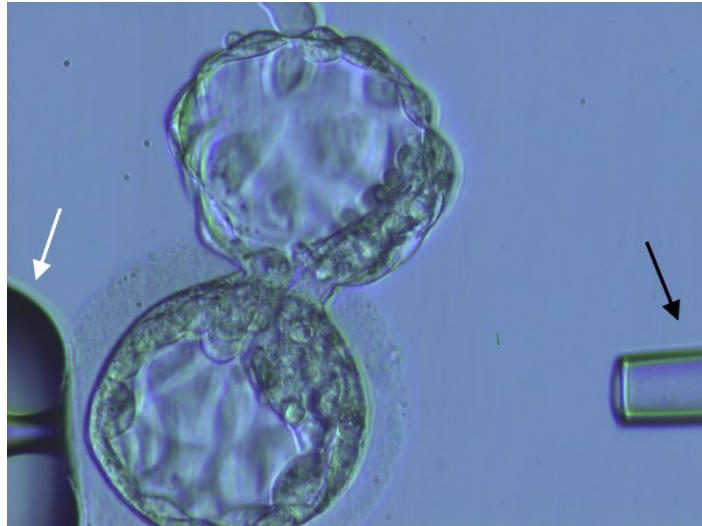


Figura 11. Biópsia da Trofoectoderme a um blastocisto em eclosão. A técnica é realizada num microscópio invertido com recurso a uma pipeta de sustentação (seta branca) que posiciona o blastocisto com a MCI o mais afastada possível do local de biópsia. A pipeta de Biópsia (seta preta) aspirará as células selecionadas após aplicação de pulsos de laser para corte das ligações intercelulares de forma a isolar a massa de células selecionada. Imagem cedida pelo CRI-MR do CHUSJ.

8. Criopreservação

Como apresentado anteriormente, a observação contínua da morfologia embrionária, aliada a todo um sistema otimizado de cultura torna possível privilegiar menos e melhores embriões para transferência a fresco no momento do ciclo. Por esse motivo, é muito comum ficarem embriões excedentários de boa qualidade que, não sendo usados no momento, podem ser criopreservados para serem, mais tarde transferidos.

Adicionalmente, a criopreservação de gâmetas e embriões permite preservar a fertilidade de forma segura, aumentando a eficácia dos ciclos de tratamento em PMA. Torna-se uma opção confiável quer seja em cenários de doença com realização de PGT por exemplo, ausência no dia de início de ciclo, ou qualquer outra limitação na recolha de gâmetas sem comprometer a saúde do paciente e a recuperação das células (99). Adicionalmente, em situações de risco de SHO, ou caso o endométrio não se encontre com o espessamento ideal e, por isso, não recetivo, é possível criopreservar todos os embriões viáveis para uma posterior transferência de forma segura (ciclos de *freeze-all* com TEC).

Atualmente, existem dois métodos principais para a criopreservação, a congelação lenta e a vitrificação. Ambos utilizam crioprotetores, isto é, substâncias presentes no meio de congelação que desempenham a função de substituir o conteúdo hídrico da célula. Estes agentes evitam a formação de cristais de gelo, porém, apresentam toxicidade elevada que poderá danificar as células (100). Estes representam os principais compromissos para o sucesso da criopreservação.

Por um lado, a congelação lenta implica uma redução lenta da temperatura até cerca de -30°C , juntamente com a exposição a uma baixa concentração de crioprotetores (100). Desta forma, ocorre o *seeding*, que consiste no crescimento controlado dos cristais, aumentando gradualmente a osmolaridade da solução extracelular, permitindo desta forma, a desidratação celular (101). Passado este limiar de temperatura, é feita uma rápida redução até aos -150°C . Na descongelação a amostra deve ser aquecida rapidamente. Neste caso, a desvantagem será a formação de cristais de gelo, capazes de causar danos a nível das membranas celulares (100).

A vitrificação implica uma congelação e descongelação muito rápida, envolvendo a solidificação das células até um estado vítreo sem ocorrer a cristalização (100). Neste processo são utilizados crioprotetores mais viscosos e em maior concentração, o que pode aumentar o risco de lesões osmóticas ou por toxicidade (100, 101). Contudo, a vitrificação de ovócitos ou embriões é um método recomendado e comumente praticado na clínica, por ser mais económico, simples e de rápida execução. Para além disso, apresenta maiores taxas de sobrevivência de ovócitos e embriões e maiores taxas de gravidez após transferência de embriões criopreservados (100).

9.A tendência ICSI em relação à FIV convencional

Desde o seu aparecimento, a ICSI surge como um forte avanço no tratamento da infertilidade masculina grave, apresentando elevada confiabilidade global. Contudo, o crescente sucesso registado em ciclos de ICSI parece ter criado um paradoxo, levando a crer que poderia ser aplicável a todos os pacientes inférteis (55). A utilização desta metodologia rapidamente se expandiu comparativamente ao da FIV convencional. É relatado que nos Estados Unidos a sua prática aumentou de 36,4% em 1996 para 76,2% em 2012 (11, 102, 103). Já no Médio Oriente essas taxas aproximam-se dos 100% (11, 102). Na Europa a técnica de ICSI superou o uso da FIV convencional a partir de 2002, atingindo os 73% dos ciclos em 2016 (13, 104). Curiosamente, a aplicação da ICSI tem aumentado especialmente entre casais sem fator masculino grave, mesmo com um estagnar nas taxas de infertilidade masculina nas últimas décadas (11, 55, 103, 105). Globalmente, a tendência crescente da ICSI representa já cerca de 70% para casais com infertilidade sem fator masculino grave (55). Contudo, este cenário revela ser controverso, visto que parece ainda não haver evidência suficiente que justifique essa abordagem (11, 55, 106, 107).

Quando os valores espermáticos são normais e não são registados outros fatores femininos associados ou Falha Total de Fecundação (FTF) prévia, o casal pode ser indicado para FIVc, visto que a motilidade, concentração e morfologia dos espermatozoides é considerada adequada à penetração dos CCO (103, 105) – **Tabela 2**. Em termos práticos, esta é uma técnica menos morosa e invasiva para os ovócitos. Em contrapartida, no caso de ICSI, o sucesso na fertilização está relacionado com a seleção de um espermatozoide móvel e morfologicamente normal para ser microinjetado (48, 108).

Tabela 2. Parâmetros representativos de uma amostra espermática considerada normal avaliada aquando da preparação para início de ciclo de FIV. Valores referidos por World Health (38).

Volume (mL)	≥ 1,5
Concentração (x10 ⁶ /mL)	≥ 15
Contagem total (x10 ⁶ /ejaculado)	≥ 39
Motilidade total (%)	≥ 40
Motilidade progressiva (%)	≥ 32
Morfologia normal (%)	≥ 4
Leucócitos (x10 ⁶ /mL)	1

Por outro lado, a ocorrência de FTF em ciclos individuais de FIVc pode também ser motivo de indicação para ICSI. São reportadas falhas de fecundação na ordem dos 3,52% a 20% no caso de FIVc, já para ICSI a taxa diminui para 1% até 3% (54, 109). Em caso de haver antecedentes de FTF é recomendado a utilização de ICSI de forma a reduzir o seu risco de recorrência (110, 111). No entanto, nestes casos, pode ser necessário investigar melhor a possibilidade de existir um fator masculino relacionado com fatores genéticos como a fragmentação do DNA (112).

A microinjeção permite contornar as barreiras naturais do ovócito, bem como o processo natural de seleção de espermatozoides, levantando maiores preocupações no que concerne ao seu caráter mais intrusivo. De facto, os processos biológicos naturais de ativação espermática e ovocitária, ligação à ZP e interação membrana espermatozoide-ovócito são ultrapassados (109). Mais concretamente, pode estar associada a aumentos de anomalias embrionárias com origem à seleção de espermatozoides com alterações genéticas e, por outro lado, introduzindo potenciais danos nos ovócitos (105, 113). Isto deve-se principalmente à manipulação e perturbação mecânica a que os ovócitos estão sujeitos pela pipeta de microinjeção (19). Além disso, a posição do fuso meiótico pode estar deslocada em relação ao 1^o GP e não necessariamente adjacente a este, pelo que a posição durante a microinjeção poderá não ser adequada e afetar o conteúdo cromossómico (114).

A indicação para ICSI parece então ter sido alargada a casos como infertilidade inexplicada, idade materna avançada, baixa recuperação de CCO na punção folicular, qualidade ovocitária diminuída, PGT, ou até mesmo para a generalidade dos ciclos de FIV (115). Porém, se o caso não estiver relacionado com infertilidade grave masculina

ou falhas de fertilização comprovada por histórico prévio em FIVc a sua aplicação pode considerar-se redundante.

De forma a explicar esta tendência, diversos autores procuram avaliar os resultados reprodutivos de ambas as técnicas entre ciclos individuais de FIVc ou ICSI (11, 16, 116). Nestes estudos comparativos os resultados demonstram realmente uma tendência de não superioridade da ICSI relativamente à FIVc, apresentando resultados clínicos semelhantes em termos de qualidade morfológica embrionária e taxas de implantação (16). De facto, apesar da ICSI revelar, na maioria, taxas de fecundação superiores, as taxas de gravidez por transferência são equivalentes para FIVc e para ICSI (9, 104), bem como taxas cumulativas de nados vivos similares (111).

Todavia, é importante considerar que estes estudos comparativos de ciclos individuais não têm em consideração a heterogeneidade entre casais sujeitos a um tratamento ou o outro. Para além de que, deve ser considerado que nesses casos há uma variação entre embriões a ser comparados, e conseqüentemente, elevada variabilidade genética e ambiental, incluindo diferentes condições de cultura, o que pode influenciar os dados dos estudos e a interpretação dos mesmos (87, 107). Assim, é necessária a avaliação cuidada de cada caso, pelo que a conjugação de ambas as técnicas pode representar um papel promissor em PMA.

10. Os ciclos mistos FIVc/ ICSI

O estudo de ciclos mistos surgiu no início dos anos 2000 (117), minimizando consideravelmente o impacto das diferenças referidas previamente (54, 106, 118). Nesta abordagem, os ovócitos produzidos num único ciclo de estimulação ovárica são divididos aleatoriamente para a fecundação por FIVc ou ICSI. A análise de dados em ciclos mistos permite avaliar os efeitos clínicos das duas técnicas em embriões do mesmo casal, num único ciclo de tratamento.

Nestes estudos, alguns autores analisam parâmetros como a taxa de fertilização, a qualidade embrionária e taxas de gravidez (106, 107, 119-121). Considerando a sua metodologia, esta técnica permite então, a comparação mais adequada dos parâmetros laboratoriais entre ambas as técnicas (109) e inclusive a compreensão dos possíveis benefícios da sua conjugação num só ciclo de tratamento.

Analisando a bibliografia, existe uma opinião generalizada de que a ICSI poderá refletir melhores taxas de fertilização (16, 105, 116, 122). No entanto, esta premissa parece

não ser clara quando conjugadas as técnicas recorrendo a gâmetas dos mesmos parceiros, sendo por vezes mais alta em FIVc (109, 123) e, noutras análises, superior em ICSI (118, 124). Demonstra assim, a necessidade de maior estudo para este parâmetro.

Quando é analisada a qualidade embrionária também não há consenso no que diz respeito a essa variável em embriões resultantes de FIVc ou ICSI. Isto pode dever-se, por um lado, ao processo de seleção de espermatozoides durante a microinjeção, ou à escolha morfológica de CCO para FIVc, podendo enviesar o desfecho (123, 125). A necessidade de análise dos ciclos no qual a seleção dos ovócitos é aleatória e sem privilégio morfológico mostra-se fundamental. Foram identificados alguns estudos que verificaram um maior número de blastocistos formados após a técnica de FIVc relativamente à ICSI (118, 125) e com mais blastocistos de boa qualidade (124). Concretamente, estes embriões demonstram desenvolver-se mais rapidamente até à fase de blastocisto (125). Consequentemente, poderá haver maior disponibilidade de blastocistos resultantes de FIVc que serão selecionados para transferência (109). No entanto, como é referido por alguns autores a qualidade embrionária pode não ser influenciada pelo método de fertilização, mas poderá estar relacionada com os fatores intrínsecos dos gâmetas (109, 123, 126). Tal facto pode ser investigado num estudo alargado com ciclos mistos com ovócitos do mesmo casal divididos aleatoriamente.

De forma geral, as taxas de gravidez não são significativamente diferentes, quando transferido um embrião produzido de FIVc ou ICSI, durante estes ciclos (121, 123, 125). Verifica-se a necessidade de perceber até que ponto a abordagem mista apresenta impacto neste parâmetro. Contudo, estes ciclos parecem melhorar consideravelmente a produção de embriões que, por sua vez, são de melhor qualidade (106, 109).

A avaliação da produção de embriões clinicamente utilizáveis por ciclo, isto é, a disponibilidade de embriões tanto para transferência a fresco, quer para criopreservação e TEC, revela-se por isso um parâmetro importante (106, 121). A abordagem mista mostra ser promissora relativamente à taxa de aproveitamento embrionário, aumentando a disponibilidade de embriões viáveis (106, 127). Por esse motivo, esta abordagem representa uma potencial salvaguarda para o ciclo, possibilitando a conclusão e um desfecho positivo do tratamento. No estudo de Goswami and Gouri (123) um total de 28% dos casais beneficiaram deste protocolo. Caso contrário, se, nestes casos, se tivesse realizado apenas um ciclo individual de FIVc ou ICSI, a transferência embrionária não se realizaria por indisponibilidade

embrionária. Por um lado, verificou-se que se 10% dos ciclos tivessem sido apenas de FIVc não haveria embriões para transferência, por falhas de fertilização, ou má qualidade embrionária. Por outro lado, 18% das transferências seriam canceladas se se realizasse um ciclo completo de ICSI (123).

Dados recentes reportam que cerca de 11 a 35% dos casais envolvidos em tratamentos de PMA sofrem de infertilidade inexplicada (25, 111). Atualmente, a ICSI parece apelativa para evitar FTF, considerando que esse evento apresenta maior probabilidade com a FIVc, porém com a microinjeção este risco também não é nulo (128). Efetivamente, não existe uma técnica altamente específica o suficiente que permita uma previsão da capacidade de fertilização do espermatozoide no ovócito (109). Portanto, a abordagem mista parece ser adequada em casos em que por um lado, o casal inicia o seu primeiro ciclo de tratamento, ou se apresentam histórico de falhas de fertilização em ciclos anteriores. Ao iniciar, este método revela-se mais informativo, salvaguardando situações de FTF ou cancelamento de ciclo por indisponibilidade de embriões (54, 109). O estudo de Yu, Fei (124) revela que a ocorrência de FTF é reduzida ao conjugar a ICSI com a FIVc. De outro modo, e tendo em conta os fatores intrínsecos entre gâmetas, o ciclo misto assume um caráter diagnóstico identificando o método ideal para cada caso e garantindo a fertilização (106, 120).

Como mencionado, as indicações para ICSI revelam ter estendido para além da infertilidade masculina grave. No entanto, em contexto de idade feminina avançada a ICSI não ultrapassa a baixa qualidade ovocitária relacionada com a idade, pelo que poderá ser invasiva para ovócitos mais envelhecidos (129). Contudo, o envelhecimento do gâmeta está geralmente associado a uma acumulação de erros genéticos, acarretando um maior risco de aneuploidias, e conseqüentemente maior probabilidade de falhas de fecundação (109). A aplicação de um ciclo FIVc/ ICSI pode ser vantajoso para compreender essa possibilidade e, de outro modo, evitá-la. Mesmo quando são obtidas diferentes respostas ao protocolo de estimulação ovárico, a opção pela ICSI poderá ser redundante. Assim, o número de ovócitos recuperados aparenta não ter valor para a seleção do procedimento em caso de infertilidade sem fator masculino associado (122).

Estes ciclos revelam-se, de facto mais informativos para o corpo clínico em relação à abordagem mais vantajosa para aquele casal, ou salvaguardando a possibilidade de repetir tratamentos (106, 119, 120). Quando o casal inicia o primeiro tratamento e

existe incerteza relativamente à terapêutica a aplicar, a abordagem mista é tida como uma opção adequada. Por um lado, existe a possibilidade de realizar uma comparação válida entre métodos de fertilização, visto que a amostra seminal utilizada é a mesma, possibilitando um planeamento mais direcionado. Por outro lado, foi demonstrada uma otimização na disponibilidade de embriões produzidos que podem ser utilizados num mesmo ciclo a fresco, ou mais tarde, realizando TEC. Deste modo, demonstram potencial na prevenção de falha total de fertilização ou cancelamento da transferência embrionária, evitando a realização de um novo tratamento repetindo o protocolo hormonal e, acarretando maior stress conjugal (123).

É importante, contudo, atentar na necessidade de avaliar cada caso, incluindo o histórico do casal, relativamente às causas de infertilidade subjacentes e a decisão do tratamento adequado. Relativamente ao último ponto, considera-se que deve ser tida em conta a eficácia, segurança e custos que o mesmo alberga (130).

Em suma a realização dos ciclos mistos permite compreender se existe alguma influência por um fator masculino despercebido que impacte na fertilização, ou a formação de embriões anómalos, por causas genéticas masculinas. De outro modo, causas femininas que impactem a qualidade dos ovócitos. Por outra perspetiva e considerando o *pool* de ovócitos limitado, estimulações repetidas para iniciar novos ciclos pode ser arriscado (131). Este protocolo parece oferecer uma estratégia que visa maximizar o número de embriões produzidos a partir de um único recrutamento controlado de ovócitos (109). Poderão, assim, aumentar a probabilidade de assegurar ao casal um tratamento mais eficaz e seguro. Adicionalmente, a metodologia mostra ser aplicável a muitos casais, e ao mesmo tempo como um tratamento direcional e informativo, até para o corpo clínico. Oferece a possibilidade de recorrer a várias tentativas, caso necessário, aumentando a chance de obter uma gravidez ou, a gerir um tratamento futuro. Para além disso, as técnicas de PMA podem apresentar encargos financeiros e humanos elevados, principalmente a ICSI que requer maior equipamento e formação técnica (11). Adotar um ciclo misto pode constituir uma abordagem alternativa ideal para reduzir esses custos, favorecendo uma relação custo-efetividade mais positiva, bem como maior aceitação por parte do casal.

