



CEIE - Centro de Estudos de
Infertilidade e Esterilidade

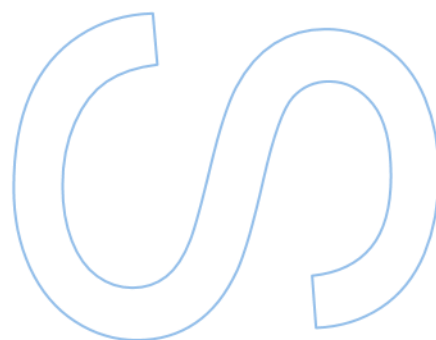
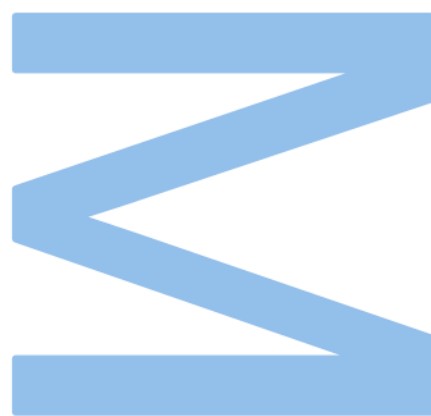
Estudo Retrospectivo do Sucesso das Transferências de Embriões a Fresco *versus* Embriões Criopreservados

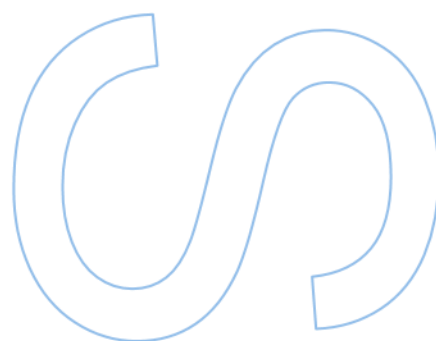
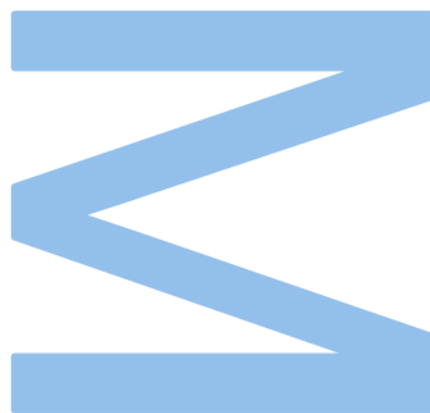
Beatriz Gomes Domingues

Mestrado em Biologia Celular e Molecular
Departamento de Biologia
2021/2022

Orientador

Vasco Manuel Leal Martins de Almeida, Professor Auxiliar,
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto





Declaração de Honra

Eu, Beatriz Gomes Domingues, inscrito(a) no Mestrado em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto declaro, nos termos do disposto na alínea a) do artigo 14.º do Código Ético de Conduta Académica da U.Porto, que o conteúdo do presente relatório de estágio reflete as perspetivas, o trabalho de investigação e as minhas interpretações no momento da sua entrega.

Ao entregar este relatório de estágio, declaro, ainda, que o mesmo é resultado do meu próprio trabalho de investigação e contém contributos que não foram utilizados previamente noutros trabalhos apresentados a esta ou outra instituição.

Mais declaro que todas as referências a outros autores respeitam escrupulosamente as regras da atribuição, encontrando-se devidamente citadas no corpo do texto e identificadas na secção de referências bibliográficas. Não são divulgados no presente relatório de estágio quaisquer conteúdos cuja reprodução esteja vedada por direitos de autor.

Tenho consciência de que a prática de plágio e auto-plágio constitui um ilícito académico.

Beatriz Gomes Domingues

Porto, Dezembro 2022

Agradecimentos

Primeiramente quero agradecer ao meu orientador, o Professor Vasco Almeida, pela oportunidade de estágio, e por toda a compreensão que demonstrou por mim desde o início do meu percurso, incluindo desde a licenciatura. Agradeço ainda a toda a equipa que me acolheu no CEIE, em especial à minha supervisora no laboratório, a Doutora Isabel Damião e à Doutora Sara Oliveira, que foram excelentes mentoras, sempre muito compreensivas e amigas.

Agradeço, também, aos meus colegas e amigos, nomeadamente à Filipa, ao Paulo, à Paula, à Sílvia, à Nádia, à Betisa, ao Nickolas e ao Lucas, não só pelos momentos de descontração, mas também pelo apoio reforçado. Agradeço, ainda, ao Luís.

Agradeço profundamente à Maria Inês, pela ajuda com toda a análise estatística envolvida nos resultados, por toda a paciência demonstrada e pela disponibilidade em ajudar-me neste trabalho.

Agradeço aos meus pais que me ajudaram a manter o foco, sempre prestáveis, acolhedores e dispostos a ajudar-me em tudo o que preciso. Agradeço também à minha irmã Marta, que me acompanhou nalguns dos meus momentos mais difíceis, é a melhor irmã que alguém poderia ter.

Resumo

A infertilidade tem-se mostrado uma doença cada vez mais prevalente na população devido a uma série de fatores, genéticos e ambientais. A Procriação Medicamente Assistida permite auxiliar imensos casais a realizar o desejo de ter um filho. Dentro dos tratamentos possíveis que um casal pode realizar, a fertilização *in vitro* e a microinjeção intracitoplasmática de espermatozoides são os mais indicados para diversos fatores de infertilidade e implicam uma transferência embrionária. As transferências de embriões podem ser do tipo a fresco, ou com embriões criopreservados. A obtenção de uma gravidez após uma transferência permanece, ainda, um desafio para muitas mulheres, sendo de extrema importância otimizar as condições da transferência de modo a aumentar a taxa de sucesso o máximo possível. Uma das questões mais importantes em relação às transferências embrionárias prende-se com a decisão de transferir embriões frescos ou criopreservados. Foi, por isso, realizado um estudo retrospectivo numa amostra de pacientes de uma clínica de fertilidade, com o objetivo de comparar as taxas de sucesso para ambos os tipos de transferências, considerando, adicionalmente, outros fatores. Através de testes estatísticos e uma análise multivariada por *Frequent Pattern Mining* foi possível verificar um aumento da taxa de sucesso quando realizada uma transferência de embriões criopreservados, nomeadamente para pacientes com idades entre os 40 e os 44 anos, e, juntamente com os resultados obtidos para a doação de ovócitos, os fatores chave que determinam essa maior probabilidade estão relacionados com os processos de estimulação ovárica e preparação endometrial. Outros fatores estudados, tais como o número de embriões transferidos e a utilização de eclosão assistida, não demonstraram influência no sucesso das transferências.

O presente estudo, permitiu concluir que, as transferências de embriões criopreservados poderão ser mais vantajosas, sobretudo para as faixas etárias mais elevadas.

Palavras-chave: PMA, transferência embrionária, transferência de embriões criopreservados, transferência de embriões a fresco, TEC, gravidez

Abstract

Infertility has become more prevalent among the general population, due to several factors, such as genetic and environmental ones. Assisted Reproductive Technologies allow lots of couples to accomplish their wish of having a child. Among the treatments available, *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection are the ones that are most used when faced with several infertility factors and require an embryo transfer. Embryo transfers can be performed with fresh or frozen embryos. To achieve pregnancy after an embryo transfer remains a challenge for many women and so, it is essential to optimize embryo transfers' conditions in order to maximize their success rate. One crucial question regarding embryo transfers is the choice between performing a fresh or a frozen embryo transfer. Therefore, it was conducted a retrospective study within a sample of patients from a fertility clinic with the aim to compare the success rates between the two types of embryo transfers, considering, additionally, other factors. Using statistical tests and multivariable analysis through *Frequent Pattern Mining* it was possible to verify an increase of the success rates when performing frozen embryo transfers, especially for patients between 40 and 44 years old and, together with oocyte donation results, it was determined that ovarian stimulation and endometrial preparation were key factors to achieve this higher probability of success. Other factors studied, such as the number of embryos transferred and the application of assisted hatching did not show an influence in the embryo transfers' success.

The present study allowed to conclude that frozen embryo transfers may have a better outcome, particularly when it comes to older patients.