Capítulo II

Objetivos

Apesar dos esforços na melhoria das técnicas de FIV é de notar que as taxas de sucesso nomeadamente de gravidez, como revisto anteriormente, estagnaram permanecendo baixas com valores inferiores a 50%. Essa margem de insucesso requer ao casal múltiplas repetições de ciclos associados a uma elevada sobrecarga temporal, financeira e emocional. O desempenho da ICSI a nível global tem se expandido a uma variada panóplia de indicações em PMA. A argumentação incompleta e o aumento de encargos financeiros e humanos, entre outros, apelam a pesquisas mais alargadas. O estudo dos ciclos mistos, para além de revelar efeitos confiáveis, mostra-se uma estratégia com poder diagnóstico e de tratamento eficaz.

O presente Projeto Científico, desenvolvido no CRI-MR do CHUSJ, pretende averiguar o potencial dos ciclos mistos de FIVc/ ICSI como abordagem em PMA. Nesta abordagem, os ovócitos recuperados da mesma paciente são selecionados aleatoriamente para serem fertilizados com a amostra masculina do parceiro recorrendo a ICSI (grupo ICSI) ou a FIVc (grupo FIVc). Nestas condições, é possível identificar e compreender se existem diferenças entre uma técnica ou a outra, através da análise de alguns indicadores laboratoriais e clínicos. Para tal, serão recolhidos dados de ciclos de tratamento entre o período de 2022 e junho de 2023. Como desfechos pretende-se investigar a taxa de fecundação e o aproveitamento embrionário, ou seja, o número de embriões clinicamente utilizáveis por ciclo. Serão ainda avaliados outros parâmetros relevantes como a seleção embrionária para cada técnica, no momento de transferência e vitrificação, no que respeita a número, fase de cultura e qualidade morfológica. Por fim, como desfechos clínicos dos ciclos considerar-se-á a gravidez bioquímica e clínica. A amostra em teste será considerada emparelhada, visto que os ovócitos de ICSI e os ovócitos de FIVc a serem comparados foram obtidos do mesmo casal. Posteriormente, a população de estudo será dividida em subpopulações de pacientes, tendo em conta a idade do elemento feminino. Complementarmente, será estudada a subamostra de ciclos com diagnóstico de infertilidade feminina. A idade materna avançada e a infertilidade feminina têm sido alguns dos fatores para o alargamento indevidamente justificado dos ciclos de ICSI. Esta análise visa compreender se estes elementos são determinantes para o sucesso do ciclo, em particular dos dois métodos estudados, procurando alguma diferença que fundamente tal evento ou se, em contrapartida a FIVc deve ser considerada como adequada.

Assim, este projeto mostra-se relevante na área, na medida em que se debruçará sobre indicadores-chave laboratoriais e clínicos de ambas as técnicas mais frequentes

no laboratório. Paralelamente, será esclarecedor acerca da efetividade da FIVc e da ICSI quando conjugadas em ciclos mistos para o tratamento de casos de infertilidade sem fator masculino associado. A natureza retrospectiva e prospetiva do estudo favorece uma avaliação analítica e estatística adequada dos desfechos de ambas. Para além disso, a abordagem mista de FIVc/ ICSI mostra-se relevante dado que os resultados são o reflexo da distribuição aleatória de ovócitos recuperados na mesma estimulação ovárica para cada método de fertilização.

Capítulo III

Material e Métodos

1. Seleção de Pacientes

Para o presente estudo foram recolhidos os dados obtidos entre o período de janeiro de 2022 e junho de 2023, reunindo informação apenas de casais em que o tratamento indicado foi um ciclo misto de FIVc/ ICSI realizado no CRI-MR do CHUSJ. Desse modo, o projeto é de natureza retrospectiva e prospetiva. Os critérios de inclusão tidos em conta para a análise, sendo geralmente aqueles considerados para a indicação de um tratamento misto, foram os seguintes:

- a) O histórico clínico do casal, em termos de etiologia de infertilidade, gravidez anterior, idade, etc. Foram, por isso considerados os mais diversos fatores de infertilidade feminina, sem indiscrição. Para amostras seminais consideraram-se amostras cujo espermograma anterior e a avaliação no dia do ciclo se enquadra nos parâmetros normais ou ligeiros de infertilidade, segundo a OMS. Verificam-se também eventuais tratamentos realizados anteriormente e o seu desfecho;
- b) A utilização gâmetas autólogos de ambos os membros do casal;
- c) A recolha de gâmetas é realizada a fresco;
- d) Ciclos em que o número de ovócitos recuperados é igual ou superior a 4 ovócitos por punção folicular;
- e) Amostras espermáticas de qualidade considerada adequada para a realização de um ciclo de FIVc, isto é, normozoospermia ou fator masculino ligeiro. Esta análise pode ser baseada em dados de ciclos/ espermogramas anteriores.

2. Procedimento Laboratorial

2.1. Recuperação de ovócitos

Ao iniciar ciclo foram prescritos protocolos adequados a cada paciente, sendo antagonista da GnRH para supressão hipofisária, ou com agonista da GnRH como protocolo longo, ambos juntamente com FSH para estimulação ovária. Quando pelo

menos 3 folículos atingem diâmetro máximo superior a 17 mm, sob monitorização ecográfica, é administrada hCG para indução da maturação final dos folículos.

A punção folicular realiza-se normalmente cerca de 34-36h após a administração de hCG, sob anestesia geral e monitorização ultrassonográfica. O líquido folicular é aspirado para seringas contendo meio de lavagem tamponado previamente equilibradas a uma temperatura de $\pm 37^{\circ}\text{C}$. O conteúdo das seringas é observado ao estereoscópio para localização e isolamento dos CCO. É removido o excesso de células do *cumulus* por manipulação mecânica com auxílio de agulhas. São, de seguida, lavados e transferidos para meio adequado à cultura e fertilização *in vitro* coberto por óleo mineral. Todas as placas de cultura são previamente preparadas e equilibradas e devidamente identificadas para cada paciente do sexo feminino. Os ovócitos permanecem incubados a $\pm 37^{\circ}\text{C}$, 6% de CO_2 e 5% de O_2 até posterior manipulação. São mantidas as condições de assepsia durante todo o processo.

2.2. Preparação da amostra seminal

A amostra espermática é obtida por masturbação e mantida a temperatura adequada (37°C) até a liquefação estar completa (cerca de 30 minutos). Os parâmetros macroscópicos foram confirmados, bem como os microscópicos avaliando a concentração, motilidade, morfologia e outros que possam ser importantes para utilização da mesma no ciclo de FIV. As amostras são sujeitas a centrifugação com 1mL de cada gradiente de densidades diferentes (40 e 80%), durante 20 minutos a 1400 rpm para concentração e separação dos gâmetas masculinos do líquido seminal. Posteriormente, o *pellet* é lavado, transferindo-o para um novo tubo e ressuspenso em cerca de 2mL de meio de cultura e centrifugado 10 minutos a 1600 rpm. O sobrenadante é descartado e, através da adição de meio de cultura adequado, é realizado *swim-up*, posicionando o tubo numa inclinação de 45°C em suporte apropriado. Este passo é fundamental, visto que permite a ascensão de espermatozoides com melhor motilidade para o menisco, estimulando a capacitação espermática. É avaliada a recuperação espermática e, para um novo tubo é preparado o volume apropriado para posterior utilização para a fertilização.

2.3. Fertilização

Nesta etapa um conjunto de CCO são divididos para serem fertilizados por ICSI (grupo ICSI) e outros para FIVc (grupo FIVc), sem qualquer privilégio morfológico. A amostra espermática do parceiro utilizada é a mesma para a inseminação dos ovócitos de FIVc e para microinjeção. Em ambas, a fertilização é realizada cerca de 40h após a administração de hCG.

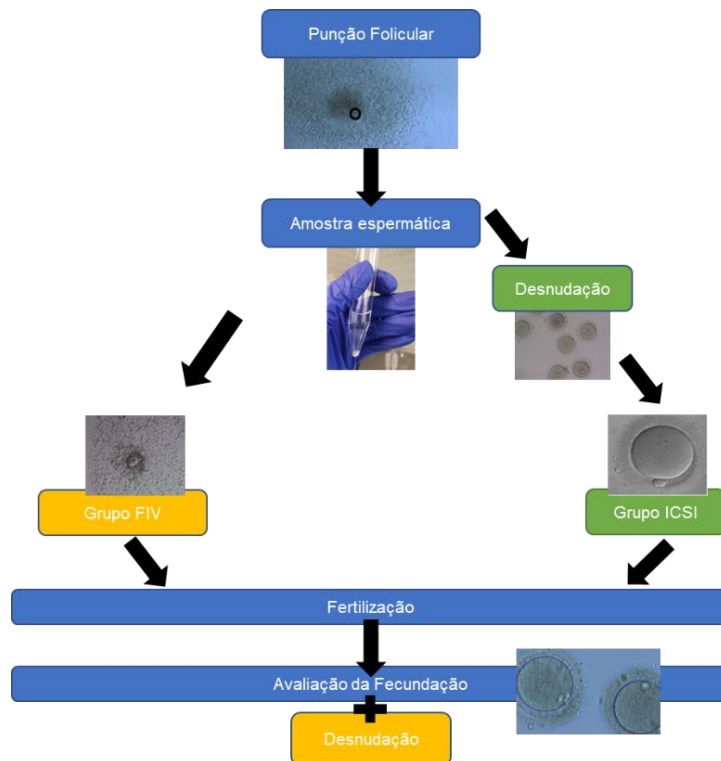


Figura 12. Esquema do procedimento de Fertilização mista FIVc/ ICSI no laboratório. Após recuperação dos CCO e do processamento da amostra espermática, os CCO disponíveis são divididos aleatoriamente para serem inseminados por FIVc ou ICSI cerca de 4h após a punção folicular. O grupo de ovócitos de ICSI são desnudados cerca de 3h-3,5h após a recuperação, sendo avaliados quanto à sua maturação nuclear. A fecundação é analisada cerca de 16h-18h após a inseminação, pelo que é nesse momento que é realizada a desnudação dos ovócitos de FIVc.

2.3.1. Fertilização por FIVc

A fertilização dos CCO, é realizada aproximadamente 4h após a sua recuperação. Deste modo, é adicionado volume de amostra espermática capacitada suficiente para se obter, em cada poço, uma concentração final de cerca de 100.000 espermatozoides/ mL. O procedimento é realizado ao esteriomicroscópio em câmara de fluxo laminar vertical e superfície aquecida. No final, é verificada ao microscópio

invertido a viabilidade e concentração da amostra espermática em co incubação com os CCO. A amostra é mantida em incubadora para desnudação e confirmação da fecundação no dia seguinte.



Figura 13. Realização de FIV. Os espermatozoides são adicionados ao meio onde se encontra o CCO em cultura para que ocorra a fertilização. É visível o ovócito (O) rodeado por todas as camadas envoltórias que serão penetradas e dispersas pelo espermatozoide.

2.3.2. Fertilização por ICSI

Antecipadamente devem ser preparadas placas de desnudação e de microinjeção suficientes, permitindo o tempo de equilíbrio necessário aos meios. Estas são preparadas cuidadosamente em número adequado dependendo do número de ovócitos recuperados na punção.

Cerca de 3-3,5h após a punção folicular os ovócitos são colocados numa placa para desnudação química com enzima hialuronidase em concentrações crescentes. Em seguida, procede-se a uma desnudação mecânica através de sucessivas aspirações com recurso a pipetas com pontas flexíveis e estéreis de 145 ou 155 μm de diâmetro. Após a remoção das células da granulosa circundantes, é registado o estado de maturação nuclear dos ovócitos e apenas os que se encontram em Metáfase II serão microinjetados.

A ICSI é executada em microscópio invertido, com base anti-vibratória, platina termostaticada, com sistema de micromanipulação. É realizada 4h após o momento da punção e completa a desnudação.

Em primeiro lugar, colocados os espermatozoides na placa, nomeadamente, numa gota de PVP, onde permanecem a incubar durante uns minutos, permitindo a sua migração para as margens. Findo esse tempo, os espermatozoides são selecionados um a um, de acordo com a sua morfologia, sendo passados para a segunda gota onde se realizará a quebra da cauda, imobilizando-os.

Os ovócitos são colocados individualmente, em cada gota de meio adequado à fertilização. Iniciando a microinjeção do ovócito, deve ser assegurada a posição do GP às 6h ou 12h e um plano de foco correto na pipeta e o oolema. Adicionalmente, durante a microinjeção são anotados alguns parâmetros relacionados com a qualidade do ovócito, incluindo a sua forma, morfologia da ZP, GP e aspeto do citoplasma. A rotura durante a microinjeção pode também ser registada, o que diz respeito ao momento do rompimento da membrana do ovócito, sendo observada a quantidade de ooplasma que é aspirado com a pipeta de injeção. O espermatozoide deve ser injetado lentamente, evitando a menor introdução de meio possível. Após a microinjeção os ovócitos são colocados em cultura em meio adequado até ao momento de verificação da fecundação.

2.4. Avaliação da Fecundação

Às 16-18h após a fertilização é avaliada a fecundação. Seguidamente, todos os ovócitos são analisados no microscópio invertido e é anotada a ocorrência de fecundação. A fecundação normal foi considerada quando se observou 2 PN e 2 GP. A falha de fertilização total foi definida para cada técnica quando nenhum ovócito mostrou sinais de fecundação.

Os zigotos resultantes de ICSI com fecundação normal são selecionados e incubados em novo meio de cultura, indicado para o desenvolvimento em fase de clivagem. Os do grupo FIVc são agora transferidos da placa onde ocorre a fertilização, no qual ocorreu a fecundação, para esse novo meio de suporte à clivagem.

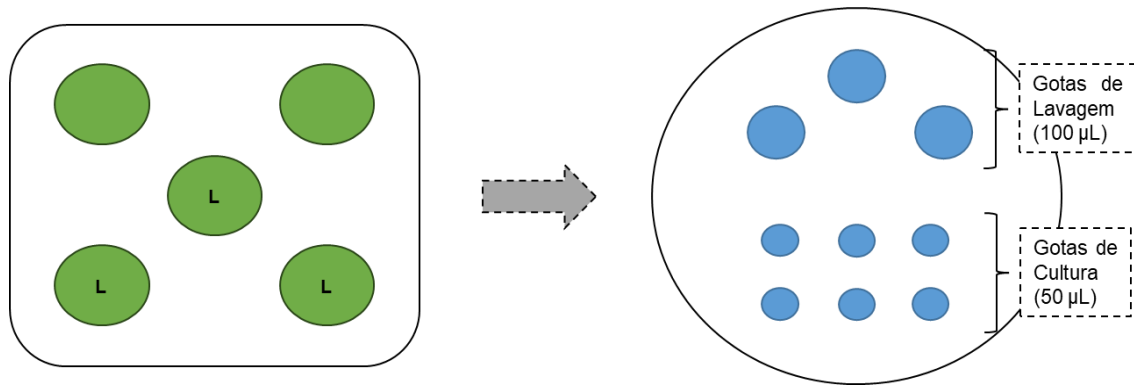


Figura 14. Após a avaliação da Fecundação os CCO de FIVc são desnudados e passados, seguidamente, para a placa com meio apropriado à fase de clivagem (placa à direita). No caso do grupo ICSI, os zigotos são passados de uma placa semelhante à da direita para uma nova placa de meio renovado. Os zigotos são lavados em gotas maiores por sucessivas passagens e cultivados individualmente em gotas mais pequenas até ao Dia 3 de cultura. Cada placa contém no máximo 6 embriões e coberta por óleo mineral denso.

2.5. Desenvolvimento da Cultura Embrionária

A avaliação morfológica do desenvolvimento embrionário requer o acompanhamento periódico da cultura e em tempos específicos. Desse modo, e segundo a classificação da ASEBIR e do Consenso de Istanbul, a avaliação da qualidade morfológica deve ter em conta a evolução do embrião. Em fase de clivagem, a classificação a Dia 3 deve considerar a que foi obtida no dia anterior. Resumidamente, um embrião do tipo A apresenta 4 células a Dia 2 e 8 a Dia 3, com simetria específica do seu estadio e no máximo 10% de fragmentação. Embriões do tipo A, B ou C podem ser transferidos ou vitrificados nesta fase. Ou, se por outro motivo, podem ser deixados em cultura até à fase de blastocisto, pelo que os embriões passíveis de continuar em cultura serão passados para meio adequado à fase de blastocisto. Como mencionado anteriormente, a extensão da cultura permite uma melhor seleção embrionária, permitindo eleger os embriões de qualidade superior.

A classificação de blastocistos concentra-se no aspeto da MCI e TF. Blastocistos de qualidade A aparentam uma MCI compacta, composta por várias células e uma TF bem definida, uniforme e várias células na sua constituição. Já no caso de blastocistos tipo B a MCI pode ser distinta por menor coesão e a TF com menor número de células. A classificação da TF determinará a classificação final do blastocisto.

2.6. Transferência Embrionária

Podem ser selecionados 1 ou 2 embriões para transferir, dependendo do Consentimento do casal, bem como a recomendação do corpo clínico. O(s) embrião(ões) serão os melhores tendo em consideração a qualidade morfológica na fase de desenvolvimento em questão, aspetos esses importantes no prognóstico. A escolha é independente do método de fertilização do qual resultaram, pelo que depende apenas da sua avaliação. Assim, podem ser eleitos apenas embriões resultante de FIVc para transferir, ou apenas de ICSI, ou por vezes de ambos os métodos por não existir seleção morfológica (transferência mista).

O cateter externo é inserido na cavidade uterina. O interno, no laboratório é acoplado a uma seringa, para carregamento do(s) embrião(ões). Após o carregamento o cateter interno é rapidamente inserido na cavidade uterina, através do cateter externo. De seguida, e após remoção lenta do cateter, é confirmada, através de lavagem do mesmo, que a transferência do(s) embrião(ões) foi bem-sucedida.

É administrada progesterona para suporte da fase lútea até à 10^a semana de gestação, caso esta se verifique através de resultado positivo no doseamento sérico de β hCG. A gravidez clínica é confirmada 4 semanas após a transferência embrionária por confirmação do número de sacos gestacionais presentes em ultrassonografia.

2.7. Criopreservação de embriões excedentários

Os embriões excedentários foram vitrificados para possível utilização posterior em TEC. Foram considerados embriões para vitrificação apenas pela sua qualidade e não pelo método a que deram origem. Assim, embriões de qualidade A, B ou C foram submetidos, em fase de clivagem, mórula ou blastocisto, ao protocolo de vitrificação e armazenados em azoto líquido em contentores apropriados. Foram realizados os registos necessários, incluindo o método de inseminação que originou cada embrião vitrificado, bem como a fase de cultura e qualidade morfológica para análises.

No dia da TEC os embriões foram desvitrificados, cerca de 2h-3h antes da transferência e incubados em meio adequado, permitindo a sua recuperação do teor hídrico e evolução nas condições *in vitro*. Embriões de Dia 3 desvitrificados podem ter sido sujeitos a EA, de forma a facilitar a eclosão da ZP, visto que esta poderá enrijecer quando é realizado o protocolo de vitrificação.

3. Análise Estatística

Foram recolhidos dados retrospectivos de ciclos mistos referentes ao ano de 2022. Adicionalmente, foram obtidos dados prospetivos de novos ciclos FIVc/ ICSI realizados até ao mês de junho de 2023. Foi organizada toda a informação pertinente para a execução da análise estatística relevante para o Projeto.

Considerando o objetivo do estudo e partindo de uma população inicial de ovócitos da mesma paciente, para cada uma, o grupo de ovócitos fertilizados por FIVc e o grupo de ovócitos fertilizados por ICSI foram considerados como duas amostras relacionadas. Os ovócitos recuperados da mesma paciente foram fertilizados com a mesma amostra espermática.

Inicialmente, foram comparadas as médias entre os grupos de ovócitos para os seguintes parâmetros laboratoriais de sucesso: taxa de fecundação, aproveitamento embrionário e taxa de alta qualidade embrionária (embriões classificados como tipo A e tipo B independentemente da fase embrionária). Para tal, recorreu-se ao teste não paramétrico de Wilcoxon para 2 amostras emparelhadas, considerando que as variáveis contínuas não seguiam uma distribuição normal. Ademais, tal teste foi utilizado para comparação do número de embriões transferidos e número de embriões vitrificados entre FIVc e ICSI. A comparação entre FIVc e ICSI para a seleção embrionária no momento de transferência ou na vitrificação, consideradas como variáveis nominais dicotómicas (encarado como, por exemplo, transferência com embrião de FIVc vs transferência com embrião de ICSI), foi realizado recorrendo ao teste de McNemar.

As pesquisas posteriores, no que diz respeito à relação entre a qualidade e a fase de desenvolvimento do embrião transferido com o método de fertilização de origem, foram consideradas. A avaliação foi realizada de forma a perceber a existência de uma relação de dependência entre a qualidade ou a fase embrionária no momento da transferência e o método de fecundação de origem. Para estas, bem como para o parâmetro clínico de sucesso do ciclo, dado pela gravidez bioquímica e clínica, o teste utilizado foi o Qui-Quadrado. Quando os pressupostos do Teste Qui-Quadrado não foram cumpridos, adotou-se o Teste de Fisher. Dessa forma, as variáveis foram definidas como qualitativas nominais, tendo sido organizadas em classes. Quando encontrados valores de teste significativos, a análise foi seguida de um Post-Hoc com o Teste de Wilcoxon para 2 amostras, de forma a encontrar entre que grupos se detetam essas diferenças.

Complementarmente, mostra-se relevante a avaliação da influência de outros fatores sobre as variáveis estudadas, tais como, a idade feminina e o diagnóstico de infertilidade por fator feminino. A idade da mulher foi estratificada em 3 categorias diferentes (<30; 31-35; 36-40), tendo sido analisada cada uma como uma subamostra da população inicial, realizando o Teste t para amostras emparelhadas, ou, caso não tenham sido cumpridos os pressupostos da normalidade, o Teste de Wilcoxon. O mesmo teste foi realizado para a subpopulação de casais com diagnóstico de infertilidade feminina. Paralelamente, embora não constituindo o objetivo principal do estudo, apenas para suportar o conhecimento da bibliografia, relativamente ao impacto da idade feminina nos resultados laboratoriais dos ciclos, foi realizada uma análise independente, recorrendo ao Teste de Kruskal-Wallis para testar diferenças nos resultados laboratoriais entre os 3 grupos etários. Em todas as análises do estudo foi considerada uma diferença estatisticamente significativa quando o valor de $p < 0.05$.

Capítulo IV

Resultados

Análise Descritiva da População

Foram incluídos no estudo 58 casos clínicos de casais que realizaram ciclo misto FIVc/ ICSI desde 2022 até junho de 2023. Na **Tabela 3** encontra-se uma breve análise descritiva da população.

Tabela 3. Descrição da população total incluída no estudo: média (M), desvio padrão (DP), valor absoluto (n).

	Total	FIVc	ICSI
Nº de ciclos	58		
Idade feminina (média ± DP)	36,3 ± 4,00		
Duração da infertilidade (média ± DP)	5,5 ± 2,90		
Idade masculina (média ± DP)	38,0 ± 5,14		
Ovócitos previstos (n total)	828		
Ovócitos recuperados (n total)	673	362	311
Ovócitos maduros (n total)	542	296	245
Ovócitos fecundados (n total)	365	214	151

Após a recuperação dos CCO em punção folicular, estes foram divididos o mais equitativamente possível e sem privilégio de método. Inicialmente, 362 foram alocados para a fertilização por FIVc e 311 para ICSI.

No grupo ICSI após a desnudação cerca de 245 ovócitos estavam maduros, pelo que 66 foram descartados por se encontrarem imaturos, o que representa cerca de 4,2 de ovócitos maduros por ciclo. No momento de avaliação da fecundação, foram encontrados igual número de ovócitos imaturos após inseminação por FIVc, o que significa cerca de 5,1 ovócito maduros por ciclo, representando uma proporção semelhante de maturidade ovocitária entre métodos ($Z= 1,922$ $p= 0,055$). Todos os próximos parâmetros que considerem ovócitos maduros em FIVc, têm em conta a avaliação da maturidade, neste momento da avaliação da fecundação.

Fecundação

A taxa de fecundação média global foi de 67,3% (365 ovócitos fecundados/542 maduros). A taxa de fecundação por ovócito inseminado foi significativamente mais elevada no grupo de FIVc com 71,8% em comparação com a de ICSI de 60,5% ($p=0,043$) (**Tabela 4**).

Globalmente, foram identificados 2 ciclos com falha total de fertilização (FTF), isto é, nenhum dos ovócitos, quer fertilizados por FIVc, quer por ICSI, apresentou sinais de fecundação, pelo que estes casos não seguirão para as restantes análises por terem terminado o ciclo nesta fase. No entanto, para cada um dos grupos de ovócitos houve, de facto, falhas na fecundação. Analisando os ovócitos fertilizados pelo método convencional, foram registados um total de 4 ciclos (2 ciclos com falha apenas em FIVc, mas ocorrência de fertilização normal em ICSI) em que não houve evidência de fertilização nesse grupo de ovócitos, isto é, 0 ovócitos com 2 PN e 2GP a Dia 1. Logo, a percentagem média de falha total de fertilização na FIVc foi de 6,9%. No caso de ovócitos fertilizados por ICSI, o valor foi superior, verificando-se um total de 6 casos de FTF, pelo que a taxa foi de 10,3%. Posteriormente, foi averiguada a taxa de fecundação, supondo a exclusão dos casos em que ocorreu FTF, de forma a compreender o impacto dessas falhas nos ciclos. Quando excluídos dos cálculos os casos de FTF no grupo de FIVc as taxas de fecundação por ovócito inseminado continuaram estatisticamente mais elevadas ($p=0,007$). Em contrapartida, ao omitir os casos de FTF em ICSI verificou-se um aumento na taxa de fecundação desta técnica, de forma que ambas as taxas de fecundação se apresentam semelhantes. Efetivamente se não ocorressem as falhas em ICSI, as taxas teriam sido comparáveis, isto é, não se apurariam diferenças significativas, de tal forma que eliminando todos os casos em que sucederam FTF as taxas de fecundação seriam similares ($p=0,064$).

Tabela 4. Taxas de Fecundação referentes ao quociente entre o número de zigotos (2PN e 2 GP) observados a Dia 1 e o número de ovócitos inseminados. Os valores estão apresentados segundo a % M ± DP. O Teste Não Paramétrico de Wilcoxon (Z) foi realizado por não se cumprirem os pressupostos da normalidade. As taxas foram comparadas de forma emparelhada para cada caso, tendo resultado em valores de teste Z descritos abaixo. Os valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) encontram-se destacados.

	FIVc	ICSI	Z	p
Taxa de fecundação	71,8 ± 29,3	60,5 ± 31,6	2,025	0,043
Taxa de Fecundação excluindo FTF em FIVc	77,1 ± 22,5	62,5 ± 30,3	2,551	0,011
Taxa de Fecundação excluindo FTF em ICSI	73,4 ± 26,9	67,5 ± 25,1	1,248	0,212
Taxa de Fecundação excluindo FTF totais	76,3 ± 22,9	67,5 ± 25,4	1,893	0,064

Desenvolvimento da Cultura Embrionária

Na **Tabela 5** estão representados os valores de aproveitamento embrionário médio e a taxa de embriões de elevada qualidade. O aproveitamento embrionário é determinado pelo número de embriões de qualidade suficiente para serem selecionados para transferência ou criopreservação, de forma global no ciclo, isto é, incluindo qualquer uma das diferentes fases de clivagem, mórula ou blastocisto. Para esta medida foram considerados os embriões de qualidade A, B ou C. Deste modo, verificou-se maior disponibilidade de embriões para serem utilizados no ciclo, originados por FIVc do que por ICSI ($p=0,003$). Mais especificamente, cerca de 50,5% dos ovócitos fecundados pelo método convencional originaram embriões com potencial de serem utilizados no ciclo. Já os zigotos formados por ICSI originaram 41,1% de embriões utilizáveis. Quando é analisada a taxa de alta qualidade embrionária, apesar de não ser detetado um valor estatisticamente significativo, parece que a FIVc produz tendencialmente mais embriões com melhor classificação morfológica ($p=0,077$).

Tabela 5. Desenvolvimento embrionário dos ciclos. A variável escalar aproveitamento embrionário encontra-se apresentada com o valor absoluto médio: $n (M) \pm DP$; a variável escalar taxa de alta qualidade embrionária está apresentada sob a forma de percentagem média: $\% (M) \pm DP$. O Teste Não Paramétrico de Wilcoxon foi realizado por não se cumprirem os pressupostos da normalidade. As taxas foram comparadas de forma emparelhada para cada caso tendo resultado em valores de teste Z descritos abaixo. Os valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) encontram-se destacados.

	FIVc	ICSI	Z	p
Aproveitamento embrionário	1,8 ± 1,3	1,1 ± 1,2	3,070	0,002
Taxa de Embriões de Alta Qualidade	43,9 ± 40,3	31,9 ± 38,7	1,790	0,074

Transferência Embrionária

No total foram realizadas 61 transferências, das quais 43 transferências de ciclos a fresco (TE) 18 transferências com embriões criopreservados (TEC), com um total de 86 embriões transferidos (**Tabela Anexo 1**). Em TE foram selecionados embriões exclusivamente de FIVc para transferir em 24 transferências (num total de 43 embriões) e 12 transferências envolveram apenas embriões de ICSI (total de 22). Adicionalmente, foram realizadas 7 transferências que envolveram a seleção de 1 embrião de FIVc e 1 de ICSI (mistas). Em TEC foram desvitrificados 11 embriões para transferências exclusivas de FIVc e 3 embriões para transferências exclusivas de ICSI. Além disso, foram realizadas 3 transferências mistas, o que soma um total de 21 embriões desvitrificados para a realização de TEC.

Nas transferências concretizadas foram selecionados 1 ou 2 embriões de melhor qualidade, independentemente do método de fertilização do qual o embrião teve origem. Do total de transferências realizadas, 35 (57,4% do total de transferências) envolveram apenas embriões com origem em FIVc, enquanto apenas 16 transferências (26,2%), incluíram apenas embriões de ICSI. Nos restantes 10 ciclos (16,4%) foi realizada uma transferência mista. Foi realizada, a comparação entre o número de transferências que envolveram embriões de FIVc em relação às transferências com embriões de ICSI, incluindo por isso, as transferências mistas, independentemente do número de embriões transferidos (**Tabela 6**). Esta análise comparativa foi significativa, refletindo uma maior probabilidade de ser transferido um embrião FIVc ($p = 0,11$).

Analisando o número de embriões transferidos, no total foram selecionados 57 embriões de FIVc para transferir e 29 de ICSI, incluindo os embriões selecionados para transferências mistas. Foram registadas diferenças entre o número de embriões transferidos por FIVc e o número de embriões transferidos por ICSI ($p=0,012$), pelo que houve mais embriões originários de FIVc selecionados para transferir. Os dados revelam assim que, em 66,3% das transferências realizadas foi eleito um embrião de boa qualidade de FIVc para transferir, em contrapartida com 33,7% das transferências com embriões provenientes de ICSI.

Tabela 6. Transferências a fresco (TE) e com embriões criopreservados (TEC). Teste de McNemar (a) para comparação do número de Transferências que envolveram embriões do grupo FIVc ou de ICSI, incluindo as 10 transferências que envolveram embriões de ambos os grupos (Mista). O número de embriões transferidos cuja origem foi FIVc ou ICSI, incluindo também transferências mistas foi analisado recorrendo ao teste Não Paramétrico de Wilcoxon (Z). Os valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) encontram-se destacados.

TE + TEC	FIVc	ICSI	Z	p
Nº de transferências	45	26	(a)	0,011
Nº de embriões transferidos	57	29	2,518	0,012

A escolha do embrião para a transferência embrionária é analisada caso a caso. Deste modo, depende de diversos fatores, quer seja a idade feminina, a preparação endometrial, mas fundamentalmente da disponibilidade embrionária. O método de fertilização não deve influenciar no momento da ponderação, sendo a questão mais relevante a qualidade dos embriões consoante o respetivo estado de desenvolvimento. Assim, é importante avaliar, para cada fase de desenvolvimento, se existe alguma diferença entre as técnicas no momento da seleção para a transferência embrionária (**Tabela Anexo 2**).

Para tal, foram criadas 3 categorias conforme a fase de desenvolvimento embrionária no momento de transferência:

1. Embriões em fase de clivagem, incluindo o Dia 2 e 3;
2. Embriões em fase de mórula, ou seja, Dia 4;
3. Blastocistos de dia 5 ou 6 de desenvolvimento.

Analisando a relação entre as variáveis categóricas, o teste exato de Fisher não revelou nenhum valor de p significativo ($p=0,955$) (**Gráfico 1**). Desse modo, não se verificam diferenças significativas entre as transferências com embriões FIVc e ICSI nos diferentes grupos. Por outras palavras, realizam-se relativamente a mesma quantidade de transferências com embriões em fase de clivagem, mórula ou blastocisto tanto para FIVc como para ICSI. No entanto, em termos globais, é detetada uma frequência tendencialmente superior de transferências em fase de clivagem embrionária.

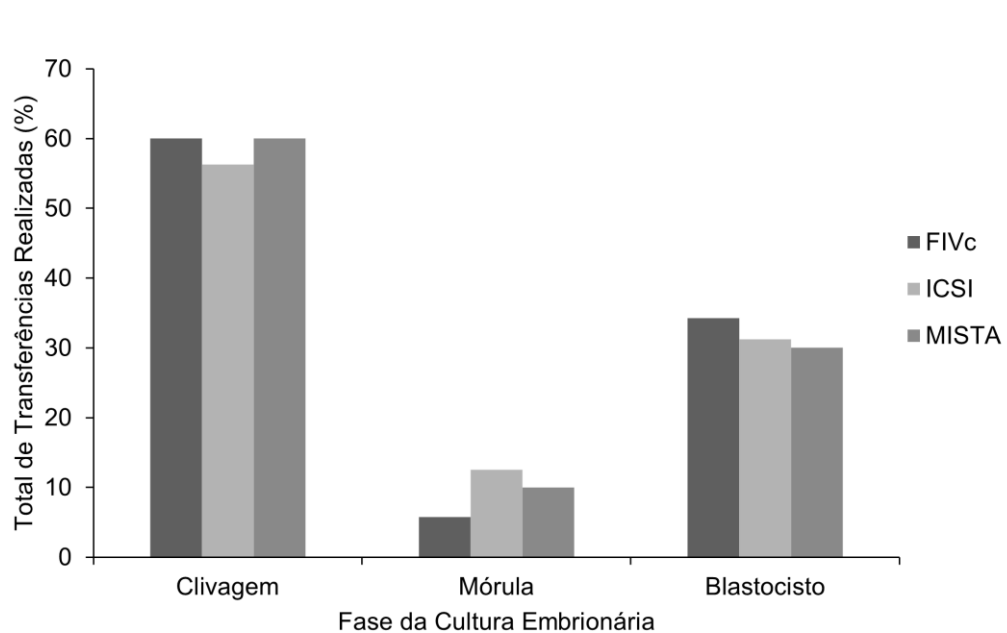


Gráfico 1. Relação entre a fase de cultura embrionária e o método de fertilização no momento da transferência, em termos de valor percentual de transferências realizadas (%). O cálculo resultou do quociente entre o número de transferências com embriões de determinada fase de cultura de cada método e o total de transferências realizadas com embriões com origem no dado método. O teste exato de Fisher não revelou diferenças significativas entre os diferentes grupos (valores de $p > 0,05$).

Foi pertinente ainda estudar a relação entre a qualidade dos embriões selecionados para transferir e o método no qual tiveram origem (**Tabela Anexo 3**). Para tal, os dados foram estratificados em classes, de acordo com a classificação embrionária que poderia ser:

1. Seleção de embriões tipo A (1 ou 2) ou seleção de 1 tipo A em conjunto com 1 tipo B;
2. Seleção de embriões tipo B (1 ou 2) ou seleção de 1 tipo B em conjunto com 1 tipo C;
3. Seleção de apenas 1 ou 2 embriões do tipo C.

Através de uma análise de tabulação cruzada com o teste Exato de Fisher foram identificadas diferenças significativas (**Gráfico 2**). Especificamente, no grupo 2, 57,2% das transferências envolveram apenas embriões com origem em FIVc e 12,4% apenas de ICSI, sendo que esta diferença foi significativa ($p = 0,014$). Reflete que, houve significativamente maior número de embriões com origem em FIVc para transferir do que de ICSI, pertencentes a essa mesma classe. Verifica-se ainda uma tendência não significativa que aponta maior número de transferências com embriões apenas de ICSI com qualidade morfológica tipo A ou A+B.