Keywords: ART, embryo transfer, fresh embryo transfer, frozen embryo transfer, FET, pregnancy

Índice

Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Lista de Tabelas	viii
Lista de Gráficos	x
Lista de Figuras.....	xi
Lista de Abreviaturas.....	xii
Introdução.....	1
1. Infertilidade.....	2
1.1 Epidemiologia	2
1.2 Diagnóstico	2
1.3 Infertilidade Idiopática	7
2. Procriação Medicamente Assistida.....	8
2.1 Fertilização <i>in vitro</i>	8
2.2 Microinjeção Intracitoplasmática de Espermatozoides	9
2.3 Classificação da Qualidade Embrionária.....	11
2.4 Criopreservação de Embriões.....	12
2.5 Transferência de Embriões	13
3. Implantação Embrionária.....	15
3.1 Recetividade Endometrial	15
3.2 Interação Blastocisto-Endométrio.....	16
3.3 Suporte Hormonal da Fase Lútea	18
3.4 Gravidez	19
Objetivos	20
Métodos	22
1. Processamento Laboratorial.....	23

1.1 Processamento dos Gâmetas Femininos.....	23
1.2 Processamento dos Gâmetas Masculinos	25
1.3 Protocolo de FIV	27
1.4 Protocolo de ICSI.....	27
1.5 Desenvolvimento Embrionário	28
1.6 Vitrificação e <i>Warming</i> de Embriões	29
1.7 Transferência Embrionária.....	29
1.8 Acompanhamento após Transferência.....	31
2. Processamento Estatístico	32
2.1 Seleção da Amostra.....	32
2.2 Estatística das Taxas de Sucesso.....	32
2.3 <i>Frequent Pattern Mining</i>	33
Resultados e Discussão	35
1. Descrição da Amostra	36
2. Análise das Taxas de Sucesso.....	37
2.1 Taxas de Sucesso Globais	37
2.2 TEF <i>versus</i> TEC	37
2.3 Ciclo Completo <i>versus</i> Faseado	41
2.4 Ciclos de Criopreservação Total de Embriões.....	44
2.5 Influência das Idades	45
2.5.1 Idade Uterina	45
2.5.2 Idade Ovocitária.....	48
3. <i>Frequent Pattern Mining</i>	49
3.1 Nascimento no consequente: $X \rightarrow Nasc +$	50
3.2 Nascimento no antecedente: $Nasc+ \rightarrow Y$	51
4. Discussão dos Resultados	52
Conclusão	55
Referências Bibliográficas.....	57
Anexos	72

Anexo 1.....	73
Anexo 2.....	74
Anexo 3.....	75
Anexo 4.....	76
Anexo 5.....	77
Anexo 6.....	78

Lista de Tabelas

Tabela 1. Terminologia utilizada na classificação das amostras seminais de acordo com o valor obtido em diferentes parâmetros.	4
Tabela 2. Descrição da amostra: frequência absoluta de TEF e de TEC de acordo com a idade das pacientes (uterina e ovocitária), recurso a doação de ovócitos, número de embriões transferidos, utilização de EA e dificuldade de transferência.	36
Tabela 3. Tabela de contingência dos casos positivos e negativos para os três parâmetros de sucesso após TEF e TEC enquanto amostras independentes. Valores-p estatisticamente significativos estão destacados.	38
Tabela 4. Tabela de contingência com os valores utilizados para o teste de <i>McNemar</i> para amostras dependentes. Para cada parâmetro de sucesso a célula do canto superior esquerdo indica o número de casos cujo resultado foi positivo tanto na TEF como na TEC (++); na célula do canto superior direito encontra-se o número de casos positivos na transferência TEF, mas não na TEC (+-); na célula do canto inferior esquerdo encontram-se os casos negativos de TEF e positivos após TEC (-+); a célula do canto inferior direito corresponde aos casos negativos para ambas TEF e TEC.	39
Tabela 5. Valores utilizados na aplicação dos testes de <i>Stouffer</i> (Z_1) e proposto por <i>Digby</i> (Z_2) e respetivos valores-p, p_1 e p_2 . ω representa os pesos e r os valores de teste usados para a combinação das amostras para ambos os testes. Valores-p estatisticamente significativos estão destacados.	40
Tabela 6. Tabela de contingência utilizada para a comparação das taxas de sucesso entre TEF sem recurso a doação de ovócitos e TEF com recurso a doação de ovócitos. Valores-p estatisticamente significativos estão destacados.	42
Tabela 7. Tabela de contingência utilizada para a comparação das taxas de sucesso entre TEF sem e com recurso a doação de ovócitos e as TEC. Valores-p estatisticamente significativos estão destacados.	43
Tabela 8. Tabela de contingência utilizada para a comparação das TEC de ciclos de crio total com as TEF dos ciclos completos. Valores-p estatisticamente significativos estão destacados.	44
Tabela 9. Resumo dos resultados obtidos para as diferenças entre TEF e TEC,	

considerando o ciclo de origem como completo ou faseado e os ciclos de crio total, para as diferentes faixas etárias (-35, [35-39], [40-44], +45). 47

Tabela 10. Representação das transferências como uma transação, onde os atributos estão representados por *True* ou *False*, segundo as características envolvidas no tratamento. 49

Tabela 11. Resultados da análise de *Frequent Pattern Mining* para Nascimento no consequente: $X \rightarrow Nasc +$ 50

Tabela 12. Resultados da análise de *Frequent Pattern Mining* para Nascimento no antecedente: $Nasc+ \rightarrow Y$ 51

Tabela Anexo 1. Tabela de contingência utilizada nos cálculos do teste *Stouffer* e do teste proposto por *Digby*. 73

Tabela Anexo 2. Tabela de contingência utilizada nos cálculos do teste χ^2 para cada faixa etária das idades uterinas, entre TEF e TEC. Valores-p estatisticamente significativos estão destacados. 74

Tabela Anexo 3. Tabela de contingência utilizada nos cálculos do teste de *McNemar* para cada faixa etária das idades uterinas, entre TEF e TEC. Valores-p estatisticamente significativos estão destacados. 75

Tabela Anexo 4. Tabela de contingência utilizada nos cálculos do teste χ^2 para cada faixa etária das idades uterinas, entre TEF sem e com doação de ovócitos. Valores-p estatisticamente significativos estão destacados. 76

Tabela Anexo 5. Tabela de contingência utilizada nos cálculos do teste χ^2 para cada faixa etária das idades uterinas, entre TEF de ciclos completos e TEC de ciclos de crio total. Valores-p estatisticamente significativos estão destacados. 77

Tabela Anexo 6. Tabela de contingência utilizada nos cálculos do teste χ^2 para os casos de doação e não-doação para a idade ovocitária abaixo dos 35 anos. Valores-p estatisticamente significativos estão destacados. 78

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Taxas de sucesso globais, do total da amostra, para gravidez química, gravidez clínica e nascimento.	37
Gráfico 2. Taxas de sucesso para gravidez química, gravidez clínica e nascimento entre TEF e TEC.....	38
Gráfico 3. Taxas de Sucesso para gravidez química, gravidez clínica e nascimento entre ciclos completos (TEF) e ciclos faseados (TEC, TEF proveniente de ovócitos criopreservados, TEF proveniente de doação de ovócitos).....	41
Gráfico 4. Taxas de sucesso entre TEF e TEC de acordo com as idades uterinas e recurso ou não a doação de ovócitos.	45
Gráfico 5. Comparação das taxas de sucesso de TEF sem e com recurso a doação de ovócitos para cada faixa etária.	48
Gráfico Anexo 1. Comparação das taxas de sucesso da amostra total de acordo com as idades uterinas.....	73