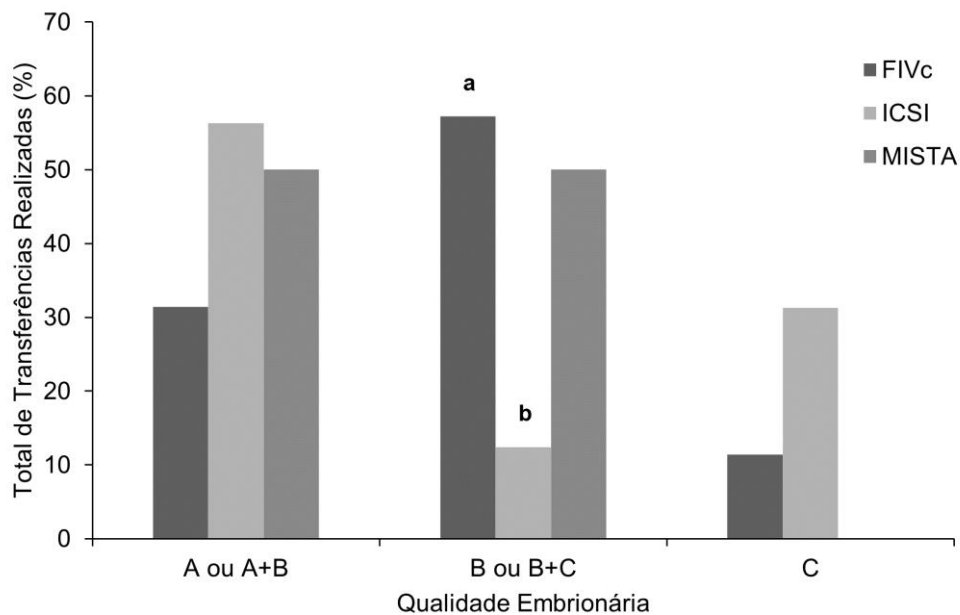


Gráfico 2. Relação entre a qualidade embrionária e o método de fertilização no momento da transferência, em termos de valor percentual de transferências realizadas (%). A transferência embrionária pode abranger a seleção de 1 ou 2 embriões, baseados na disponibilidade embrionária, conforme a qualidade e fase da cultura. Através de uma tabulação cruzada com o teste Exato de Fisher foi possível realçar um maior número de transferências envolvendo embriões selecionados originários de FIVc com qualidade embrionária B ou quando transferido 1 embrião tipo B em conjunto com 1 embrião tipo C em comparação com embriões de ICSI da mesma categoria. As letras diferentes **a** e **b** representam diferenças estatisticamente significativas ($p=0,014$).

Vitrificação de Embriões Excedentários

Do total de ciclos realizados, 37 produziram embriões excedentários que, não tendo sido utilizados a fresco e apresentando potencial para um aproveitamento futuro, foram vitrificados. Desses mesmos, 13 ciclos envolveram apenas a vitrificação de embriões formados por FIVc, 3 de ICSI e 21 com embriões de ambos os métodos (vitrificação mista).

De uma forma global, foram criopreservados 105 embriões, dos quais 65 embriões de FIVc e 40 de ICSI, incluindo as vitrificações mistas. Dos ciclos em que se procedeu à criopreservação de embriões tanto de FIVc como de ICSI, foram vitrificados um total de 76 embriões, dos quais 40 e 36 embriões, respetivamente.

Quando comparado o número de ciclos que abrangeram a vitrificação de um embrião de FIVc ou de ICSI, de forma global, ao incluir os ciclos em que a vitrificação foi mista, verifica-se uma diferença significativa (**Tabela 7**). No entanto, o valor de p detetado, quando estudada a diferença entre o número de embriões vitrificados originários de uma ou outra técnica, não revela significância estatística.

Tabela 7. Vitrificação de embriões excedentários. (a) Teste de McNemar para comparação do número de Vitrificações que envolveram embriões do grupo FIVc ou de ICSI, incluindo os ciclos com vitrificação mista de embriões. O número de embriões transferidos cuja origem foi FIVc ou ICSI, incluindo também as vitrificações mistas foi analisado recorrendo ao teste Não Paramétrico de Wilcoxon (Z). Denota-se que foram realizadas 21 vitrificações envolvendo 1 embrião de FIVc e 1 embrião de ICSI. Os valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) encontram-se destacados.

	FIVc	ICSI	Z	p	Mista
Nº de Ciclos com vitrificação (%)	34 (35,1%)	24 (8,1%)	(a)	0,021	21 (56,8%)
Nº Embriões vitrificados	65	40	1,914	0,056	76

Desse modo, mostra-se relevante analisar detalhadamente os ciclos em que apenas foram vitrificados embriões de FIVc e apenas ICSI, bem como aqueles em que ocorreu a vitrificação mista, de forma a compreender o impacto destes últimos ciclos para a diferença significativa que foi detetada no teste precedente (**Tabela 8**). Mais concretamente, quando é comparado o número de ciclos apenas com embriões de FIVc vitrificados com os de ICSI, estes valores não foram estatisticamente diferentes ($p= 0,396$). Em contrapartida, houve um número significativamente superior de ciclos que compreenderam a vitrificação mista de embriões, comparativamente aos ciclos com a criopreservação exclusiva de embriões formados por FIVc ($p= 0,018$) ou por ICSI ($p= 0,003$).

Tabela 8. Número de embriões vitrificados relativo a cada método. A análise do teste de Wilcoxon permitiu comparar o número de embriões vitrificados de cada método, em exclusivo e, estes com a vitrificação mista. Os valores estatisticamente significativos considerados quando $p < 0,05$ encontram-se destacados. (*) O valor ajustado de p representado é aproximadamente 1.

Exclusivos FIVc	Exclusivos ICSI	Z	p
25	4	5,654	1,000*
Exclusivos FIVc	Vitrificação Mista		
25	76	- 17,643	0,018
Exclusivos ICSI	Vitrificação Mista		
4	76	- 11,989	0,003

Gravidez Bioquímica e Clínica

Das 61 transferências embrionárias totais realizadas, 22 resultaram em testes de hCG positivos, representando uma taxa de gravidez bioquímica cumulativa total de 36,1% (**Tabela 9**). Das 35 transferências realizadas que envolveram apenas embriões com origem em FIVc, 12 produziram um resultado positivo. No caso das 16 transferências que envolveram apenas embriões produzidos por ICSI, 6 originaram uma gravidez. Das 10 transferências que envolveram embriões de ambos os métodos, foram confirmados 4 testes positivos. Estes dados não revelaram diferenças significativas, pelo que parece não existir qualquer relação entre a origem do embrião transferido e a ocorrência de gravidez. De outro modo, a FIVc e a ICSI apresentam taxas de gravidez semelhantes entre si.

Tabela 9. Testes com resultado positivo de gravidez. Foram incluídos resultados de TE e TEC para o cálculo cumulativo. A tabela de contingência do Qui-Quadrado (χ^2) reflete os casos positivos absolutos (n) de teste hCG para determinado método do qual foi realizada a transferência embrionária. Entre parêntesis está representada a dada taxa em % que corresponde à soma de valores positivos sobre o total de transferências realizadas, segundo o determinado método. Não foram detetados valores de p significativos a um nível de significância de 5%.

	FIVc	ICSI	Mista	χ^2	p	Total
Gravidez bioquímica cumulativa	12 (34,3%)	6 (37,5%)	4 (40%)	0,037	1,000	36,1%
Gravidez clínica cumulativa	10 (28,6%)	5 (31,3%)	4 (40%)	1,216	1,000	31,1%

Influência da idade feminina nos resultados laboratoriais dos ciclos

Foi pertinente estudar a influência da idade das pacientes nos parâmetros de sucesso das técnicas FIVc e ICSI nos ciclos mistos realizados (**Tabela 10**). Para tal, a variável idade foi estratificada em grupos de acordo com a idade feminina. O Grupo 1 de mulheres teria uma idade inferior a 30 anos, o Grupo 2 uma idade compreendida entre os 31 e 35 anos e o Grupo 3 entre 36 e 40 anos. Seguidamente, os resultados dos

parâmetros laboratoriais foram organizados e analisados de forma emparelhada para cada grupo de idades. Deste modo, para cada parâmetro foi analisado, dentro de cada subamostra de idades o resultado obtido no grupo de ovócitos de FIV vs os resultados do grupo de ovócitos de ICSI.

Foram detetadas diferenças significativas entre as taxas de fecundação de FIVc e ICSI. O grupo de mulheres com idades entre os 31 e 35 anos revelaram uma taxa de fecundação superior nos ovócitos fertilizados por FIVc ($p=0,049$). Para além disso, a FIVc demonstrou um aproveitamento embrionário superior, bem como uma maior taxa de embriões de elevada qualidade, comparativamente à ICSI na classe de mulheres com idade mais avançada, entre os 36 a 40 anos.

Paralelamente, mesmo não sendo objetivo direto do projeto, é possível realizar um estudo entre os grupos de idades de forma a perceber o impacto do avançar da idade materna nas diferentes variáveis investigadas (**Anexo 4**). Quando é analisada a taxa de fecundação não houve diferenças estatísticas detetadas entre os diferentes grupos de idades, de forma global (**Gráfico 3 Anexo 4**). Concretamente, apesar de verificar um ligeiro decréscimo com o avançar da idade, a taxa de fecundação tanto em FIVc como em ICSI permaneceu estatisticamente insignificativo entre todos os grupos etários, ou seja, neste contexto, a idade feminina não impactou na taxa de fecundação. Em contrapartida, foram identificadas diferenças significativas para as variáveis, aproveitamento embrionário e taxa de alta qualidade embrionária. Tais diferenças foram detetadas no grupo de embriões com origem em ICSI, já os embriões das mesmas pacientes que foram inicialmente fertilizados por FIVc permaneceram semelhantes nos diferentes grupos etários. Mais precisamente, foi detetado um decréscimo na disponibilidade de embriões de ICSI na classe etária entre os 31-35 anos e > 35 anos em relação à classe de idade < 30 anos ($p=0,006$ e $p=0,036$ respetivamente) (**Gráfico 4 Anexo 4**). Também o grupo de pacientes com idade entre os 31-35 anos revelou uma taxa de alta qualidade embrionária inferior comparativamente ao grupo com menos de 30 anos quando o método de fertilização foi a ICSI ($p=0,015$). Para essa mesma variável foi notado um decréscimo tendencialmente não significativo entre os grupos de > 35 e < 30 anos ($p=0,055$) (**Gráfico 5 Anexo 4**).

Tabela 10. Parâmetros laboratoriais de sucesso comparados entre FIVc e ICSI nos ciclos mistos nos diferentes grupos etários femininos. Os resultados foram obtidos após uma análise de Teste t para amostras emparelhadas ou, o Teste de Wilcoxon (Z) nos casos em que não foram atendidos os pressupostos da normalidade. Os valores estatisticamente significativos considerados quando $p < 0,05$ encontram-se destacados.

	Grupo 1 (<30 anos)			Grupo 2 (31-35)			Grupo 3 (36-40)		
	FIVc	ICSI	p	FIVc	ICSI	p	FIVc	ICSI	p
Nº de ciclos	8			6			44		
Ovócitos microinjeta dos/inseminados									
	64	45		27	27		205	173	
Taxa de fecundação (por ovócito inseminado), % média ± DP									
	79,8 ± 19,0	79,2 ± 23,0	0,960	75,5 ± 21,9	39,4 ± 21,2	0,049 (Z)	69,8 ± 31,7	60,1 ± 32,5	0,122 (Z)
Aproveitamento embrionário, n ± DP									
	2,0 ± 1,5	2,5 ± 1,3	0,563	1,33 ± 0,8	0,3 ± 0,5	0,156 (Z)	1,9 ± 1,3	0,9 ± 1,0	<0,001 (Z)
Taxa de Alta Qualidade Embrionária, % média ± DP									
	34,0 ± 38,3	57,1 ± 33,3	0,154	42,8 ± 38,9	13,9 ± 22,1	0,250 (Z)	45,9 ± 41,5	29,7 ± 39,7	0,042 (Z)

Influência da infertilidade feminina nos resultados laboratoriais dos ciclos

De forma a perceber se existe alguma influência do diagnóstico de infertilidade feminina nos parâmetros de sucesso dos ciclos, foi executada uma análise comparativa entre os resultados de FIVc e ICSI (**Tabela 11**). A subamostra incluía 24 casais que realizaram ciclos mistos com a referida etiologia de infertilidade.

Os resultados dos 3 parâmetros laboratoriais revelam-se semelhantes entre as técnicas de FIVc e ICSI, pelo que não são detetadas diferenças estatisticamente significativas para a população de estudo. A inexistência de diferença significativa pode estar relacionada com uma redução considerável no tamanho da amostra face à globalidade da população amostral.

Tabela 11. Parâmetros laboratoriais de sucesso comparados entre FIVc e ICSI nos ciclos mistos considerando a sobpopulação de casais em que o fator de infertilidade foi diagnosticado como feminino. Para a Taxa de Fecundação e a Taxa de Alta Qualidade Embrionária os valores encontram-se apresentados segundo a % $M \pm DP$. O Aproveitamento embrionário está representado pelo valor absoluto, $n \pm DP$. O Teste Não Paramétrico de Wilcoxon (Z) foi realizado por não se cumprirem os pressupostos da normalidade. Não foram detetados valores de p significativos a um nível de significância de 5%.

	FIVc	ICSI	Z	p
Taxa de fecundação	65,9 ± 32,3	65,0 ± 34,9	0,037	0,978
Aproveitamento embrionário	1,7 ± 1,3	1,3 ± 1,4	0,992	0,332
Taxa de Alta Qualidade Embrionária	41,2 ± 43,5	32,3 ± 35,7	0,569	0,589

Capítulo V

Discussão dos Resultados

Diversos estudos individualizados, nos quais um grupo de pacientes é indicado para FIVc e outro grupo diferente para ICSI, podem gerar enviesamento dos resultados e interpretações inadequadas. Por um lado, a análise comparativa dos parâmetros laboratoriais entre ambas pode criar equívocos, visto que esta incidirá sobre amostras espermáticas de diferentes pacientes. Amostras com menor qualidade espermática podem ser tendencialmente encaminhadas para ICSI, o que poderá repercutir-se em efeitos adversos no desenvolvimento dos embriões resultantes (19, 109, 125). No entanto, casais indicados para FIVc apresentam à partida melhor qualidade de amostra masculina, em conjunto com uma competição natural entre espermatozoides durante a fecundação. Consequentemente, a probabilidade em atingir a fertilização deverá ser teoricamente maior (20). Os desequilíbrios inerentes no desenho experimental incluindo a variabilidade entre pacientes introduz confusão no tratamento dos dados de estudo, que deverá ser atenuada com uma abordagem mista, tornando a avaliação mais comparável.

Este projeto envolveu o estudo de ciclos mistos realizados em casais com infertilidade na UMR do CHUSJ. Nesta abordagem, casos graves de infertilidade masculina são identificados como critérios de exclusão, visto que estes são exclusivamente indicados para ICSI. Casos com infertilidade masculina leve, incluídos no estudo, após processamento da amostra espermática, foram analisados conjuntamente com a equipa clínica, que tal fator não seria limitante para a fertilização por um ou outro método. Assim, a abordagem mista permite dar a oportunidade a ambas as técnicas, mesmo nestes casos em que a etiologia é masculina ligeira. Como casos de infertilidade masculina severa não são considerados para estes ciclos, é eliminada a possível influência desse fator. Adicionalmente, a utilização de amostras espermáticas normais/com alterações ligeiras, permite a aplicação da FIVc em conjunto com a ICSI e a comparação dos efeitos de ambas as técnicas de fertilização. Para além disso, situações de primeiro ciclo em que, após estudo do casal, a causa de infertilidade não é identificada, permite um tratamento mais informativo, possibilitando uma abordagem com maior chance de sucesso.

Por outra perspetiva, o estudo de ciclos mistos utilizando os gâmetas dos mesmos pacientes, a partir da mesma estimulação ovárica para comparar métodos de fertilização, elimina qualquer variação clínica associada ao protocolo hormonal ou, outras variáveis inerentes aos pacientes e próprios gâmetas. Permitem, logo, compreender o devido impacto das técnicas de FIV nos indicadores de sucesso clínico.

No presente estudo, pretendeu-se comparar os resultados de parâmetros laboratoriais e clínicos de sucesso relevantes em ciclos de tratamento misto. Nestes, cerca de metade dos ovócitos obtidos da mesma estimulação ovárica foram inseminados por FIVc e a outra metade por ICSI com a mesma amostra espermática. As principais medidas de sucesso das técnicas de fertilização estudadas foram a taxa de fecundação, o aproveitamento embrionário, a taxa de embriões de alta qualidade e a gravidez bioquímica e clínica.

Primeiramente, torna-se relevante uma análise global da condição inicial dos ciclos. A recuperação e a maturidade ovocitária surge como a primeira análise relevante de sucesso de qualquer ciclo. Estas são medidas estimativas de resposta à estimulação ovárica e podem refletir a competência de desenvolvimento dos ovócitos. Segundo o Consenso de Viena, a taxa de recuperação mínima deve ser superior a 70% (132). De uma forma global, nos 58 ciclos incluídos, a taxa de recuperação de CCO atingiu os 81%, encontrando-se assim no nível indicado. Este dado mostra que os protocolos de estimulação ovárica parecem produzir uma resposta adequada, maximizando o número efetivo de ovócitos disponíveis por punção folicular. De facto, um número crescente de CCO recuperados traduz-se num aumento das taxas de fecundação, formação de blastocistos e aumento das taxas de nados vivos (133). No entanto, é importante realçar que esta correlação positiva apenas se verifica até à recuperação de 15 CCO, a partir desse valor o risco de SHO é aumentado (134). No presente estudo, verificou-se 10 situações semelhantes, em que a transferência a fresco foi cancelada, procedendo-se à vitrificação dos embriões formados para uma futura TEC.

No que concerne a taxa de maturidade ovocitária, também essa foi positiva com 81% enquadrando-se na média mínima aconselhada de 75% (132). Ao analisar atentamente a taxa de maturidade ovocitária de cada técnica, esta encontrava-se igualmente superior à média recomendada com 79% para a ICSI e 83% para a FIVc. É de salientar que este conceito de maturidade nuclear não é sinónimo de maturidade citoplasmática e, por isso, esses ovócitos MII podem não estar aptos à fertilização. Além disso, o processo de desnudação é realizado em ovócitos direcionados para ICSI, antes do momento da injeção. Deste modo, ovócitos escolhidos para FIVc não são analisados quanto à sua maturidade nuclear. Em contrapartida, os ovócitos em FIVc em co-incubação com os espermatozoides se não estiverem maduros têm mais tempo para maturar e ser, eventualmente, fertilizados.

A análise relativa à divisão dos ovócitos para FIVc ou ICSI revela que esta foi equitativa, após um valor estatístico não significativo. Logo, o número de ovócitos

alocados para FIVc comparativamente aos de ICSI foi semelhante, tornando os resultados procedentes comparáveis e evitando desvios a nível de cálculos.

Diversos autores que se debruçaram sobre o estudo dos ciclos mistos, encontraram taxas de fecundação superiores quando os ovócitos foram fertilizados por ICSI (106, 107, 121, 135). Tais resultados podem ser um argumento a favor do privilégio da ICSI em prol da FIVc. Contudo, este projeto revelou que a inseminação pelo método tradicional é também capaz de demonstrar taxas de fecundação superiores (**Tabela 4**). A taxa de fecundação apresentada foi calculada considerando o número de ovócitos inseminados, porém, este dado é consistente se esta for relativa aos ovócitos alocados para cada técnica. Ou seja, quando se considera o número de ovócitos recuperados, também esta taxa é significativamente superior em FIVc do que em ICSI. De facto, a FIVc contribuiu para o aumento da taxa de fecundação global dos ciclos mistos, argumento apoiado por outra pesquisa (123).

A taxa de fecundação inferior verificada em ovócitos microinjetados pode dever-se a diversas causas que devem ser ponderadas. Ovócitos com núcleo maduro no momento da desnudação, podem não apresentar maturidade citoplasmática, impedindo a sua progressão (19). Adicionalmente, sabe-se que, a seleção do espermatozoide é subjetiva. De entre esses parâmetros pretende-se escolher aqueles que aparentem boa morfologia e motilidade para aumentar as chances de sucesso (108). Contudo, não é possível prever a eventualidade de serem selecionados espermatozoides com baixo potencial de fecundação, ou com anomalias genéticas, impactando o desenvolvimento subsequente do zigoto (105, 113). Pelo contrário, a FIVc permite a competição e seleção natural do espermatozoide mais compatível bioquimicamente com o ovócito. Por outro lado, a microinjeção pode acarretar danos ao ovócito, inclusive afetar o conteúdo cromossómico e consequentemente interferir com o sucesso da fecundação por indução de erros nas primeiras divisões de clivagem e causar a paragem do ciclo de divisão celular (19, 132, 136). Para além disso, deve ser sempre assegurada a correta montagem e capacidade antivibratória do sistema de micromanipulação. Qualquer perturbação no local de injeção da pipeta é um dano provocado à membrana do ovócito ou ao seu conteúdo intracelular (107, 132).

Todavia, caso não se verificasse a ocorrência de FTF que se demonstrou em ICSI, não se apurariam diferenças significativas e as taxas de fecundação de ambas as técnicas seriam semelhantes. Este resultado indica que a FTF foi impactante para a

fecundação na técnica de ICSI, sendo a explicação para a diminuição significativa da taxa de fecundação. Nos 4 casos em que não houve sinais de fecundação apenas no grupo de ovócitos de ICSI, verificou-se que a taxa de maturidade ovocitária registada nessa subamostra ficou abaixo do recomendado apresentando uma média de 68,8% (132). Como referido anteriormente, sabe-se que, a competência intrínseca do ovócito é determinada não só pela maturidade nuclear, mas também pela maturidade citoplasmática. Por isso, nestes casos, mesmo os ovócitos que se encontravam MII, podiam apresentar imaturidade citoplasmática, contribuindo fortemente para as falhas verificadas. Estes dois fatores, apesar de não refletirem no desempenho laboratorial, são representativos da resposta à estimulação hormonal e competência ovocitária e, portanto, devem ser registados, dado a sua relevância para todos os acontecimentos subsequentes.

Por outro lado, a ocorrência de FTF pode ser indicativa do baixo potencial de fertilização natural do espermatozoide selecionado, podendo ocorrer deficiência no mecanismo de ativação ovocitária, no caso de ICSI (107). Nesses casos de FTF em ICSI, a taxa de fecundação em FIVc superou o valor mínimo recomendado de 61% (132). A ocorrência de fecundação com a FIVc pode ser explicada pelo facto de que os ovócitos são incubados com os espermatozoides ainda com as camadas envolventes do *cumulus oophorus*, o que pode ter sido benéfico para eventuais ovócitos ainda em maturação (72).

Já no caso de FIVc estas falhas estão maioritariamente relacionadas com a capacidade do sistema de cultura em suportar a capacitação espermática e a interação entre espermatozoide e ovócito (132). Atentando nos dois ciclos em que houve falha apenas por FIVc, a idade feminina foi considerada avançada (38 e 39 anos especificamente) e, em ambos os casos a endometriose foi o fator de infertilidade identificado. Aquando do processamento da amostra espermática, uma delas apresentou alterações. Deste modo, a conjugação destes fatores torna complexa a explicação de tal acontecimento. Porém, sabe-se que, para além da idade feminina, a interação com certas condições ginecológicas, como o caso da endometriose, podem estar associados a dificuldades na ocorrência de gravidez no tratamento (137). Mais especificamente as reações inflamatórias que afetam os ovários e a cavidade pélvica com a endometriose dificultam a interação espermatozoide-ovócito, o que naturalmente, interfere com a fecundação (138). Adicionalmente, mesmo que, no caso, não estivesse diagnosticado, mas no dia de ciclo a amostra masculina se encontrava limítrofe, tal fator pode ter contribuído para a

incapacidade de fertilização do ovócito e, conseqüentemente, para ocorrência das FTF (139).

De modo geral, verificaram-se dois ciclos em que ocorreu FTF em ambos os métodos, Relativamente à proporção de ovócitos recuperados foi considerada adequada, >70% para o mínimo de acordo com o consenso de Maribor (137). Considerando o contexto desses ciclos, uma explicação viável para tal ocorrência pode dever-se à idade avançada (ambas as parceiras tinham idade >35) que, como discutido anteriormente, está diretamente relacionada com um aumento da frequência de ovócitos geneticamente anómalos e de embriões com aneuploidias (24, 26). Conseqüentemente, o aumento da idade feminina está correlacionado com um decréscimo no sucesso dos tratamentos de PMA e um aumento dos riscos obstétricos (137).

Este projeto contraria, de facto, grande parte das análises existentes de outros autores que reportam falhas de fecundação superiores em ovócitos fertilizados pelo método convencional (54, 106), registando-se aqui novos resultados. A taxa de FTF em FIVc apresenta um valor entre o indicado (entre 3,5% a 20%) com 6,9%, já a ICSI representa uma taxa superior ao reportado (1 a 3%) com 10,3% (54, 109). Os dados presentes são apoiados, no entanto, pelo estudo de Speyer, O'Neill (125), no qual foram detetados valores comparáveis de FTF. Assim sendo, no caso deste trabalho, a realização dum ciclo individual de ICSI poderia condicionar o sucesso do tratamento. Por serem estes ciclos mistos, a FIVc melhorou o sucesso da fecundação e a probabilidade de o ciclo prosseguir. O protocolo misto mostrou-se, por isso, relevante para evitar o cancelamento do tratamento de 6 casais no total, caso se tratasse de ciclos individuais de FIVc ou ICSI. Tal significaria a ausência de oportunidade para transferir ou vitrificar um embrião, implicando espera para uma nova tentativa. Desta forma, esta abordagem parece ser indicada para reduzir o risco de falhas de fecundação (54, 123).

A partir dos dados obtidos e como consequência de uma maior taxa de fecundação observada em FIVc, esta técnica demonstrou um aproveitamento embrionário superior (**Tabela 5**). Este dado reflete que a FIVc apresentou uma eficiência de ciclo superior em relação à ICSI, contribuindo com mais embriões de qualidade morfológica adequada para serem selecionados para transferência a fresco, ou criopreservação (embriões tipo A, B e C). Como tal, a técnica proporcionou maior número de embriões

utilizáveis para o ciclo em geral, aumentando as chances do casal em alcançar um desfecho positivo do ciclo.

Por outro lado, esta é uma medida geral considerada no momento de transferência ou vitrificação de cada ciclo, independentemente do dia de cultura, e por isso, alguns embriões vão sendo naturalmente perdidos ao longo do ciclo. Tal poderá acontecer devido, por exemplo, à intolerância do embrião às condições *in vitro* com acumular de erros genéticos ao longo das divisões ou dano oxidativo, sendo expectável que nem todos os embriões se desenvolvam corretamente e tenham potencial para gerar uma gravidez (118). Por outro lado, a extensão da cultura permite uma melhor seleção dos embriões (9, 20) quando estes se encontram em fases onde o genoma embrionário já está em funcionamento.

Alguns estudos debruçam-se sobre indicadores como o número total de blastocistos formados, procurando verificar se existe alguma diferença entre ambas as técnicas (106, 107). No entanto, também esta é uma métrica que pode revelar perdas de informação e levar a falta de significância de dados. Por vezes, existem ciclos com grande produção de blastocistos, porém, como apenas é transferido 1 ou 2 desses mesmos, os excedentários podem apenas ser criopreservados e perdidos no tratamento de dados. Ou, em alguns casos há poucos embriões em desenvolvimento, diminuindo consideravelmente a probabilidade de se conseguir realizar uma longa cultura com formação de blastocistos. Tal evento implica a decisão da transferência com embriões menos desenvolvidos que podem por vezes, ser suprimidos dos cálculos (107). Todavia, estudos revelam que a FIVc exibe um número superior de blastocistos (118, 125) e de alta qualidade (107, 124). Uma possível hipótese exposta por Rubino, Viganò (136) indica que embriões fertilizados por ICSI podem não possuir a maquinaria celular necessária para a formação de tais blastocistos devido à ausência de maturidade citoplasmática. Logo, é possível considerar que a ICSI seja igualmente capaz de produzir embriões de boa qualidade morfológica, pelo menos em fase de clivagem, como é sustentado pelo estudo de Lee, Lee (54). Porém, com a extensão da cultura, podem revelar-se não viáveis por interrupção do desenvolvimento (136).

A análise em fase de clivagem mostra-se um indicador relevante no que respeita à capacidade do sistema de cultura em suportar a clivagem embrionária, bem como a qualidade e viabilidade dos embriões (137). A avaliação desta fase no Dia 2 e Dia 3 parece ter o mesmo valor preditivo, sendo especialmente importante para a análise de ciclos com transferência nestas fases e, menos para transferência com blastocistos.

Deste modo, a análise do aproveitamento embrionário deve incluir o número de embriões que foi efetivamente transferido, de forma geral, em termos de fase de cultura, incluindo todos os ciclos. Deve englobar também o número de embriões totais criopreservados no ciclo. Assim sendo, neste projeto foi relevante não excluir essa informação de forma a obter o maior tamanho amostral possível. Por outro lado, a avaliação em diferentes momentos, ou diferentes indicações de ciclo, como o caso de ciclos *freeze-all* (11 ciclos), leva à falta de avaliação em algumas fases do desenvolvimento. Portanto, o aproveitamento embrionário com este cálculo mostra-se mais inclusivo relativamente à real utilização dos embriões por ciclo. É também, por isso, o indicador de análise da eficiência total dos ciclos recomendado para apresentação em estudos (132).

No processo de transferência de embriões, a escolha do embrião foi baseada na sua qualidade morfológica, independentemente de ter sido fertilizado por FIVc ou ICSI. Além disso, a decisão de transferir um ou dois embriões para a paciente depende fundamentalmente da idade, do historial clínico, do consentimento do casal e da etiologia da infertilidade. A análise do estudo incluiu não só a transferência de embriões a fresco, como também a transferência de embriões criopreservados, respeitantes a ciclos mistos iniciados em 2022 e com transferência até junho de 2023. Tais dados permitiram aumentar o tamanho da amostra no que respeita à análise da transferência e calcular a taxa cumulativa, partindo da mesma estimulação ovárica.

A avaliação da disponibilidade de embriões para transferir com origem numa ou outra técnica foi relevante para compreender os resultados obtidos relativamente ao aproveitamento embrionário. Uma vez que a FIVc demonstrou maior aproveitamento embrionário, seria de esperar mais embriões disponíveis deste grupo para transferir, o que se verifica no estudo. De facto, os resultados revelam que o número de ciclos nos quais foram transferidos embriões fertilizados por FIVc foram significativamente mais frequentes do que aqueles que envolveram a transferência de embriões provenientes de ICSI (**Tabela 6**).

Apesar de não ser inferido estatisticamente, de forma geral, parece haver uma tendência crescente para a transferência de embriões em fases mais precoces, comparativamente à transferência de blastocistos. Ainda não é totalmente suportado, no entanto, dados recentes mostraram superioridade na taxa de nascimentos após a transferência de um blastocisto em comparação com a transferência de um embrião em fase de clivagem (82). O ritmo de desenvolvimento desigual entre as técnicas de

fertilização, refletiu-se inclusive em diferenças no número de blastocistos disponíveis e por isso, selecionados para transferir (106, 125). Para tal, foi relevante avaliar estas diferenças em termos de fase de cultura e ainda a qualidade morfológica dos embriões selecionados para transferência, comparando os dois métodos. No estudo de Speyer, O'Neill (125) foi detetado que a escolha de blastocistos com origem em FIVc poderia dever-se ao desenvolvimento mais rápido até este estado, comparativamente aos de ICSI, o que resultaria numa maior disponibilidade de blastocistos para transferir. Para comprovar tal premissa, os autores contabilizaram o número de blastocistos derivados de FIVc e de ICSI observados no dia de formação do primeiro blastocisto. Este indicador demonstrou que o número de blastocistos originários de FIVc superou, de facto, o de ICSI em termos significativos. Deste modo, é reiterada a hipótese de que a FIVc proporciona um número superior de embriões disponíveis para o momento de transferência (125). No entanto, os resultados da bibliografia mostram-se díspares, pelo que alguns autores detetaram maior número de blastocistos formados após a ICSI (106, 140). Neste projeto, os dados demonstram que tanto a FIVc como a ICSI produzem números comparáveis de embriões, em termos de qualidade morfológica e fase de cultura, quando selecionados para a transferência. Ou seja, as transferências envolvendo embriões em fases precoces ou mais avançadas, de maior ou menor classificação morfológica em nada está relacionado com o método de fertilização que lhe deu origem. Explica, portanto, que não existe privilégio da técnica no momento da seleção embrionária para transferência e ambos os métodos revelam números semelhantes de embriões transferidos quer em fase de clivagem blastocistos.

O estudo revelou um maior número de ciclos em que houve vitrificação de embriões de FIVc e ICSI (mista), pelo que a realização dos ciclos mistos permitiu aumento do número eficaz de embriões vitrificados de uma forma geral, o que possibilita novas tentativas futuras (**Tabela 8**). A TEC tem-se mostrado positiva para as taxas de implantação e gravidez, explicadas pela melhoria no estado recetivo do endométrio (9, 20). Os elevados níveis de gonadotrofinas administrados num ciclo a fresco podem estimular precocemente a decidualização e prejudicar a implantação do blastocisto (20). Durante a TEC, os níveis hormonais encontram-se a um nível mais próximo daqueles encontrados fisiologicamente, promovendo a sincronia natural entre o endométrio recetivo e o blastocisto (9, 20). Tal hipótese não pode ser confirmada segundo este desenho experimental, porém um estudo com um intervalo de tempo maior permitiria suportar esta hipótese, comparando as taxas de gravidez cumulativa

entre embriões FIVc e ICSI nos diferentes momentos de transferência. Adicionalmente, pode ser justificado pelo facto de que, os embriões desvitrificados mostram-se capazes de resistir ao *stress* sujeito pelos meios de criopreservação podendo apresentar maior probabilidade de implantação (100, 101).

A FIVc demonstra maior número de embriões transferidos, o que hipoteticamente aumentaria as taxas de gravidez cumulativa. Contudo, a qualidade e a fase de desenvolvimento são equiparáveis no momento da transferência embrionária de FIVc e ICSI. Portanto, esta premissa justifica a proporção semelhante de testes positivos de gravidez entre as técnicas. Outros estudos apresentam resultados comparáveis no que respeita a taxas de gravidez e nados vivos, apesar da maior disponibilidade embrionária com a FIVc (106, 109, 125). Para além disso, os dados anteriores revelam que, apesar das duas técnicas produzirem ritmos de desenvolvimento embrionário diferente, os embriões provenientes de ambas são igualmente competentes para implantar e originar um nado vivo (125, 141). Tais diferenças no ritmo de desenvolvimento, poderão apenas ser indicativos da qualidade do espermatozoide e a interação entre gâmetas aquando da fertilização. No entanto, a ativação do genoma do próprio embrião pode conter um mecanismo genético capaz de alcançar a competência necessária para iguais taxas de gravidez e nascimentos (125). O processo capaz de explicar tal habilidade permanece ainda por explorar.

O aumento da idade feminina está relacionado com uma redução na reserva ovárica e diminuição da qualidade dos ovócitos, diminuindo conseqüentemente o sucesso da concepção, inclusive durante o tratamento de PMA (24, 109, 137). Embora esta relação não esteja diretamente associada com o objetivo do presente estudo e em certa parte já se encontra aprofundada na literatura, foi pertinente investigar este assunto para os dados obtidos numa abordagem mista.