Lista de Figuras

- Figura 1.** Equipamento de microinjeção (a) microscópio invertido, conectado a um computador (à direita, parcialmente visível), associado a micromanipuladores à direita e à esquerda que controlam duas micropipetas; (b) micropipetas, *holding* à esquerda e de ICSI à direita. Fonte: Laboratório de PMA do CEIE..... 10
- Figura 2.** Processo de implantação. Aposição: dá-se o posicionamento do blastocisto junto ao endométrio, interagindo com os pinópodes epiteliais. Adesão: inicia-se o contacto entre as células da trofoectoderme e o epitélio endometrial, através de integrinas e selectinas, que permitem ao blastocisto invadir pelo estroma. Invasão: o embrião invade o estroma endometrial através do sincício. Adaptado de *Carlson, B.* (101). 17
- Figura 3.** Pesquisa de CCO após a punção ovárica: placa de Petri contendo o líquido folicular, sob estereomicroscópio (seta amarela) e placa de meio tamponado para lavagem dos CCO (seta azul). Fonte: Laboratório de PMA do CEIE..... 24
- Figura 4.** Maturidade nuclear ovocitária (a) Ovócito em MII, com GP posicionado às 8h; (b) Ovócito imaturo em MI, GP ausente; (c) Ovócito imaturo, sem GP e com vesícula germinativa (seta amarela). [Ampliação 400x]. Adaptado de *Atlas of Human Embryology, ESHRE* (124). 25
- Figura 5.** Procedimento de microinjeção: (a) O ovócito é imobilizado com o GP posicionado às 12 horas e o espermatozoide é mantido na extremidade da pipeta; (b) Após a entrada do espermatozoide, é aspirado e rejeitado citoplasma no interior do ovócito, onde o espermatozoide é depositado; (c) Ao retirar a pipeta do ovócito deve ser garantido que o espermatozoide se mantenha no seu interior. [Ampliação 400x] Adaptado de *Neri et al.* (54). 28
- Figura 6.** Exemplo de cateter utilizado nas transferências embrionárias. Acima, o cateter externo, no qual está inserido o interno (linha amarela). A extremidade à esquerda (linha cinzenta) corresponde à porção que permanece no interior da cavidade uterina, contendo cinco marcas visíveis em ecografia. Abaixo, o cateter interno, possui um comprimento de 23 cm e uma região suave e flexível (à esquerda). Fonte: *CooperSurgical®* (131). 30

Lista de Abreviaturas

CEIE — Centro de Estudos de Infertilidade e Esterilidade

OMS — Organização Mundial de Saúde

APF — Associação Portuguesa de Fertilidade

IST — Infecções Sexuais Transmissíveis

VIH — Vírus da Imunodeficiência Humana

TESE — *Testicular Sperm Extraction*

IVG — Interrupção Voluntária da Gravidez

DIP — Doença Inflamatória Pélvica

SOP — Síndrome do Ovário Poliquístico

HSG — Histerossalpingografia

HSSG — Histerossonosalpingografia

IIU — Inseminação Intrauterina

FIV — Fertilização *in vitro*

PMA — Procriação Medicamente Assistida

ART — *Assisted Reproductive Technologies*

ICSI — *Intracytoplasmic Sperm Injection*

GnRH — Fator Libertador das Gonadotrofinas

hCG — Gonadotrofina Coriônica Humana

SHO — Síndrome de Hiperestimulação Ovárica

CCO — Complexos *cumulus*-ovócito

ON — *Overnight*

PN — Pronúcleos

DGPI — Diagnóstico Genético Pré-Implantação

PGT — *Preimplantation Genetic Testing*

ESHRE — *European Society of Human Reproduction and Embryology*

hpi — Horas pós-inseminação

TEF — Transferência de Embriões a Fresco

TEC — Transferência de Embriões Criopreservados

ZP — Zona Pelúcida

EA — Eclosão Assistida

GP – Glóbulo Polar

M – Metáfase

PVP – Polivinilpirrolidona

ROPA — *Reception of Oocytes from the Partner*

rpm — Rotações por minuto

Introdução

1. Infertilidade

1.1 Epidemiologia

Ao longo da vida, são vários os casais que ambicionam ter filhos, contudo, alguns atravessam dificuldades em gerar um filho ou sofrem abortamento recorrente, o que causa sofrimento, ansiedade e preocupação. Se não ocorrer conceção por um período de 12 ou mais meses, em que há relações sexuais regulares e desprotegidas, a Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica essa incapacidade como infertilidade e é vista como uma doença do sistema reprodutor (1). A infertilidade pode ser do tipo primária, em que nenhum dos elementos do casal obteve uma gravidez, ou secundária, no caso de já ter ocorrido anteriormente uma gravidez em pelo menos um dos elementos (1).

Apesar de haver uma definição global e assente de infertilidade pela OMS, as variações dos critérios usados nos estudos populacionais tornam difícil a obtenção de dados claros e precisos relacionados com a epidemiologia da infertilidade a nível mundial (2), no entanto, estima-se que, no ano de 2010, 48,5 milhões de casais possuíam problemas de infertilidade que se estendiam por um período de pelo menos 5 anos (3).

A prevalência da infertilidade é variável entre países, principalmente entre países desenvolvidos e em desenvolvimento (4). Nos países desenvolvidos, o estilo de vida moderno tem vindo a condicionar a fertilidade, quer masculina quer feminina, por diversos motivos, tais como o consumo de álcool e tabaco, sedentarismo e maus hábitos alimentares (5-7). Adicionalmente, também o adiamento da maternidade, por motivos profissionais e/ou económicos, tem levado a um aumento da infertilidade feminina (8).

Em Portugal, um estudo epidemiológico de 2009 determinou que a infertilidade conjugal afetava entre 9 a 10% dos casais portugueses (9) e, mais recentemente, segundo a Associação Portuguesa de Fertilidade (APF), esta percentagem fixa-se entre os 15 a 20% (10).

1.2 Diagnóstico

Após os 12 meses de tentativas de gravidez sem sucesso é aconselhado consultar o médico, e, caso a idade da mulher seja superior a 35 anos é recomendável procurar

ajuda médica após os 6 meses. A primeira consulta é realizada pelo médico de família no contexto dos cuidados de saúde primários, no entanto, alguns casais, a título particular, decidem recorrer diretamente à especialidade de Ginecologia e Obstetrícia e/ou Medicina da Reprodução, através de uma consulta de infertilidade.

A primeira abordagem ao casal incide na história reprodutiva e sexual: existência de maternidade ou paternidade anteriores, histórico de infeções sexuais transmissíveis (IST) e de utilização de métodos contraceptivos, frequência e ocorrência das relações sexuais durante o período fértil, regularidade dos ciclos menstruais e função erétil e ejaculatória do homem (11-13). Outros aspetos poderão ser clinicamente relevantes, tais como toma de medicação, a ocupação profissional e os estilos de vida (13). Poderão ser realizados ajustes nos hábitos do casal porém, se houver suspeita de um fator patológico o casal é referenciado para a realização de exames complementares, onde tanto o fator masculino como o fator feminino são estudados através de exames físicos, hormonais e eventualmente genéticos (10, 12). Ainda nos cuidados de saúde primários, é importante a realização de análises clínicas genéricas, como o hemograma (e outras que o médico considere pertinente) e serologia infecciosa e/ou de marcadores víricos — Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) e Hepatites (10). Durante o processo de diagnóstico e tratamento é igualmente importante o acompanhamento psicológico do casal uma vez que, a incapacidade de ter filhos é frustrante e geradora de stress que, muitas vezes, agrava as situações de infertilidade (14, 15).

Fator Masculino

Um dos primeiros exames a ser realizado pelo homem é o estudo citomorfobioquímico do esperma, designado por espermograma, que inclui o estudo macroscópico — cor, viscosidade, cheiro, liquefação, volume, pH — e o estudo microscópico — concentração, motilidade, vitalidade e morfologia dos espermatozoides e a presença de outras células, como leucócitos e/ou eritrócitos e células da linha germinativa (13). No espermograma é também tida em conta a aglutinação dos espermatozoides, geralmente indicativa da existência de uma patologia de origem imunológica, em que há produção de anticorpos anti-espermatozoides e que deve ser averiguada pelo médico (16).

Todos os parâmetros estudados são comparados com valores de referência estabelecidos pela OMS e desvios dos respetivos valores possuem uma terminologia específica (**Tabela 1**) (16).

Tabela 1. Terminologia utilizada na classificação das amostras seminais de acordo com o valor obtido em diferentes parâmetros.