O avançar da idade materna tem um impacto negativo na expressão de genes de ovócitos em metáfase II envolvidos em funções tais como a regulação do ciclo celular, a estabilidade cromossómica, a manutenção de certas vias metabólicas e a resposta ao *stress* (24). Ovócitos de mulheres mais velhas apresentarão, por isso, menor qualidade morfológica e uma resistência inferior às condições laboratoriais (140). Tais aspetos poderão afetar a fecundação destes, que apesar de não ter sido detetado estatisticamente, pode ser notado uma tendência para o decréscimo global observado

nas taxas de fecundação entre os grupos com o avançar da idade (**Gráfico 3 Anexo 4**). Esta tendência não significativa pode ser o reflexo do reduzido tamanho de cada subpopulação que, no entanto, representa um potencial indício para o efeito negativo nos parâmetros consequentes do ciclo (137). De facto, é reconhecida a associação entre o aumento da idade materna com maiores taxas de aneuploidia, produzindo efeito no desenvolvimento embrionário desde fases mais precoces (23, 24). Como reflexo, impactará na disponibilidade de embriões a serem utilizados no ciclo para transferência ou vitrificação, bem como na qualidade embrionária (11). Esta relação foi estatisticamente identificada nos embriões resultantes de ICSI, mostrando uma diminuição no aproveitamento embrionário no grupo de pacientes com idade mais avançada (31-35 e >35 anos) quando comparado com o grupo de mulheres mais jovens (<30 anos) (**Gráfico 4 Anexo 4**). Também foi, de facto, detetado um decréscimo na qualidade desses mesmos grupos de embriões comparativamente aos pertencentes a pacientes mais jovens (**Gráfico 5 Anexo 4**). Contudo, esta influência do fator idade feminina não foi constatada nos embriões que tinham sido originalmente fertilizados por FIVc. Neste contexto, sugeria-se uma amostra mais alargada para um estudo mais aprofundado da idade materna avançada na disponibilidade e qualidade dos embriões em ciclos de tratamento. Mais precisamente, as diferenças estatisticamente significativas podem não ter sido uniformes para os dois métodos entre os diferentes grupos, devido precisamente a esta questão, visto que, de facto a maioria das pacientes a realizar tratamentos de infertilidade em PMA são consideradas de idade avançada (79).

No contexto dos ciclos mistos, foi pertinente avaliar para diferentes grupos de idade feminina os resultados laboratoriais investigados entre ovócitos fertilizados por FIVc e ovócitos fertilizados por ICSI (**Tabela 10**). Tais resultados permitirão inferir se é justificável a aplicabilidade da ICSI em casos mais alargados do que a infertilidade masculina ou, noutra perspetiva, se a FIVc deverá ser considerada na tomada de decisão. Analisando primeiramente a taxa de fecundação, as diferenças foram detetadas no Grupo 2, pelo que os ovócitos microinjetados têm menor probabilidade de fecundar. É importante notar que, nesta faixa etária a taxa de fecundação de ovócitos fertilizados por ICSI foi inferior àquela obtida em FIVc, em todos os 6 ciclos. Contudo, este número reduzido de pacientes leva a pouca confiança neste valor, pelo que seria aconselhável um alargamento do tamanho da amostra de estudo. O Grupo 3, com maior número de dados, mantém a tendência, contudo esta não é significativa, o que suporta a não superioridade entre as técnicas para pacientes em idades mais avançadas (142). Neste Grupo foram detetadas diferenças significativas entre as

técnicas, no que diz respeito ao aproveitamento embrionário e o número de embriões de alta qualidade. A FIVc apresenta um aproveitamento embrionário e uma taxa de embriões de alta qualidade notavelmente superior comparativamente à ICSI. Foi já descrita a existência de mecanismos de reparação de DNA, presentes tanto em ovócitos, como nos embriões, cuja eficiência é diminuída com o aumento da idade (135). Por esse motivo, é possível que os embriões produzidos pela ICSI das pacientes mais velhas não tenham sido suficientemente capazes de corrigir os danos provocados ao fuso meiótico durante a microinjeção. Em contrapartida, a fecundação durante a FIVc ocorre de forma menos invasiva para o ovócito, mantendo a sua integridade, considerando os erros acumulados inertes ao DNA mais envelhecido (24).

O estudo de Farhi, Cohen (119) refere a relevância da ICSI nesta subpopulação para melhorar as taxas de fecundação e de embriões de alta qualidade, reduzindo a interferência de fatores que podem estar comprometidos devido à idade materna, como a interação espermatozoide-ovócito. Contudo, a partir dos 40 anos essas diferenças deixam de ser observadas (119). Efetivamente, outras pesquisas com amostras mais ampliadas sustentam esta hipótese, revelando taxas de fecundação e inclusive taxas de nados vivos semelhantes entre as técnicas para mulheres com idade superior a 39 anos (23, 129). Os resultados obtidos no estudo atual permitem inferir sobre o impacto positivo da FIVc em ciclos com pacientes em idades mais avançadas na eficiência total do ciclo e na qualidade dos embriões produzidos. Mais precisamente, é possível que na fase de clivagem ambas as técnicas revelem resultados similares, porém com o avançar do ciclo a FIVc pode revelar maior disponibilidade de blastocistos para transferir e para criopreservar, como revelado na população em geral. Contudo, este projeto apenas inclui pacientes com idades até 40 anos, logo, segundo as pesquisas referidas, é possível que com idades mais avançadas a tendência seja para a semelhança entre as técnicas.

Conclui-se assim que, para casos com idade materna avançada, mas sem diagnóstico de infertilidade masculina deve ser avaliada a necessidade de realizar uma ICSI. Adicionalmente e, apesar de não ter sido possível o estudo das taxas de gravidez nestes ciclos, devido ao reduzido tamanho de ciclos que cumprissem as condições, dados de estudos anteriores revelam desfechos clínicos semelhantes entre ambas as técnicas (23, 142).

O estudo do fator feminino nos resultados laboratoriais da FIVc e ICSI nos ciclos mistos não revelou quaisquer diferenças significativas, pelo que num contexto de

diagnóstico de infertilidade feminina a FIVc e a ICSI mostram desempenho semelhante. Uma técnica não deve ser preferida em detrimento de outra pelos seus resultados laboratoriais, visto que neste estudo revelam-se semelhantes. É possível concluir que na tomada de decisão para um ciclo individual devem ser considerados outros fatores. No entanto, mostra-se oportuna a investigação mais alargada para confirmar os resultados apresentados, devido, por um lado, ao reduzido número de ciclos com fator feminino incluídos neste estudo e, por outro, a escassez de dados de pesquisas anteriores.

Como discutido, a expansão das indicações da ICSI tem se verificado inclusive em casais com infertilidade inexplicada o que permanece, no entanto, um assunto em aberto. O desenho experimental deste projeto não permitiu a análise comparativa das técnicas nesta subpopulação pelo reduzido tamanho da amostra, contudo, seria interessante para um estudo futuro, considerando os registos promissores de outros autores. Estudos recentes revelam a importância da aplicação dos ciclos mistos para casos de infertilidade inexplicada (135, 143). Na abordagem mista relatada por alguns trabalhos, a ICSI apresenta taxas de fertilização superiores às de FIVc, embora demonstre semelhanças nos desfechos clínicos, nomeadamente na taxa de implantação e gravidez (106, 143). Considerando o objetivo principal da PMA, estes resultados revelam a necessidade de uma maior investigação destes ciclos mistos como uma abordagem informativa tanto para os casais, como para a equipa clínica, além duma solução viável para aumentar as taxas de sucesso por tratamento.

Considerações futuras

Neste estudo, devem ser consideradas algumas limitações inerentes. Primeiramente, inclui uma análise retrospectiva conjunta de dados prospectivos, procurando atenuar possíveis vies de seleção. Além disso, o tamanho das amostras em investigação são relativamente pequenos, o que leva à impossibilidade de pressupor a sua distribuição normal, sendo necessário recorrer a testes não paramétricos, de menor poder estatístico. Embora este estudo tenha proporcionado significância estatística, mostra-se importante novas pesquisas com amostras mais extensas para reiterar a confiabilidade dos desfechos. Por outro lado, o tamanho da amostra não permitiu o estudo das técnicas em subpopulações de diferentes fatores de infertilidade. Futuramente, mostra-se relevante a pesquisa numa metodologia semelhante, incluindo também outros diagnósticos de infertilidade, bem como diferentes graus de infertilidade (primária e secundária) para compreender a influência de cada um nos vários parâmetros analisados. Aliado ao tamanho da amostra, também a extensão do intervalo de tempo revela-se vantajoso para uma análise a longo prazo, que permita incluir o estudo de taxas cumulativas de nados vivos e esclarecer sobre os desfechos clínicos das técnicas. Particularmente, pacientes com hiperestimulação ao protocolo hormonal, foram indicadas para *freeze-all* com cancelamento da transferência embrionária a fresco, não tendo sido consideradas para esta análise, ou para a de gravidez.

Complementarmente, pode ser útil o estudo do dano de ovócito produzido por ICSI, através da contagem de ovócitos degenerados como medida de performance do laboratório e como referência para avaliação do sistema de microinjeção (132). Simultaneamente, o novo indicador de performance formulado por Chamayou, Ragolia (106) pode ser útil para apreciação periódica da eficiência clínica de tratamentos de PMA no laboratório. Para tal será necessário anotar o número de blastocistos produzidos por ambas as técnicas no dia da formação do primeiro blastocisto, de forma a estudar a capacidade e rapidez de cada técnica para produzir um blastocisto. Finalmente, um dos aspetos importantes a serem analisados futuramente inclui também a hora adequada para desnudação de ovócitos para ICSI, visto que tal processo pode mostrar relevância para o conseqüente sucesso da fecundação.

Capítulo VI

Conclusão

Nos últimos anos tem se verificado um aumento da utilização da ICSI em ciclos com as mais diversas indicações que ultrapassam a infertilidade masculina. Os desfechos clínicos comparáveis da ICSI e da FIV alertam para o possível risco da sobre utilização da microinjeção, associada a maiores incertezas sobre anomalias cromossômicas ou malformações congénitas na descendência (18, 144). Em contrapartida, a FIVc é encarada como uma técnica menos complexa e dispendiosa a nível financeiro e humano. Esta mostra-se adequada para casais sem infertilidade masculina, na medida em que os seus parâmetros de sucesso são comparáveis com a técnica mais moderna. Este estudo revelou que a FIVc permitiu a melhoria na taxa de fecundação dos ciclos, bem como menores cancelamentos de ciclo por FTF. Para além disso, o método convencional apresentou maior disponibilidade de embriões apropriados para transferência e vitrificação. Embora se verifiquem disparidades na disponibilidade de embriões clinicamente utilizáveis, a FIVc e a ICSI são capazes de produzir igual sucesso de ciclo. Assim, de forma geral, as equipas de PMA devem desenvolver e aplicar critérios próprios e rigorosos de forma a eleger a abordagem terapêutica adequada ao casal. Deve considerar-se toda a história reprodutiva, bem como o diagnóstico de infertilidade.

O desenho experimental criado por um ciclo misto permite um estudo eficiente no que respeita à exclusão de fatores de confusão que possam impactar os dados obtidos, incluindo variabilidade entre ovócitos. Adicionalmente, cada paciente pode servir como o seu próprio controlo, já que não haverá influência da qualidade espermática ou a etiologia de infertilidade nas técnicas. A seleção dos ovócitos para um ou outro método de fertilização é aleatória, reduzindo variações na distribuição numérica dos mesmos. A análise da influência de fatores como a idade e infertilidade feminina proporcionaram o esclarecimento do possível efeito e comparação dos parâmetros resultantes em cada técnica. O projeto revela que estes fatores por si só não devem ser um fator indicativo para um ciclo exclusivo de ICSI e esta indicação deve ser profundamente ponderada.

A realização dos ciclos mistos na clínica poderá ser encarada como uma abordagem elucidativa e adequada para casais em início de tratamento. Em primeiro lugar, permite ao corpo clínico direcionar o tratamento na ausência de histórico de ciclos anteriores, ou caso diagnóstico seja inexplicado. Em segundo lugar, proporciona à equipa no laboratório a oportunidade de compreender a capacidade de fertilização dos espermatozoides e a relação bioquímica com o ovócito. Comparativamente a um ciclo individual, diminui o risco de cancelamento do ciclo por falhas de fecundação,

assegurando com maior probabilidade a transferência a fresco com um embrião de ambas as técnicas, em conjunto com uma maior disponibilidade embrionária de qualidade para tentativas futuras, sem ser necessário um novo protocolo de estimulação ovárico. Proporciona, portanto, ao casal, a partir da mesma estimulação, maiores chances de obter uma gravidez.

Em suma, estes ciclos podem constituir uma vantagem como primeira abordagem para casais a iniciar tratamento em PMA, pela sua relação custo-efeito, bem como na sua aplicabilidade, registo e interpretação de resultados para controlo periódico de indicadores de performance laboratorial.

Por último, a realização do Estágio concedeu-me uma aprendizagem aprofundada dos conhecimentos teóricos e práticos de um Laboratório de PMA. O acompanhamento de dezenas de ciclos com diferentes históricos clínicos permitiu-me adquirir ferramentas críticas da abordagem à infertilidade e a perspetiva clínica que deve ser tomada. Foi possível treinar com material excedentário para desenvolvimento das técnicas a nível prático. Inspirou-me para a dinâmica quotidiana, o espírito entre toda a equipa, bem como a responsabilidade e sensibilidade do Embriologista para a interação com os pacientes e o seu papel no tratamento da infertilidade. O Estágio preparou-me para continuar o meu percurso na Área da Reprodução.

Referências Bibliográficas

1. Moore K, Persaud V, Torchia M. Keith L. Moore, T.V.N.Persaud, Mark G. Torchia: The Developing Human. Clinically Oriented Embryology. 11th edition. Elsevier, 2020.
2. World Health O. WHO fact sheet on infertility. Global Reproductive Health. 2021;6(1).
3. Glatstein I, Chavez-Badiola A, Curchoe CL. New frontiers in embryo selection. Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2023;40(2):223-34.
4. Reprodução SPdMd. A infertilidade conjugal. [cited 2023 Janeiro 23]. Available from: <https://www.spmr.pt/perguntas>.
5. Carneiro MM, França Ferreira MC. Infertility awareness: why should we care? Women & Health. 2021;61(6):501-2.
6. Vander Borght M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. Clinical Biochemistry. 2018;62:2-10.
7. De Geyter C. Assisted reproductive technology: impact on society and need for surveillance. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. 2019;33(1):3-8.
8. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. The Lancet. 1978;312(8085):366.
9. Niederberger C, Pellicer A, Cohen J, Gardner DK, Palermo GD, O'Neill CL, et al. Forty years of IVF. Fertility and Sterility. 2018;110(2):185-324.e5.
10. Tiitinen A. Single embryo transfer: Why and how to identify the embryo with the best developmental potential. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. 2019;33(1):77-88.
11. Balli M, Cecchele A, Pisaturo V, Makieva S, Carullo G, Somigliana E, et al. Opportunities and Limits of Conventional IVF versus ICSI: It Is Time to Come off the Fence. Journal of Clinical Medicine [Internet]. 2022; 11(19).
12. Chambers GM, Dyer S, Zegers-Hochschild F, de Mouzon J, Ishihara O, Banker M, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies world report: assisted reproductive technology, 2014†. Human Reproduction. 2021;36(11):2921-34.

13. De Geyter C, Wyns C, Calhaz-Jorge C, de Mouzon J, Ferraretti AP, Kupka M, et al. 20 years of the European IVF-monitoring Consortium registry: what have we learned? A comparison with registries from two other regions. *Human Reproduction*. 2020;35(12):2832-49.
14. Labs EGGGoGPil, De los Santos MJ, Apter S, Coticchio G, Debrock S, Lundin K, et al. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories (2015). *Human Reproduction*. 2016;31(4):685-6.
15. Gianaroli L, Veiga A, Gordts S, Ebner T, Woodward B, Plas C, et al. ESHRE certification of ART centres for good laboratory and clinical practice†. *Human Reproduction Open*. 2022;2022(4):hoac040.
16. Dang VQ, Vuong LN, Luu TM, Pham TD, Ho TM, Ha AN, et al. Intracytoplasmic sperm injection versus conventional in-vitro fertilisation in couples with infertility in whom the male partner has normal total sperm count and motility: an open-label, randomised controlled trial. *The Lancet*. 2021;397(10284):1554-63.
17. Liu L, Wang H, Li Z, Niu J, Tang R. Obstetric and perinatal outcomes of intracytoplasmic sperm injection versus conventional in vitro fertilization in couples with nonsevere male infertility. *Fertility and Sterility*. 2020;114(4):792-800.
18. Ombelet W, Van Blerkom J, Nargund G, Janssen M, Jacobs P, Van der Auwera I, et al. Perinatal outcome of babies born after using a simplified IVF culture system versus ICSI with sibling oocytes: a prospective cohort study. *Reproductive BioMedicine Online*. 2022;45(3):574-82.
19. Girsh E. *A Textbook of Clinical Embryology*: Cambridge University Press; 2021.
20. Gardner DK, Weissman, A., Howles, C.M., & Shoham, Z. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques*. (5th ed.) ed: CRC Press.; 2017.
21. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, Racowsky C, de Mouzon J, Sokol R, et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertility and Sterility*. 2017;108(3):393-406.
22. Vollenhoven B, Hunt S. Ovarian ageing and the impact on female fertility. *F1000Research*. 2018;7.
23. Tannus S, Son W-Y, Gilman A, Younes G, Shavit T, Dahan M-H. The role of intracytoplasmic sperm injection in non-male factor infertility in advanced maternal age. *Human Reproduction*. 2017;32(1):119-24.

24. Zhang JJ, Liu X, Chen L, Zhang S, Zhang X, Hao C, et al. Advanced maternal age alters expression of maternal effect genes that are essential for human oocyte quality. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(4):3950-61.
25. Centers for Disease C, Prevention. American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology. 2009 assisted reproductive technology success rates: national summary and fertility clinic reports. Atlanta, GA: US Dept of Health and Human Services. 2014.
26. Thomas C, Cavazza T, Schuh M. Aneuploidy in human eggs: contributions of the meiotic spindle. *Biochemical Society Transactions*. 2021;49(1):107-18.
27. Charalambous C, Webster A, Schuh M. Aneuploidy in mammalian oocytes and the impact of maternal ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2023;24(1):27-44.
28. Deenadayal Mettler A, Govindarajan M, Srinivas S, Mithraprabhu S, Evenson D, Mahendran T. Male age is associated with sperm DNA/chromatin integrity. *The Aging Male*. 2020;23(5):822-9.
29. Altimimi AN, Almurshdi MK. SPERM PARAMETERS OF THE INFERTILE PATIENTS IN RELATION TO SOCIO DEMOGRAPHIC FACTORS. *European Chemical Bulletin*. 2022;11(4):81-.
30. Rosiak-Gill A, Gill K, Jakubik J, Fraczek M, Patorski L, Gaczarzewicz D, et al. Age-related changes in human sperm DNA integrity. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(15):5399.
31. Eisenberg ML, Meldrum D. Effects of age on fertility and sexual function. *Fertility and Sterility*. 2017;107(2):301-4.
32. Ribas-Maynou J, Yeste M, Becerra-Tomás N, Aston KI, James ER, Salas-Huetos A. Clinical implications of sperm DNA damage in IVF and ICSI: updated systematic review and meta-analysis. *Biological Reviews*. 2021;96(4):1284-300.
33. Martínez E, Bezazián C, Bezazián A, Lindl K, Peliquero A, Cattaneo A, et al. Sperm DNA fragmentation and male age: results of in vitro fertilization treatments. *JBRA Assist Reprod*. 2021;25(4):533-9.
34. Yang L, Wang H, Yang L, Zhao M, Guo Y, Bovet P, et al. Maternal cigarette smoking before or during pregnancy increases the risk of birth congenital anomalies: a

population-based retrospective cohort study of 12 million mother-infant pairs. *BMC Medicine*. 2022;20(1):4.

35. Omolaoye TS, El Shahawy O, Skosana BT, Boillat T, Loney T, du Plessis SS. The mutagenic effect of tobacco smoke on male fertility. *Environmental Science and Pollution Research*. 2022;29(41):62055-66.

36. Roach AN, Zimmel KN, Thomas KN, Basel A, Bhadsavle SS, Golding MC. Preconception paternal alcohol exposure decreases IVF embryo survival and pregnancy success rates in a mouse model. *Molecular Human Reproduction*. 2023;29(2):gaad002.

37. Li Y, Zhang X, Shi M, Guo S, Wang L. Resilience acts as a moderator in the relationship between infertility-related stress and fertility quality of life among women with infertility: a cross-sectional study. *Health and Quality of Life Outcomes*. 2019;17(1):38.

38. World Health O. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen: World Health Organization; 2021.

39. Ben Abid H, Fekih M, Fathallah K, Chachia S, Bibi M, Khairi H. Office hysteroscopy before first in vitro fertilization. A randomized controlled trial. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2021;50(7):102109.

40. Bragato BF, de Paula Vitorino J. Relação entre Síndrome dos Ovários Policísticos e Infertilidade. *Revista Eletrônica Acervo Médico*. 2022;20:e11279-e.

41. Mustafa M, Sharifa AM, Hadi J, Iizam E, Aliya S. Male and female infertility: causes, and management. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*. 2019;18:27-32.

42. Tuddenham S, Hamill MM, Ghanem KG. Diagnosis and Treatment of Sexually Transmitted Infections: A Review. *Jama*. 2022;327(2):161-72.

43. Tanbo T, Fedorcsak P. Endometriosis-associated infertility: aspects of pathophysiological mechanisms and treatment options. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2017;96(6):659-67.

44. Busnelli A, Garolla A, Tersigni C, Parodi V, Inversetti A, Levi-Setti PE, et al. Sperm human papillomavirus infection and risk of idiopathic recurrent pregnancy loss: insights from a multicenter case–control study. *Fertility and Sterility*. 2023;119(3):410-8.

45. Montano L. Reproductive biomarkers as early indicators for assessing environmental health risk. *Toxic Waste Management and Health Risk*; Marfe, G, Di Stefano, C, Eds. 2020:113-45.
46. Kandavel V, Cheong Y. Does intra-uterine insemination have a place in modern ART practice? *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2018;53:3-10.
47. Sakkas D, Ramalingam M, Garrido N, Barratt CLR. Sperm selection in natural conception: what can we learn from Mother Nature to improve assisted reproduction outcomes? *Human Reproduction Update*. 2015;21(6):711-26.
48. Munck ND, Elkhatib I. Individualized Fertilization Technique in the IVF Laboratory: IVF or ICSI? In: Lawrenz B, Fatemi HM, editors. *Individualized In-Vitro Fertilization: Delivering Precision Fertility Treatment*. Cambridge: Cambridge University Press; 2021. p. 65-78.
49. Santos-Ribeiro S, Mackens S, Racca A, Blockeel C. Towards complication-free assisted reproduction technology. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2019;33(1):9-19.
50. Castañón Bernardo V, Bueno Rodríguez G, Lozano Arana MD, Moyano Gallego MJ. Revisión sobre la situación actual de la fecundación clásica en el laboratorio de reproducción asistida. *Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana*. 2022;38(4 Octubre-Noviembre-Diciembre).
51. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*. 1992;340(8810):17-8.
52. Dai C, Zhang Z, Shan G, Sun Y. Automation for ICSI Techniques and Systems. *Manual of Intracytoplasmic Sperm Injection in Human Assisted Reproduction: With Other Advanced Micromanipulation Techniques to Edit the Genetic and Cytoplasmic Content of the Oocyte*. 2021:129.
53. Pereira N, O'Neill C, Lu V, Rosenwaks Z, Palermo GD. The safety of intracytoplasmic sperm injection and long-term outcomes. *Reproduction*. 2017;154(6):F61-F70.
54. Lee SH, Lee JH, Park YS, Yang KM, Lim CK. Comparison of clinical outcomes between in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in IVF-ICSI split insemination cycles. *Clin Exp Reprod Med*. 2017;44(2):96-104.

55. Franasiak JM, Polyzos NP, Neves AR, Yovich JL, Ho TM, Vuong LN, et al. Intracytoplasmic sperm injection for all or for a few? *Fertility and Sterility*. 2022;117(2):270-84.
56. Simopoulou M, Sfakianoudis K, Rapani A, Giannelou P, Anifandis G, Bolaris S, et al. Considerations regarding embryo culture conditions: from media to epigenetics. *in vivo*. 2018;32(3):451-60.
57. Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Ingerslev HJ. Effect of oxygen concentration on human embryo development evaluated by time-lapse monitoring. *Fertility and Sterility*. 2013;99(3):738-44.e4.
58. Zhao X, Ma B, Mo S, Ma L, Chang F, Zhang L, et al. Improvement of pregnancy outcome by extending embryo culture in IVF-ET during clinical application. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2018;35(2):321-9.
59. Yang W, Zhang T, Li Z, Ren X, Huang B, Zhu G, et al. Combined analysis of endometrial thickness and pattern in predicting clinical outcomes of frozen embryo transfer cycles with morphological good-quality blastocyst: A retrospective cohort study. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(2):e9577.
60. Cuevas-Sáiz I, Pons MC, Vargas M, Mendive A, Enedáguila N, Solanes M, et al. The Embryology Interest Group: updating ASEBIR's morphological scoring system for early embryos, morulae and blastocysts. *Medicina Reproductiva y Embriología Clínica*. 2018;5.
61. Minasi MG, Colasante A, Riccio T, Ruberti A, Casciani V, Scarselli F, et al. Correlation between aneuploidy, standard morphology evaluation and morphokinetic development in 1730 biopsied blastocysts: a consecutive case series study. *Human Reproduction*. 2016;31(10):2245-54.
62. Rienzi L, Cimadomo D, Delgado A, Minasi MG, Fabozzi G, Gallego Rd, et al. Time of morulation and trophectoderm quality are predictors of a live birth after euploid blastocyst transfer: a multicenter study. *Fertility and Sterility*. 2019;112(6):1080-93.e1.
63. Hurtado de Mendoza M, Cuadros J, Arroyo G, Ten J, Pons M, Prados F, et al. II Cri-terios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos". *Cuadernos de Embriología Clínica*. 2015.
64. Alpha Scientists in Reproductive M, Embryology ESIGo. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting†. *Human Reproduction*. 2011;26(6):1270-83.

65. Guo N, Yang F, Liu Q, Ren X, Zhao H, Li Y, et al. Effects of cumulus cell removal time during in vitro fertilization on embryo quality and pregnancy outcomes: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2016;14(1):18.
66. Rienzi LF, Maggiulli R, Ubaldi FM. Oocyte Denuding. In: Nagy ZP, Varghese AC, Agarwal A, editors. *In Vitro Fertilization: A Textbook of Current and Emerging Methods and Devices*. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 133-45.
67. Ashibe S, Irisawa K, Yokawa K, Nagao Y. Mechanism of the adverse effect of hyaluronidase used for oocyte denudation on early development of bovine embryos. *Zygote*. 2021;29(5):337-41.
68. Tepla O, Topurko Z, Masata J, Jirsová S, Moosova M, Fajmonova E, et al. Relative Position of the Meiotic Spindle and Polar Body as a Marker of Oocyte Maturation Improves the Utilization and Pregnancy Rates. 2021.
69. Balaban B, Keles I, Ebner T. Morphological Assessment of Oocyte Quality. *Manual of Oocyte Retrieval and Preparation in Human Assisted Reproduction*. 2022:85.
70. Cheruveetil MA, Shetty PK, Rao KA, Jaffar M, Rajendran A, Asif M, et al. Impact of Prematuration Culture on Zygote Morphology in In Vitro Maturation: An Early Clue to Embryo Competence. *International Journal of Infertility & Fetal Medicine*. 2022;13(1):5-14.
71. Holubcová Z, Kyjovska D, Martonova M, Páralová D, Klenkova T, Kloudová S. Human egg maturity assessment and its clinical application. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2019(150):e60058.
72. Wang X, Xiao Y, Sun Z, Zhen J, Yu Q. Effect of the time interval between oocyte retrieval and ICSI on embryo development and reproductive outcomes: a systematic review. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2021;19(1):34.
73. Mizuno S, Ishikawa Y, Matsumoto H, Sato M, Ida M, Fukuda A, et al. The timing of cumulus cell removal for intracytoplasmic sperm injection influences the capability of embryonic development. *Reproductive medicine and biology*. 2019;18(1):111-7.
74. Bori L, Meseguer F, Valera MA, Galan A, Remohi J, Meseguer M. The higher the score, the better the clinical outcome: retrospective evaluation of automatic embryo grading as a support tool for embryo selection in IVF laboratories. *Human Reproduction*. 2022;37(6):1148-60.

75. Zhang J, Wang C, Zhang H, Zhou Y. Sequential cleavage and blastocyst embryo transfer and IVF outcomes: a systematic review. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2021;19(1):142.
76. Reimundo P, Gutiérrez Romero JM, Rodríguez Pérez T, Veiga E. Single-embryo transfer: a key strategy to reduce the risk for multiple pregnancy in assisted human reproduction. 2021;2(2):179-88.
77. Bosch E, De Vos M, Humaidan P. The Future of Cryopreservation in Assisted Reproductive Technologies. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:67.
78. Neuhausser WM, Vaughan DA, Sakkas D, Hacker MR, Toth T, Penzias A. Non-inferiority of cleavage-stage versus blastocyst-stage embryo transfer in poor prognosis IVF patients (PRECiSE trial): study protocol for a randomized controlled trial. *Reproductive Health*. 2020;17(1):16.
79. Sunderam S, Kissin DM, Crawford SB, Folger SG, Boulet SL, Warner L, et al. Assisted Reproductive Technology Surveillance - United States, 2015. *MMWR Surveill Summ*. 2018;67(3):1-28.
80. İnal HA, Öztürk İnal Z. Early-cleavage versus blastocyst stage embryo transfer: a prospective comparative study. *J Turk Ger Gynecol Assoc*. 2021;22(4):279-85.
81. Wei D, Liu J-Y, Sun Y, Shi Y, Zhang B, Liu J-Q, et al. Frozen versus fresh single blastocyst transfer in ovulatory women: a multicentre, randomised controlled trial. *The Lancet*. 2019;393(10178):1310-8.
82. Glujovsky D, Farquhar C, Quinteiro Retamar AM, Alvarez Sedo CR, Blake D. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2016(6).
83. Cameron NJ, Bhattacharya S, McLernon DJ. Cumulative live birth rates following blastocyst- versus cleavage-stage embryo transfer in the first complete cycle of IVF: a population-based retrospective cohort study. *Human Reproduction*. 2020;35(10):2365-74.
84. Zhao J, Huang B, Li N, Wang X, Xu B, Li Y. Relationship between advanced maternal age and decline of endometrial receptivity: a systematic review and meta-analysis. *Aging*. 2023;15.

85. Simón C, Gómez C, Cabanillas S, Vladimirov I, Castellón G, Giles J, et al. A 5-year multicentre randomized controlled trial comparing personalized, frozen and fresh blastocyst transfer in IVF. *Reproductive BioMedicine Online*. 2020;41(3):402-15.
86. Latif S, Martins Da Silva S, Davies M, Mavrelou D, Foo X, Sangster P, et al. Fertility preservation provision in the NHS: a national assessment of care policies. *Human Fertility*. 2022:1-6.
87. Tzukerman N, Rotem O, Shapiro MT, Maor R, Meseguer M, Gilboa D, et al. Using Unlabeled Information of Embryo Siblings from the Same Cohort Cycle to Enhance In Vitro Fertilization Implantation Prediction. *Advanced Science*. 2023;n/a(n/a):2207711.
88. Liao Q, Zhang Q, Feng X, Huang H, Xu H, Tian B, et al. Development of deep learning algorithms for predicting blastocyst formation and quality by time-lapse monitoring. *Communications Biology*. 2021;4(1):415.
89. Sciorio R. Use of time-lapse monitoring in medically assisted reproduction treatments: a mini-review. *Zygote*. 2021;29(2):93-101.
90. Shui X, Yu C, Li J, Jiao Y. Development and validation of a pregnancy prediction model based on ultrasonographic features related to endometrial receptivity. *Am J Transl Res*. 2021;13(6):6156-65.
91. Wang Y, Chen C, Liang J, Fan L, Liu D, Zhang X, et al. A comparison of the clinical effects of thinning and drilling on laser-assisted hatching. *Lasers in Medical Science*. 2022;37(1):1-9.
92. Lacey L, Hassan S, Franik S, Seif MW, Akhtar MA. Assisted hatching on assisted conception (in vitro fertilisation (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI)). *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2021(3).
93. Montag MHM, Morbeck DE. *Principles of IVF Laboratory Practice: Laboratory Set-Up, Training and Daily Operation*: Cambridge University Press; 2023.
94. Curfs MHJM, Cohlen BJ, Slappendel EJ, Schoot DC, Derhaag JG, van Golde RJT, et al. A multicentre double-blinded randomized controlled trial on the efficacy of laser-assisted hatching in patients with repeated implantation failure undergoing IVF or ICSI. *Human Reproduction*. 2023:dead173.
95. Wei C, Xiang S, Liu D, Wang C, Liang X, Wu H, et al. Laser-assisted hatching improves pregnancy outcomes in frozen-thawed embryo transfer cycles of cleavage-

stage embryos: a large retrospective cohort study with propensity score matching. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2023;40(2):417-27.

96. Endo Y, Mitsuhashi S, Hayashi M, Fujii Y, Motoyama H. Laser-assisted hatching on clinical and neonatal outcomes in patients undergoing single vitrified Blastocyst transfer: A propensity score–matched study. *Reproductive Medicine and Biology*. 2021;20(2):182-9.

97. Del Collado M, Andrade GM, Gonçalves NJN, Fortini S, Perecin F, Carriero MM. The embryo non-invasive pre-implantation diagnosis era: how far are we? *Animal Reproduction*. 2023;20:e20230069.

98. Greco E, Litwicka K, Minasi MG, Cursio E, Greco PF, Barillari P. Preimplantation genetic testing: where we are today. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(12):4381.

99. Sonigo C, Amsellem N, Mayeur A, Laup L, Pistilli B, Delalogue S, et al. Disease-free survival does not differ according to fertility preservation technique for young women with breast cancer. *Fertility and Sterility*. 2023;119(3):465-73.

100. Mohamed Noor Khan N-A, Sarbandi M-S. Embryo Cryopreservation: The Significant Other of ART. *Journal of Clinical and Health Sciences*; Vol 8 No 1 (2023): *Journal of Clinical and Health Sciences*. 2023.

101. Arav A, Natan Y. The Near Future of Vitrification of Oocytes and Embryos: Looking into Past Experience and Planning into the Future. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2019;46(3):182-7.

102. Paffoni A, Reschini M, Pisaturo V, Guarneri C, Palini S, Viganò P. Should rescue ICSI be re-evaluated considering the deferred transfer of cryopreserved embryos in in-vitro fertilization cycles? A systematic review and meta-analysis. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2021;19(1):121.

103. Dang VQ, Vuong LN, Ho TM, Ha AN, Nguyen QN, Truong BT, et al. The effectiveness of ICSI versus conventional IVF in couples with non-male factor infertility: study protocol for a randomised controlled trial. *Hum Reprod Open*. 2019;2019(2):hoz006.

104. Wyns C, Bergh C, Calhaz-Jorge C, De Geyter C, Kupka MS, Motrenko T, et al. ART in Europe, 2016: results generated from European registries by ESHRE. *Human reproduction open*. 2020;2020(3):hoaa032.

105. Glenn TL, Kotlyar AM, Seifer DB. The Impact of Intracytoplasmic Sperm Injection in Non-Male Factor Infertility-A Critical Review. *J Clin Med.* 2021;10(12).
106. Chamayou S, Ragolia C, Alecci C, Storaci G, Romano S, Sapienza R, et al. More blastocysts are produced from fewer oocytes in ICSI compared to IVF - results from a sibling oocytes study and definition of a new key performance indicator. *Reprod Biol Endocrinol.* 2021;19(1):116.
107. Sauerbrun-Cutler MT, Huber WJ, 3rd, Has P, Shen C, Hackett R, Alvero R, et al. Is intracytoplasmic sperm (ICSI) better than traditional in vitro fertilization (IVF): confirmation of higher blastocyst rates per oocyte using a split insemination design. *J Assist Reprod Genet.* 2020;37(7):1661-7.
108. Fan W, Li SW, Li L, Huang Z, Ma Q, Wang Y, et al. Outcome of conventional IVF and ICSI on sibling oocytes in the case of isolated teratozoospermia. *J Assist Reprod Genet.* 2012;29(9):905-10.
109. Yovich JL, Conceicao JL, Marjanovich N, Ye Y, Hinchliffe PM, Dhaliwal SS, et al. An ICSI rate of 90% minimizes complete failed fertilization and provides satisfactory implantation rates without elevating fetal abnormalities. *Reprod Biol.* 2018;18(3):301-11.
110. Penzias A, Azziz R, Bendikson K, Falcone T, Hansen K, Hill M, et al. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for non-male factor indications: a committee opinion. *FERTILITY AND STERILITY.* 2020;114(2):239-45.
111. Li Z, Wang AY, Bowman M, Hammarberg K, Farquhar C, Johnson L, et al. ICSI does not increase the cumulative live birth rate in non-male factor infertility. *Human Reproduction.* 2018;33(7):1322-30.
112. Sustar K, Rozen G, Agresta F, Polyakov A. Use of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in normospermic men may result in lower clinical pregnancy and live birth rates. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology.* 2019;59(5):706-11.
113. Biliangady R, Kinila P, Pandit R, Tudu NK, Sundhararaj UM, Gopal IST, et al. Are we justified doing routine intracytoplasmic sperm injection in nonmale factor infertility? A retrospective study comparing reproductive outcomes between in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in nonmale factor infertility. *Journal of Human Reproductive Sciences.* 2019;12(3):210.