Terminologia	Parâmetro
Azoospermia	Ausência de espermatozoides no ejaculado
Teratozoospermia	% de espermatozoides de morfologia normal inferior a 4%
Oligozoospermia	Concentração de espermatozoides inferior a 15×10^6 espz/mL
Astenozoospermia	Motilidade progressiva (lenta+rápida) inferior a 32%
Hematospermia	Presença de eritrócitos no ejaculado
Leucocitospermia	Presença de leucócitos no ejaculado superior a 1×10^6 leuc/mL

Além do espermograma, é importante realizar uma avaliação física que incida sobre os antecedentes cirúrgicos e de lesão testicular, avaliação dos caracteres sexuais secundários e uma observação/palpação dos órgãos externos. Se o exame físico se mostrar relevante, o homem poderá necessitar de ser encaminhado para um médico especialista em urologia/andrologia. Na suspeita de uma endocrinopatia, é recomendado realizar análises às hormonas tiroideias, gonadotrofinas (FSH e LH), testosterona, prolactina, entre outras (17).

Se o espermograma apresentar valores anormais, especialmente no caso de uma azoospermia, cabe ao médico especialista em urologia/andrologia investigar se se trata de uma azoospermia obstrutiva ou não-obstrutiva (18). Uma azoospermia obstrutiva deve-se a um bloqueio, lesão ou malformação congénita dos ductos excretores que impossibilita a libertação das secreções, havendo uma espermatogénese dita normal (17). Numa azoospermia não-obstrutiva, também designada secretora, não há formação de espermatozoides, cuja causa pode ser hormonal (congénita ou adquirida) ou genética. Para determinar a causa exata da azoospermia é fundamental um estudo hormonal (caso não tenha sido realizado previamente) e um estudo genético (em que as causas genéticas mais comuns são as alterações do cariótipo e microdeleções no cromossoma Y) (17).

Perante um quadro de azoospermia, o médico andrologista analisa a hipótese de realizar uma biópsia testicular, ou TESE (do inglês *Testicular Sperm Extraction*) (19), em que é realizada uma ligeira incisão no escroto de modo a obter um pequeno fragmento testicular para pesquisa direta de espermatozoides presentes nos túbulos seminíferos (18). Caso se verifique a presença de espermatozoides no tecido testicular,

estes poderão ser criopreservados para um posterior tratamento de fertilidade (17, 18).

Embora não seja rotineiramente realizada em contexto clínico, a análise da fragmentação do DNA, que traduz a qualidade do DNA espermático, tem-se mostrado relevante na explicação de certos casos de infertilidade masculina e do insucesso de alguns tratamentos de fertilidade (20). É comum ocorrer fragmentação do DNA espermático em casos de teratozoospermia e de astenozoospermia e também em amostras cujo espermograma se apresenta saudável, estando associado a paragens do desenvolvimento embrionário, ausência e baixa taxa de fecundação e aborto espontâneo. A análise da fragmentação do DNA poderá, então, ser aconselhada nos casos de insucesso inexplicado dos tratamentos de fertilidade (20-22).

Fator Feminino

O estudo da mulher é mais complexo que o do homem e é realizado por um médico especialista em ginecologia.

Inicialmente, a história clínica da mulher é exaustivamente analisada, de forma a tentar compreender qual o fator causador de infertilidade, podendo ser hormonal, tubar, uterino ou mais que um fator em simultâneo. Aspetos como a idade e o peso são também considerados relevantes pois condicionam a abordagem clínica (6, 8) e influenciam o sucesso de um eventual tratamento de fertilidade, mesmo na ausência de um fator de infertilidade feminino (23).

É importante o histórico dos ciclos menstruais, uma vez que, a sua irregularidade (oligomenorreia) ou ausência (amenorreia) pode estar associada a disfunções hormonais (24). Queixas de dores intensas no período menstrual (dismenorreia) e/ou nas relações sexuais (dispareunia) não devem ser menosprezadas, sobretudo num possível diagnóstico de endometriose (24). A endometriose é uma patologia que se caracteriza pela presença de tecido endometrial ectópico, ocorrendo maioritariamente na região pélvica, particularmente nos ovários e no peritoneu e a sua etiologia apresenta diversas teorias. A sintomatologia associada juntamente com exames físicos e de imagiologia permitem realizar um diagnóstico, contudo, este só é definitivo após a análise histológica de tecido biopsado (25, 26).

A história clínica abrange também eventuais antecedentes de cirurgia pélvica, de abortamentos de repetição ou interrupção voluntária da gravidez (IVG) e de gravidez ectópica (27). Igualmente relevante é o historial de doença inflamatória pélvica (DIP), a maior causa de danos no aparelho reprodutor feminino, especialmente nas trompas de Falópio (28), sendo frequentemente provocada por IST (29).

Ainda numa abordagem inicial é realizado um exame físico/ginecológico e uma ecografia transvaginal, que permitem a identificação de patologias do colo uterino, deteção ou exclusão de algumas anomalias uterinas, como fibromiomas, sinéquias e malformações congénitas, e a observação de indícios de endometriose (24). O exame físico, juntamente com a observação dos ovários em ecografia, possibilita identificar um quadro de síndrome do ovário poliquístico (SOP) (24). A SOP é a patologia endócrina mais frequente nas mulheres em idade reprodutiva e caracteriza-se pela presença de múltiplos quistos nos ovários e hiperandrogenismo (30).

Na suspeita de um fator hormonal, também designado fator ovulatório, sobretudo quando se verifica amenorreia ou oligomenorreia, ou nos casos de mulheres com idade superior a 35 anos, é realizada a quantificação das gonadotrofinas e do estradiol ao 3º dia do ciclo, e ainda das hormonas tiroideias, prolactina, hormona anti-mulleriana e outras que o clínico considere relevante (27). Geralmente, um nível elevado de FSH é indicativo de uma reserva ovárica diminuta e, um nível elevado de LH é indicativo, ou confirmativo, de SOP (27). São várias as alterações que podem ocorrer nos níveis de gonadotrofinas podendo ter na sua origem diversas condições, como doenças autoimunes, causas genéticas, causas oncológicas, falência ovárica prematura (esgotamento da reserva ovárica em mulheres com idade inferior a 40 anos), condições como subnutrição e baixo peso, entre outras, podendo ser necessário acompanhamento especializado em endocrinologia e a realização de exames adicionais para determinar a origem da endocrinopatia (27).

Na suspeita de um fator tubar, ou tubário, principalmente quando há histórico de DIP ou gravidez ectópica, é realizada uma histerossalpingografia (HSG), que consiste na injeção de um contraste por via uterina e a observação da região pélvica por radiografia (31). Também pode ser realizada uma histerossonosalpingografia (HSSG), em que o contraste injetado é detetado por ecografia em vez de raios X (31). A HSG/HSSG possibilita o estudo da permeabilidade e função tubar através do percurso realizado pelo líquido contrastante, sendo possível observar o bloqueio, malformações ou outras patologias das trompas, e ainda a visualização da morfologia uterina (24).

Nem sempre a existência de uma patologia tubar requer cirurgia, no entanto, algumas condições, como nos casos de hidrossalpinge, que consiste na inflamação das trompas com acúmulo de líquido, é aconselhada a realização de uma laparoscopia (32). Se a HSG/HSSG não demonstrar alterações, mas houver forte suspeita de um fator tubar ou de anomalia da região pélvica, como nos casos em que há histórico de cirurgia invasiva anterior, pode ser indicada a realização de uma laparoscopia diagnóstica (27). A laparoscopia também permite detetar lesões de endometriose na cavidade abdominal

e proceder à sua excisão para análise e/ou remoção (26).

A suspeita de um fator uterino provém, na maioria dos casos, do historial de abortamento recorrente inexplicado (32). Anomalias uterinas congénitas, sinéquias e fibromiomas são vulgarmente diagnosticados na ecografia transvaginal ou, quando realizada, por HSG/HSSG (24, 33). O diagnóstico de anomalias uterinas também pode ser realizado por histerossonografia ou através de histeroscopia (24). Na histerossonografia é injetada uma solução na cavidade uterina e por ecografia eventuais patologias uterinas ficam visíveis. A histeroscopia consiste na introdução de um histeroscópio no útero sendo possível uma visualização direta da cavidade uterina e ainda realizar pequenos atos cirúrgicos como remoção de pólipos (33). A histeroscopia, bem como exames de imagiologia (ecografia 3D ou ressonância magnética), são mais utilizados quando há uma indicação prévia da necessidade de cirurgia ou quando o diagnóstico é incerto (32, 33).

Também pode ser pedido um estudo genético, sobretudo nos casos de amenorreia primária, em que a mulher nunca teve um período menstrual e as outras causas já foram despistadas (34). A análise do cariótipo permite detetar ou despistar várias síndromes, sendo muito conhecida a síndrome de Turner (45, X0) (35).

1.3 Infertilidade Idiopática

Por vezes não é diagnosticada a causa da infertilidade, nem masculina nem feminina, ocorrendo em cerca de 15% a 30% dos casos (36). Nestas situações o médico pode aconselhar iniciar tratamentos de fertilidade, começando pela inseminação intrauterina (IIU) ou, caso se mostre ineficaz, avançar para fertilização *in vitro* (FIV). Quando a idade feminina é superior a 35 anos é preferível iniciar um ciclo de FIV devido à crescente diminuição da probabilidade de sucesso inerente à idade feminina (37).

2. Procriação Medicamente Assistida

Define-se como Procriação Medicamente Assistida (PMA) a reprodução alcançada com auxílio médico, que engloba tratamentos de 1ª linha, tais como a IIU, e tratamentos de 2ª linha, também designados de Tecnologias de Reprodução Assistida (ART do inglês *Assisted Reproductive Technologies*), tais como a FIV e a microinjeção intracitoplasmática de espermatozoides, ou ICSI (do inglês *Intracytoplasmic Sperm Injection*). As ART incluem ainda a transferência embrionária, a criopreservação de gâmetas e de embriões, entre outros (38). Em Portugal, no ano de 2018, foram realizados mais de 2700 tratamentos de PMA e, cerca de 3% dos recém-nascidos a nível nacional provieram dos mesmos (39).

2.1 Fertilização *in vitro*

Uma fertilização *in vitro* engloba qualquer técnica cuja fecundação ocorra em contexto laboratorial, no entanto, no contexto do presente trabalho o termo FIV refere-se a uma técnica específica que consiste na incubação conjunta de ovócitos e espermatozoides de modo a promover a sua fusão. É especialmente recomendada nos casos de fator masculino não grave, fator feminino do tipo tubar e uterino e nos casos de endometriose (40). A FIV é igualmente utilizada nos casos de tentativas falhadas de IIU (11). O primeiro caso de sucesso de uma FIV remonta a 1978 em que foi realizada uma fertilização *in vitro* de um único ovócito humano e o embrião resultante, de 8 células, foi transferido e originou uma gravidez (41). Desde então a crescente procura por tratamentos de fertilidade ao longo das décadas levou a uma otimização de protocolos e aperfeiçoamento das tecnologias envolvidas de modo a aumentar as taxas de sucesso.

Um ciclo de FIV exige uma estimulação ovárica controlada seguida de uma punção ovárica para obtenção dos ovócitos. A estimulação ovárica consiste no recrutamento e desenvolvimento de múltiplos folículos através da administração de fármacos. De modo a evitar um pico de LH, que desencadeia a ovulação, são adicionalmente administrados análogos do fator libertador das gonadotrofinas (GnRH), agonistas ou antagonistas (42). Um agonista mimetiza o GnRH associando-se aos seus recetores na hipófise provocando a saturação dos mesmos. Inicialmente ocorre libertação de FSH e LH, mas com a administração contínua ocorre uma

dessensibilização hipofisária provocando o oposto. Por outro lado, um antagonista liga-se aos recetores de forma a bloquear a ligação do GnRH, o que impede de imediato a sua ação sobre a hipófise e na libertação de FSH e LH (43). Atualmente, os protocolos de estimulação com o uso de antagonistas são mais utilizados devido à sua ação imediata e rapidamente reversível, designados de protocolos curtos (43). A maturação final dos folículos, nomeadamente a reativação da meiose e a luteinização das células foliculares, é promovida pela administração de gonadotrofina coriónica humana (hCG) (42, 44). As doses hormonais de um protocolo de estimulação são variáveis entre mulheres, tendo em consideração, entre outros fatores, o risco de desenvolver síndrome de hiperestimulação ovárica (SHO), uma condição caracterizada por uma dilatação dos ovários, aumento da permeabilidade vascular e risco de rutura dos folículos ováricos, que pode provocar complicações abdominais e/ou torácicas e aumento do risco de tromboembolismo (45). A colheita dos ovócitos é realizada 34 a 36 horas após a aplicação de hCG através de uma punção ovárica (44). A pesquisa por complexos *cumulus*-ovócito (CCO) é realizada imediatamente após a punção (46).

A obtenção de espermatozoides para a FIV deve ser realizada preferencialmente por masturbação no próprio dia, ou seja, a fresco, porém, também são realizados ciclos de FIV com espermatozoides criopreservados, como nos casos de doação masculina ou de uma preservação de fertilidade masculina (47).

Após a incubação dos CCO e do processamento dos espermatozoides, procede-se à inseminação. Após a inseminação, a placa é incubada *overnight* (ON). No dia seguinte, os ovócitos são desnudados de forma a confirmar a ocorrência de fecundação, dada pela visualização de dois pronúcleos (2PN) (44).

2.2 Microinjeção Intracitoplasmática de Espermatozoides

A ICSI é considerada igualmente uma técnica de fertilização *in vitro*, contudo, consiste na introdução direta de um espermatozoide no interior do ovócito. Surgiu em 1992 quando um espermatozoide foi injetado no interior de um ovócito em vez de no espaço perivitelino e, no dia seguinte, foram observados 2PN, confirmando a fertilização (48). A ICSI permite a reprodução em diversas situações — fator masculino severo, espermatozoides derivados de biópsia testicular, utilização de ovócitos criopreservados, em casais serodiscordantes e nos casos em que há ausência de fecundação através de FIV — sendo também utilizada nos casos em que se realiza o diagnóstico genético pré-implantação (DGPI) ou, também designado, teste genético pré-implantação (PGT

do inglês *Preimplantation Genetic Testing*) (40, 49-51).

A microinjeção é um procedimento delicado que implica a utilização de duas micropipetas associadas a micromanipuladores num microscópio invertido com uma placa de aquecimento a 37°C. Uma das micropipetas, designada de *holding*, ou pipeta de sustentação, possui a ponta arredondada e serve para segurar os ovócitos no momento da microinjeção, e a outra, designada de pipeta de microinjeção ou de ICSI, possui a extremidade semelhante a uma agulha e permite aspirar os espermatozoides e introduzi-los nos ovócitos (**Figura 1**) (52).

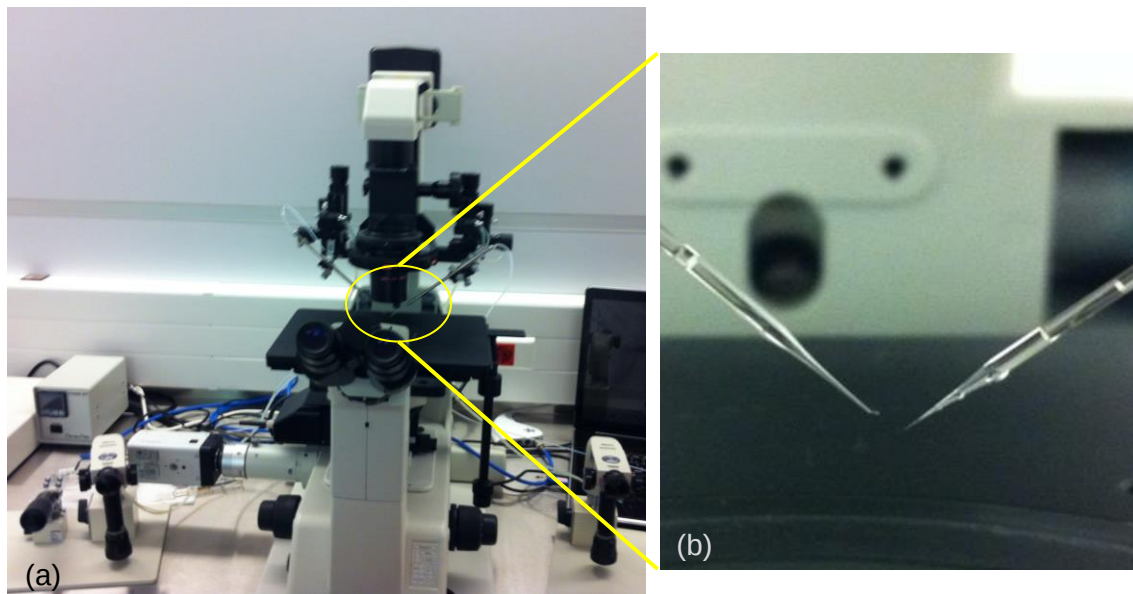


Figura 1. Equipamento de microinjeção (a) microscópio invertido, conectado a um computador (à direita, parcialmente visível), associado a micromanipuladores à direita e à esquerda que controlam duas micropipetas; (b) micropipetas, *holding* à esquerda e de ICSI à direita. Fonte: Laboratório de PMA do CEIE.