114. Nguyen TT, Doan HT, Quan LH. The spindle of oocytes observed by polarized light microscope can predict embryo quality. *International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology*. 2019;8(1):131-5.
115. Dobson S, Ola B. ICSI or IVF for nonmale-factor infertility? 2021. p. 515-21.
116. Supramaniam PR, Granne I, Ohuma EO, Lim LN, McVeigh E, Venkatakrisnan R, et al. ICSI does not improve reproductive outcomes in autologous ovarian response cycles with non-male factor subfertility. *Human Reproduction*. 2020;35(3):583-94.
117. Plachot M, Belaisch-Allart J, Mayenga J-M, Chouraqui A, Tesquier L, Serkine AM. Outcome of conventional IVF and ICSI on sibling oocytes in mild male factor infertility. *Human Reproduction*. 2002;17(2):362-9.
118. Deng J, Kuyoro O, Zhao Q, Behr B, Lathi RB. Comparison of aneuploidy rates between conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in in vitro fertilization–intracytoplasmic sperm injection split insemination cycles. *F&S Reports*. 2020;1(3):277-81.
119. Farhi J, Cohen K, Mizrachi Y, Weissman A, Raziel A, Orvieto R. Should ICSI be implemented during IVF to all advanced-age patients with non-male factor subfertility? *Reprod Biol Endocrinol*. 2019;17(1):30.
120. Isikoglu M, Avci A, Kendirci Ceviren A, Aydinuraz B, Ata B. Conventional IVF revisited: Is ICSI better for non-male factor infertility? Randomized controlled double blind study. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*. 2021;50(7):101990.
121. Peng N, Ma S, Li C, Liu H, Zhao H, Li LJ, et al. Intracytoplasmic Sperm Injection May Not Improve Clinical Outcomes Despite Its Positive Effect on Embryo Results: A Retrospective Analysis of 1130 Half-ICSI Treatments. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:877471.
122. Drakopoulos P, Garcia-Velasco J, Bosch E, Blockeel C, de Vos M, Santos-Ribeiro S, et al. ICSI does not offer any benefit over conventional IVF across different ovarian response categories in non-male factor infertility: a European multicenter analysis. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2019;36(10):2067-76.
123. Goswami G, Gouri MD. Relevance of Split In vitro Fertilization-Intracytoplasmic Sperm Injection Method of Insemination in Normozoospermic and Mildly Oligospermic Men: A Retrospective Study. *J Hum Reprod Sci*. 2020;13(2):145-9.

124. Yu C-M, Fei L, Zhang J-H, Dai X-L, Wang Y-F, Chen L. Analysis of the split insemination (IVF+ICSI) treatment in patients with borderline semen in first cycle. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*. 2022;51(10):102491.
125. Speyer B, O'Neill H, Saab W, Seshadri S, Cawood S, Heath C, et al. In assisted reproduction by IVF or ICSI, the rate at which embryos develop to the blastocyst stage is influenced by the fertilization method used: a split IVF/ICSI study. *J Assist Reprod Genet*. 2019;36(4):647-54.
126. Ou Y-C, Lan K-C, Huang F-J, Kung F-T, Lan T-H, Chang SY. Comparison of in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in extremely low oocyte retrieval cycles. *Fertility and sterility*. 2010;93(1):96-100.
127. Jiang L, Qian Y, Chen X, Ji X, Ou S, Li R, et al. Effect of early rescue ICSI and split IVF-ICSI in preventing low fertilization rate during the first ART cycle: A real-world retrospective cohort study. *Reprod Med Biol*. 2022;21(1):e12420.
128. Boulet SL, Mehta A, Kissin DM, Warner L, Kawwass JF, Jamieson DJ. Trends in Use of and Reproductive Outcomes Associated With Intracytoplasmic Sperm Injection. *JAMA*. 2015;313(3):255-63.
129. Haas J, Miller TE, Nahum R, Aizer A, Kirshenbaum M, Zilberberg E, et al. The role of ICSI vs. conventional IVF for patients with advanced maternal age—a randomized controlled trial. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2021;38(1):95-100.
130. Vlaisavljevic V, Apter S, Capalbo A, D'Angelo A, Gianaroli L, Griesinger G, et al. The Maribor consensus: report of an expert meeting on the development of performance indicators for clinical practice in ART. *Hum Reprod Open*. 2021;2021(3):hoab022.
131. Mustafa KB, Yovich JL, Marjanovich N, Yovich SJ, Keane KN. IVF-ICSI Split insemination reveals those cases of unexplained infertility benefitting from ICSI even when the DNA fragmentation index is reduced to 15% or even 5%. *Androl Gynecol: Curr Res* 2016; 4 (1). of. 2016;7:2.
132. Embryology ESIGo, Alpha Scientists in Reproductive M. The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of art laboratory performance indicators. *Human Reproduction Open*. 2017;2017(2):hox011.

133. Fanton M, Cho JH, Baker VL, Loewke K. A higher number of oocytes retrieved is associated with an increase in fertilized oocytes, blastocysts, and cumulative live birth rates. *Fertility and Sterility*. 2023;119(5):762-9.
134. Kim HH. More is better: oocyte number and cumulative live birth rate. *Fertility and Sterility*. 2023;119(5):770-1.
135. Younes G, Tannus S, Son W-Y, Dahan MH. When to do intracytoplasmic sperm injection: a prospective comparison. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2019;300(5):1461-71.
136. Rubino P, Viganò P, Luddi A, Piomboni P. The ICSI procedure from past to future: a systematic review of the more controversial aspects. *Hum Reprod Update*. 2016;22(2):194-227.
137. Group ECPW, Vlaisavljevic V, Apter S, Capalbo A, D'Angelo A, Gianaroli L, et al. The Maribor consensus: report of an expert meeting on the development of performance indicators for clinical practice in ART†. *Human Reproduction Open*. 2021;2021(3):hoab022.
138. de Ziegler D, Pirtea P, Carbonnel M, Poulain M, Cicinelli E, Bulletti C, et al. Assisted reproduction in endometriosis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2019;33(1):47-59.
139. Esteves SC. Who cares about oligozoospermia when we have ICSI. *Reproductive BioMedicine Online*. 2022;44(5):769-75.
140. Kim MS, Kim J, Youm HW, Park JY, Choi HY, Jee BC. Embryonic development in human oocytes fertilized by split insemination. *Obstet Gynecol Sci*. 2015;58(3):217-22.
141. Kim HJ, Yoon HJ, Jang JM, Lee WD, Yoon SH, Lim JH. Evaluation of human embryo development in in vitro fertilization- and intracytoplasmic sperm injection-fertilized oocytes: A time-lapse study. *Clin Exp Reprod Med*. 2017;44(2):90-5.
142. Sunderam S, Boulet SL, Kawwass JF, Kissin DM. Comparing fertilization rates from intracytoplasmic sperm injection to conventional in vitro fertilization among women of advanced age with non-male factor infertility: a meta-analysis. *Fertility and Sterility*. 2020;113(2):354-63.e1.
143. Yovich JL, Conceicao JL, Marjanovich N, Wicks R, Wong J, Hinchliffe PM. Randomized allocation of oocytes to IVF or ICSI for IVF-naïve cases with unexplained

infertility in an IVF-ICSI Split protocol favors ICSI to optimize live birth outcomes. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*. 2021;17(3):010-37.

144. Esteves SC, Roque M, Bedoschi G, Haahr T, Humaidan P. Intracytoplasmic sperm injection for male infertility and consequences for offspring. *Nature Reviews Urology*. 2018;15(9):535-62.

Anexos

Anexo 1

Tabela 12. Anexo 1. Número de transferências realizadas em TE e TEC para cada método. Por linha estão representados o número de TE e TEC realizadas por cada método com o número de embriões respetivo a cada condição entre parêntesis. O Total representado na última linha descreve o número total de transferências por método e respetivo número de embriões entre parêntesis. O Total representado na coluna à direita representa o número total de transferências realizadas em TE e TEC e respetivo número total de embriões transferidos.

	FIVc	ICSI	Mista	Total
Nº de TE realizadas (Nº de Embriões Transferidos)	24 (36)	12 (15)	7 (14)	43 (65)
Nº de TEC realizadas (Nº de Embriões Transferidos)	11 (11)	4 (4)	3 (6)	18 (21)
Total	35 (47)	16 (19)	10 (20)	61 (86)

Anexo 2

Tabela 13. Anexo 2. Fase de desenvolvimento embrionária do total de 61 transferências realizadas, com um total de 86 embriões transferidos, 47 embriões de FIVc e 19 de ICSI e 20 embriões. As transferências podiam englobar uma das 3 opções: embriões derivados apenas de FIVc, apenas de ICSI ou transferência mista, 1 embrião derivado de FIVc em conjunto com 1 derivado de ICSI. A escolha é baseada no(s) melhor(es) embrião(ões) disponível(eis) dependendo da fase de desenvolvimento e qualidade embrionária e não do método no qual o embrião teve origem. Por coluna está representado o nº de embriões transferidos de determinado método para cada fase de desenvolvimento com a percentagem face ao nº total de embriões transferidos desse método. O Total representado na última linha descreve o número total de transferências por método e respetiva percentagem relativa. O Total representado na coluna à direita representa o número total de transferências por fase de desenvolvimento embrionário.

Número de Embriões Transferidos	FIVc	ICSI	Mista	Total (Fase de Desenvolvimento)
Clivagem	31 (64,6%)	10 (52,3%)	12 (60%)	37
Mórula	3 (6,3%)	3 (15,8%)	4 (20%)	5
Blastocisto	14 (29,2%)	6 (31,6%)	4 (20%)	20
Total (Método)	35 (57,4%)	16 (26,2%)	10 (16,4%)	61

Anexo 3

Tabela 14. Anexo 3. Qualidade dos embriões selecionados para transferência embrionária. Por coluna está representado o número de transferências realizadas de determinado método para cada fase categoria de qualidade embrionária e, entre parêntesis, a percentagem face ao nº total de embriões transferidos desse método. O Total representado na última linha descreve o número total de transferências por método. O Total representado na coluna à direita representa o número total de transferências por categoria de desenvolvimento embrionário.

Número transferências s realizadas	FIVc	ICSI	MISTA	Total
A ou A+B	11 (31,4%)	9 (56,3%)	5 (50%)	25
B ou B+C	20 (57,2%)	2 (12,4%)	5 (50%)	27
C	4 (11,4%)	5 (31,3%)	0	9
Total	35 (57,4%)	16 (26,2%)	10 (16,4%)	61

Anexo 4

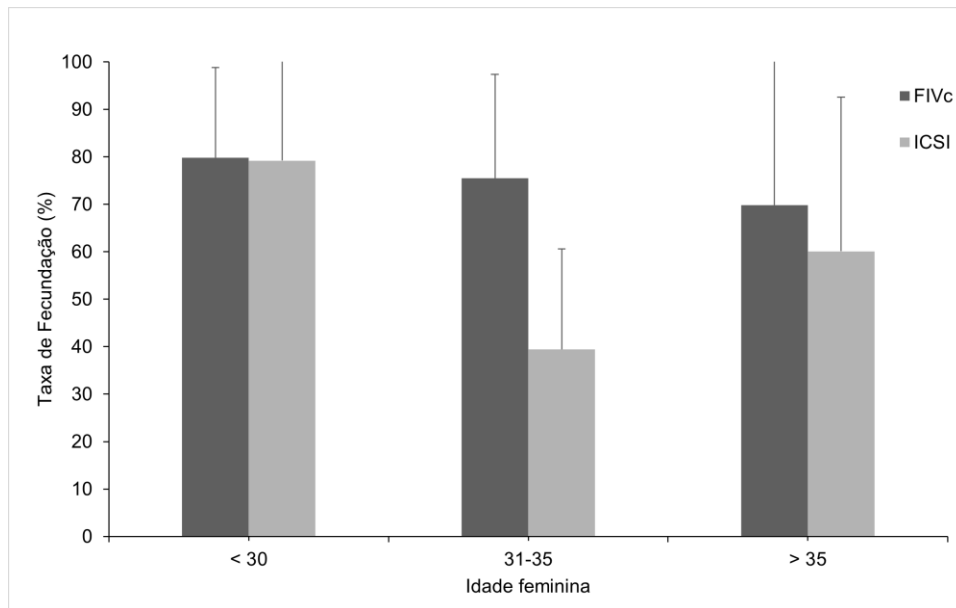


Gráfico 3. Anexo 4. Relação do fator idade feminina na taxa de fecundação de acordo com os métodos de fertilização nos ciclos mistos. A variável categórica idade feminina encontra-se dividida em 3 subgrupos: < 30 anos considerada jovem (N= 6); 31-35 anos (N= 8); > 35 anos considerada avançada (N= 44). Os dados refletem a taxa de fecundação média em % incluindo o Desvio Padrão representado pelas barras de erro. Para o estudo da influência da idade feminina na taxa de fecundação o Teste de Kruskal-Wallis não revelou quaisquer diferenças significativas entre os grupos etários, tanto para ovócitos fertilizados por FIVc ($H=0,118$; $p= 0,943$) como por ICSI ($H= 4,619$; $p= 0,099$).

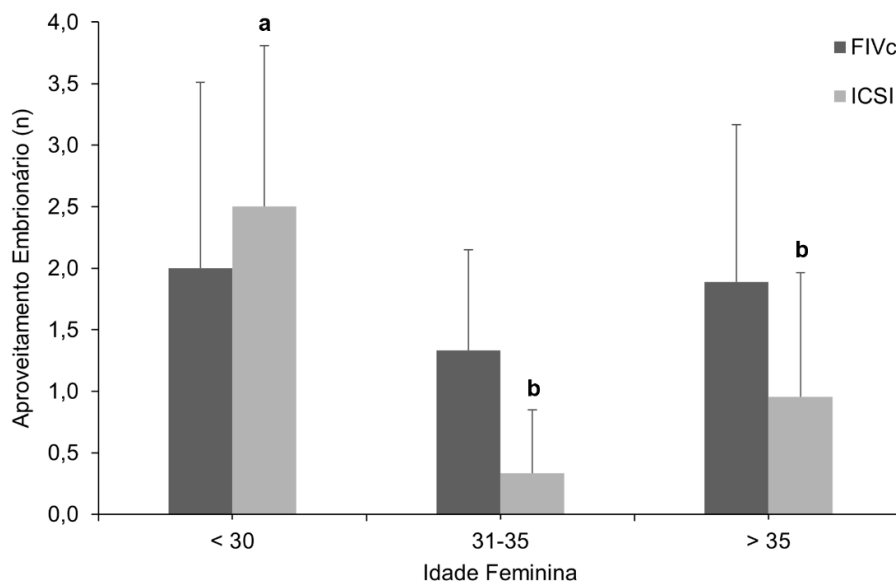


Gráfico 4. Anexo 4. Relação do fator idade feminina no aproveitamento embrionário de acordo com os métodos de fertilização nos ciclos mistos. Os dados refletem o aproveitamento embrionário em valor absoluto (n) incluindo o Desvio Padrão representado pelas barras de erro. O estudo da influência da idade feminina no aproveitamento embrionário com o Teste de Kruskal-Wallis revelou diferenças significativas, representadas pelas letras diferentes (a e b) apenas para o aproveitamento de embriões de ICSI ($H=10,002$; $p=0,007$). Registou-se, por meio de comparações múltiplas entre grupos, um decréscimo entre o grupo <30 anos e o grupo 31-35 ($H=25,167$; $p= 0,006$) e entre o primeiro e para pacientes de idade mais avançada ($H= 14,956$; $p= 0,036$).

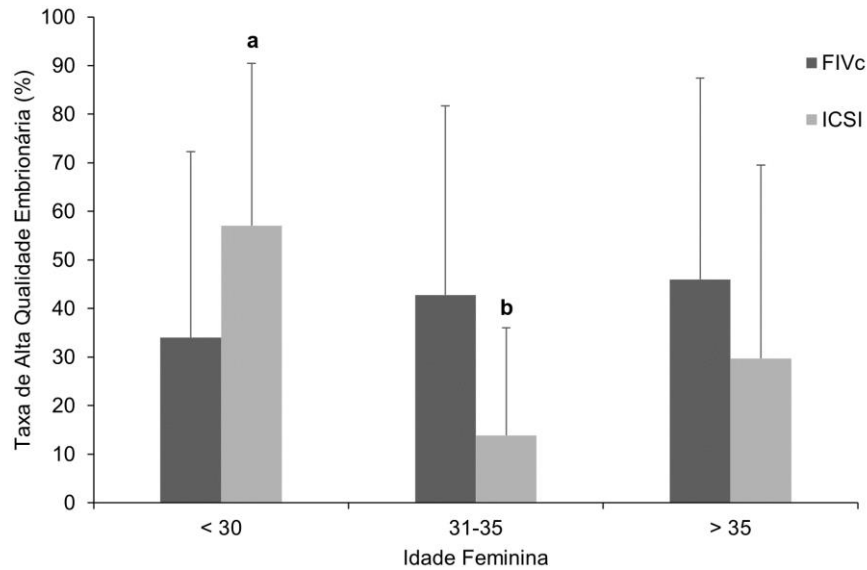


Gráfico 5. Anexo 4. Relação do fator idade feminina na taxa de alta qualidade embrionária de acordo com os métodos de fertilização nos ciclos mistos. Os dados refletem a taxa de alta qualidade embrionária em % incluindo o Desvio Padrão representado pelas barras de erro. O estudo da influência da idade feminina na melhor qualidade dos embriões com o Teste de Kruskal-Wallis revelou diferenças significativas, representadas pelas letras diferentes (**a** e **b**) apenas para o aproveitamento de embriões de ICSI ($H=8,429$; $p=0,015$). Registou-se, por meio de comparações múltiplas entre grupos, um decréscimo entre o grupo <30 e o de 31-35 anos ($H=22,683$; $p= 0,015$).