O método de obtenção de ovócitos e espermatozoides para uma ICSI é semelhante ao da FIV, contudo, contrariamente à FIV, os ovócitos necessitam de ser desnudados para realizar a microinjeção. Nos casos em que são utilizados ovócitos vitrificados, como numa preservação da fertilidade feminina, é sempre realizada ICSI uma vez que estes foram desnudados previamente à sua vitrificação (53, 54).

Após microinjetados, os ovócitos são colocados em placas, ou placas de *time-lapse*, com meio de cultura para embriões, permanecendo em estufa ou no equipamento de *time-lapse* ON. Semelhante à FIV, a fecundação é avaliada 16 a 18 horas após a microinjeção (53, 54).

2.3 Classificação da Qualidade Embrionária

O desenvolvimento embrionário caracteriza-se por uma série de eventos que ocorrem em intervalos de tempo específicos, sendo a sua avaliação de extrema importância visto que, ao selecionar o melhor embrião para transferência, evita-se a transferência de múltiplos embriões que podem levar a uma gravidez múltipla (55, 56).

O desenvolvimento embrionário pode ser acompanhado através da observação estática dos embriões, ou seja, a placa de cultura embrionária é retirada da estufa e colocada num microscópio invertido, os embriões são observados e avaliados, e a placa é novamente colocada em estufa, no entanto, esta observação exige uma frequente entrada e saída dos embriões da estufa (57, 58). Para otimizar a avaliação da qualidade embrionária, e, simultaneamente, melhorar as condições de cultura, surgiram equipamentos, designados de equipamentos de *time-lapse*, constituídos por uma estufa à qual estão associados um microscópio e uma câmara fotográfica, que permitem a captura contínua de imagens e, assim, visualizar por completo a morfocinética do desenvolvimento embrionário (59-61).

Embora existam vários sistemas de classificação embrionária, em 2011 foi estabelecido pela *Alpha Scientists in Reproductive Medicine* e pela *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) um sistema conhecido como *consensus* de Istambul, que fixou os tempos de observação e os parâmetros a considerar na avaliação dos embriões (62). Após visualização dos PN, 16 a 18 horas pós-inseminação — hpi, (ou 17 ± 1 hpi), deve ser verificada a sua fusão, designada de singamia, ocorrendo aproximadamente às 23 ± 1 hpi. Os zigotos devem ser observados às 28 ± 1 ou 26 ± 1 hpi, se FIV ou ICSI, respetivamente, devendo encontrar-se preferencialmente na fase de 2 células, também chamadas de blastómeros. Ao segundo dia de desenvolvimento, especificamente às 44 ± 1 hpi, os embriões devem encontrar-se na fase de clivagem, ou seja, a dividirem-se por mitose, idealmente no estado de 4 células. Ao terceiro dia de desenvolvimento os embriões devem ser observados e avaliados às 68 ± 1 hpi e ao quarto dia de desenvolvimento às 92 ± 1 hpi, permanecendo em fase de clivagem. Ao quarto dia é esperado que o embrião inicie a compactação, entrando na fase de mórula. Ao quinto dia os embriões são avaliados às 116 ± 1 hpi, devendo encontrar-se na fase de blastocisto (62).

A qualidade embrionária tem como parâmetros o número e tamanho dos blastómeros para cada estado de desenvolvimento, a percentagem de fragmentação celular, a presença ou ausência de multinucleação e, na fase de blastocisto, a morfologia da trofoectoderme, também designada de trofoblasto, e da massa celular

interna (62).

Os embriões podem ser mantidos em cultura durante vários dias até ao 6º dia, em que iniciam a eclosão, ou *hatching*, sendo posteriormente transferidos, criopreservados ou, caso não possuam os requisitos mínimos de qualidade, são descartados.

2.4 Criopreservação de Embriões

A criopreservação de embriões permite a realização de futuros tratamentos de PMA através da possibilidade de se realizar uma transferência de embriões sem a necessidade de iniciar um ciclo completo de FIV ou ICSI, que exige uma nova estimulação ovárica e uma nova recolha de gâmetas femininos e masculinos. Os embriões supranumerários podem ser criopreservados e futuramente transferidos caso a transferência a fresco não resulte em gravidez. Por outro lado, se a primeira transferência resultar em gravidez levada a termo, um casal pode recorrer aos embriões criopreservados para ter outro filho.

A criopreservação permite ainda uma futura transferência embrionária quando esta não é possível devido a SHO ou caso o endométrio não se encontre recetivo. Os ciclos cujos embriões são totalmente criopreservados, ou seja, não há transferência de embriões a fresco (TEF), são designados de ciclos *freeze-all*, ou ciclos de criopreservação total de embriões (frequentemente crio total). Nestes casos, é realizada apenas, futuramente, uma transferência de embriões criopreservados (TEC).

Caso um casal assim o decida, pode doar os embriões excedentários que lhes resta criopreservados, ou seja, realizar uma doação de embriões, podendo ser como recetores desses mesmos embriões outros casais ou mulheres pelo regime *single* (63, 64).

Apesar de existirem dois métodos de criopreservação embrionária, a congelação lenta e a vitrificação, esta última é muito mais utilizada devido a uma maior taxa de sobrevivência de embriões (65, 66), tendo sido adotada pela maioria dos laboratórios.

A vitrificação consiste numa congelação ultrarrápida até um estado vítreo — os embriões são expostos a crioprotetores e mergulhados em azoto líquido a -196°C ocorrendo um súbito decréscimo da temperatura. Os crioprotetores são soluções específicas capazes de proteger as células dos danos da criopreservação (67, 68). Os crioprotetores podem causar efeitos tóxicos nas células dependendo da sua concentração e do tempo de exposição pelo que, os protocolos de vitrificação (e desvitrificação) são minuciosamente respeitados. Após a passagem pelos

crioprotetores, o embrião é colocado numa palheta e o excesso de líquido que o rodeia é retirado de modo a isolar ao máximo o embrião na palheta (67, 68). Dependendo do número de embriões a transferir futuramente, podem ser criopreservados um ou dois embriões na mesma palheta.

O processo de desvitrificação, também designado de *warming*, é igualmente importante para garantir a sobrevivência dos embriões vitrificados. O primeiro passo da desvitrificação caracteriza-se pela diferença de temperatura súbita, ou seja, a palheta é retirada do azoto líquido e imediatamente colocada numa solução crioprotetora. Dependendo do protocolo utilizado, o resto do processo pode envolver mais etapas e lavagens que o processo de vitrificação, sobretudo a passagem dos embriões de soluções mais concentradas para menos concentradas em intervalos de tempo definidos (69, 70).

Após a desvitrificação os embriões são mantidos em meio de cultura para recuperarem a sua forma e são novamente classificados antes de serem transferidos.

2.5 Transferência de Embriões

Os embriões podem ser transferidos em qualquer fase do seu desenvolvimento — clivagem, mórula ou blastocisto — no entanto, é mais comum as transferências serem realizadas ao 5º dia de desenvolvimento e, ocasionalmente, ao 3º, ou seja, em fase de blastocisto e clivagem, respetivamente. O número de embriões a transferir é variável, contudo, para evitar a ocorrência de uma gravidez múltipla, que acarreta riscos de saúde para a gestante, são transferidos, geralmente, um ou dois embriões, os quais são escolhidos de acordo com os seus parâmetros de qualidade (71-73). Excecionalmente, podem ser transferidos 3 embriões, caso haja indicação médica e fatores que assim o justifiquem, tais como baixa qualidade embrionária, transferências anteriores sem sucesso e idade materna avançada (73).

A transferência embrionária é um procedimento delicado que consiste no carregamento dos embriões para um cateter e a colocação do mesmo no interior da cavidade uterina de modo a depositar os embriões no seu interior.

A determinação da morfologia uterina permite antecipar eventuais dificuldades que possam surgir durante a transferência. Geralmente, é realizada, rotineiramente ou no decorrer do acompanhamento do casal infértil, uma ecografia transvaginal de modo a descartar ou identificar anomalias uterinas. Ecograficamente também é determinada a orientação do útero, dada pelo ângulo entre o eixo longitudinal do corpo uterino e o

eixo longitudinal do cérvix, sendo de extrema importância visto que, a inserção do cateter deve acompanhar esse mesmo ângulo para evitar perturbar o endométrio (74). Em pacientes submetidas a histeroscopia tanto a cavidade uterina como o ângulo útero-cervical são facilmente determinados.

Existem vários tipos de cateteres disponíveis — rígidos ou maleáveis. Contrariamente aos rígidos, os cateteres maleáveis são flexíveis, adaptando-se ao contorno da cavidade uterina quando inseridos e possuem uma extremidade suave, evitando traumatismos no endométrio, pelo que são muito mais utilizados (75-77). Os cateteres maleáveis são constituídos por um cateter externo ligeiramente rígido, que atravessa o colo uterino, mantendo-se no canal cervical, e um cateter interno flexível, que entra na cavidade uterina através do externo previamente colocado (78). O ângulo de entrada do cateter pode ser ajustado de acordo com a orientação e morfologia uterinas através da utilização de um obturador, uma cânula rígida que permite moldar o cateter externo de modo a posicioná-lo corretamente no interior da cavidade uterina (79).

Idealmente, o cateter deve atravessar o colo uterino sem dificuldade, no entanto, devido a uma estenose cervical ou a um ângulo útero-cervical mais acentuado, é necessária a utilização de instrumentos específicos capazes de dilatar ou orientar o cérvix para uma posição mais favorável à passagem do cateter (80). Adicionalmente, uma vez inserido no interior da cavidade uterina, deve ser evitado ao máximo que o cateter toque o endométrio, sobretudo na região do fundo uterino, uma vez que, tal como a manipulação do cérvix, desencadeia contrações uterinas que levam à expulsão dos embriões para o exterior da cavidade uterina ou podem provocar o arrastamento dos embriões para a região das trompas, promovendo a ocorrência de uma gravidez ectópica (81, 82).

O procedimento da transferência embrionária é semelhante para embriões frescos e para embriões criopreservados, ou seja, em TEF e TEC respetivamente.

3. Implantação Embrionária

3.1 Recetividade Endometrial

A obtenção de gravidez exige que o útero seja capaz de receber o embrião de modo a permitir a sua implantação. A camada mais interna da parede uterina, o estrato funcional do endométrio, sofre modificações cíclicas, que constituem o ciclo uterino, dependentes das hormonas provenientes do ciclo ovário, que se repetem tipicamente a cada 28 dias (83).

Inicialmente, o desenvolvimento folicular que decorre nos ovários leva à libertação e ao aumento progressivo dos níveis de estrogénio que vão desencadear a multiplicação das células epiteliais, das glândulas do estroma e dos vasos sanguíneos do endométrio uterino. A proliferação celular leva ao aumento gradual da espessura endometrial até ao momento em que se dá a ovulação, designando-se esta fase de proliferativa. Durante esta fase o estrogénio também induz nas células a síntese de recetores para a progesterona. Após a ovulação, o corpo lúteo produz progesterona que provoca a secreção de glicoproteínas, açúcares e outras moléculas pelas glândulas endometriais, ocorre uma diminuição da adesão entre as células e desenvolvem-se pinópodes, estruturas protuberantes na superfície apical das células epiteliais. Este processo corresponde à fase secretora, ou fase lútea, do ciclo uterino e dura cerca de 14 dias (83, 84). Durante a fase secretora há um intervalo de tempo específico cuja recetividade endometrial se encontra no seu máximo, sendo variável entre mulheres, visto que, depende dos níveis de progesterona, no entanto, é comum ocorrer 7 dias após a ovulação, durando cerca de 36 horas. Durante esta fase, designada de “janela de implantação”, ocorre a decidualização do endométrio, ou reação decidual, em que as células do estroma endometrial adquirem uma forma arredondada e expandem devido à acumulação de maior quantidade de citoplasma, passando a chamar-se de células deciduais. Há ainda a secreção de citocinas e o recrutamento de células do sistema imunitário, especificamente células NK uterinas que produzem fatores angiogénicos que levam à alteração morfológica dos vasos sanguíneos endometriais adquirindo uma forma espiral (85-87).

A avaliação da recetividade endometrial é fundamental para garantir o sucesso de uma transferência embrionária.

A análise histológica de amostras de tecido endometrial foi, durante muito tempo,

considerada um bom indicador da recetividade endometrial porém, atualmente, é considerada imprecisa, invasiva e a sua observação para avaliação histológica é subjetiva (88, 89). Apesar de não ser utilizada em contexto clínico, o estudo de biomarcadores, nomeadamente do campo das *-ómicas* (genómica, transcriptómica, proteómica, etc.), tem-se mostrado relevante na determinação da recetividade endometrial, contudo, é dispendioso e implica a recolha de amostras de tecido endometrial, sendo também invasivo (90). Atualmente, a avaliação da recetividade endometrial é determinada pela medição ecográfica da espessura endometrial, sendo máxima no período da “janela de implantação” e pela observação do padrão trilaminar do endométrio, em que, ecograficamente, são visíveis três camadas endometriais distintas (91, 92). Embora os médicos possuam opiniões diversas, a medição do fluxo sanguíneo endometrial, através da ecografia com Doppler, também poderá permitir avaliar a recetividade endometrial uma vez que uma maior vascularização está associada ao processo de decidualização (93-95).

Na ausência de implantação, o corpo lúteo degenera, a produção de progesterona cessa e o estrato funcional do endométrio começa a descamar, entrando na fase menstrual. Durante a fase menstrual do ciclo uterino, o ciclo ovário recomeça com o recrutamento folicular e, à medida que os níveis de estrogénio aumentam, inicia-se a fase proliferativa (83, 84).

3.2 Interação Blastocisto-Endométrio

Numa concepção natural, após a fecundação, o embrião percorre a trompa de Falópio entrando na cavidade uterina em fase de mórula e, já na cavidade uterina, desenvolve-se num blastocisto. Ao expandir, o blastocisto liberta-se da zona pelúcida (ZP), correspondendo ao processo de eclosão, entre o 6º e o 7º dia de desenvolvimento (96). Após a eclosão, a hCG produzida pela trofoectoderme é reconhecida pelas células imunitárias endometriais que libertam fatores quimiotáticos capazes de induzir uma supressão da resposta imunitária que possibilita a invasão do blastocisto no endométrio (97).

O fenómeno de implantação na espécie humana caracteriza-se por três etapas fundamentais — aposição, adesão e invasão (**Figura 2**). Aposição consiste no posicionamento do blastocisto junto ao endométrio, sendo mediado pela trofoectoderme adjacente à massa celular interna uma vez que, esta se diferencia da restante, passando a designar-se de trofoectoderme polar.

A interação da trofoectoderme com o endométrio ocorre através dos pinópodes do epitélio endometrial. Tanto a trofoectoderme como o epitélio endometrial segregam moléculas que promovem a adesão do embrião ao endométrio, nomeadamente integrinas e selectinas, aumentando a capacidade de invasão da trofoectoderme. Ao aderir ao endométrio, a trofoectoderme prolifera e diferencia-se em duas populações de células — o citotrofoblasto e o sinciciotrofoblasto. O citotrofoblasto corresponde à camada interna de células que rodeia o restante do embrião e o sinciciotrofoblasto, que consiste numa massa citoplasmática multinucleada, inicia a invasão do estroma endometrial por entre as células decíduais (98-101).

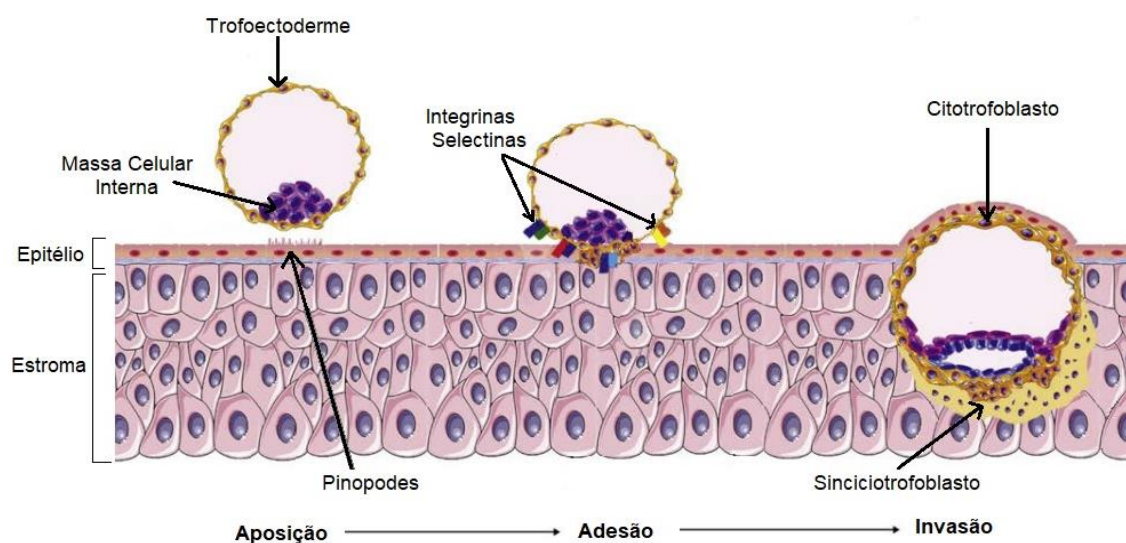


Figura 2. Processo de implantação. Aposição: dá-se o posicionamento do blastocisto junto ao endométrio, interagindo com os pinópodes epiteliais. Adesão: inicia-se o contacto entre as células da trofoectoderme e o epitélio endometrial, através de integrinas e selectinas, que permitem ao blastocisto invadir pelo estroma. Invasão: o embrião invade o estroma endometrial através do sincício. Adaptado de *Carlson, B.* (101).

Por volta do 12º dia após fertilização o embrião encontra-se totalmente imerso no endométrio e a produção de hCG torna-se mais elevada. O sinciciotrofoblasto expande e começa a envolver os vasos sanguíneos maternos iniciando a comunicação útero-placenta (101, 102).

Durante o processo de implantação, a massa celular interna diferencia-se em duas populações de células, o epiblasto e o hipoblasto, cuja região contígua, por volta do 12º dia, forma o disco embrionário, ou disco bilaminar. Simultaneamente à formação da placenta, o epiblasto origina o embrião propriamente dito e dá-se a gastrulação, seguida da organogénese (103).

Eclosão Assistida

Após o processo de criopreservação, no laboratório, a ZP pode “enrijecer” e os embriões não serem capazes de eclodir, impedindo a implantação (104). Em 1990 surgiu a eclosão assistida (EA), em que o blastocisto é eclodido no laboratório através de uma abertura artificial da ZP (105). Atualmente, a EA é realizada com recurso a um laser, sendo preciso, seguro e eficaz, e, além de ser aplicada em embriões após a sua descongelação, também é aplicada quando os embriões derivam de ovócitos que foram criopreservados (106).

3.3 Suporte Hormonal da Fase Lútea

Num tratamento de FIV ou de ICSI as elevadas concentrações de estrogénio e progesterona inerentes à estimulação ovárica e a administração de hCG influenciam o processo de decidualização no útero, provocando um desfasamento entre o período da “janela de implantação” e o desenvolvimento embrionário (107-110). É, portanto, de extrema importância a manutenção da fase lútea de acordo com o dia da transferência embrionária, sendo assegurada pela administração de progesterona a partir do dia da punção ovárica, que pode ser pela via oral, intramuscular ou vaginal, sendo que, a última é a mais utilizada e com maior eficácia e segurança no contexto da PMA (111). Dependendo dos casos clínicos pode ser administrado simultaneamente estrogénio durante a fase secretora, geralmente pela via transdérmica ou vaginal (111).

A manutenção da fase lútea para uma TEC, ou numa recetora de ovócitos doados e/ou criopreservados, é mais flexível considerando que o protocolo hormonal é focado apenas na preparação endometrial, não na estimulação ovárica (112). Existem essencialmente dois tipos de protocolos a seguir: através de um ciclo natural ou de um ciclo artificial. Nos ciclos naturais é necessária monitorização ecográfica e deteção dos níveis séricos de LH tendo em conta que é mais difícil de precisar quando ocorre a ovulação e a subsequente “janela de implantação”. Um ciclo natural é adotado unicamente nos casos em que não se verifica um fator de infertilidade feminino/ovulatório. Em alguns casos podem ser introduzidas modificações aos ciclos naturais, passando a designar-se de ciclos naturais modificados, onde é desencadeada a ovulação através da administração de hCG, permitindo determinar a ocorrência de ovulação e o período da “janela de implantação” de uma forma mais precisa. Nos ciclos artificiais é utilizada medicação hormonal de modo a controlar o ciclo uterino e, assim,

selecionar com exatidão o período mais acertado para realizar a transferência embrionária. Nestes ciclos é iniciada a administração de estrogénio quando a paciente se encontra na fase menstrual e, posteriormente, é adicionada progesterona. O tempo de exposição à progesterona nos ciclos artificiais antes da transferência é variável de caso para caso (112-115).

O suporte hormonal da fase lútea mantém-se após a transferência embrionária e a sua duração varia entre clínicos, no entanto, pode-se manter até à 12^a semana de gestação em que a manutenção da produção de progesterona passa a ser assegurada pela placenta (111).

3.4 Gravidez

Cerca de 6 a 9 dias após fertilização a hCG torna-se detetável na circulação sanguínea através da sua subunidade beta (β -hCG). No contexto da PMA, a quantificação dos níveis séricos de β -hCG é realizada cerca de 12 a 14 dias após a transferência. O valor de β -hCG para o qual se considera um resultado positivo para gravidez química é variável, dependendo do caso clínico e do número de embriões transferidos, entre outros fatores, sendo essencial a confirmação de gravidez através de ecografia (116, 117).

Na ecografia é visível um saco gestacional, que consiste na placenta e bolsa amniótica, no qual está contido um embrião, sendo detetável o seu batimento cardíaco, confirmando uma gravidez clínica (118). Em alguns casos é detetável um saco gestacional, porém, vazio, isto é, não se formou um embrião, designando-se de gravidez anembrionária, que culmina em abortamento ainda no 1º trimestre (119). Nos casos em que são transferidos dois embriões, ambos podem implantar, formando dois sacos gestacionais com um embrião cada, originando uma gravidez gemelar. Quando são transferidos dois embriões, mas só um implanta, podem formar-se dois sacos gestacionais, mas apenas um contém um embrião, ou pode formar-se um único saco gestacional com um embrião, sendo uma gravidez única em ambos os casos (118).

A ocorrência de uma gravidez ectópica, em que o blastocisto implanta num outro local que não a cavidade uterina, frequentemente nas trompas, é mais provável quando são realizadas ART. A realização da ecografia após as transferências embrionárias permite detetar precocemente a existência de uma gravidez ectópica, que pode comprometer a saúde e a vida da gestante (120).

Objetivos

Uma transferência embrionária implica a junção de diversos fatores, sendo o seu estudo de extrema importância para perceber em que medida estes influenciam a obtenção de uma gravidez. A otimização das condições de modo a garantir uma maior probabilidade de sucesso de uma transferência é indispensável uma vez que, sucessivas tentativas falhadas causam frustração e sofrimento aos pacientes.

Um dos aspetos mais relevantes a considerar no contexto das transferências embrionárias incide no tipo de transferência, TEF ou TEC, a realizar. O presente trabalho consiste num estudo retrospectivo e teve como objetivo estudar a diferença das taxas de sucesso entre TEF e TEC, numa amostra de pacientes que recorreram a tratamentos de PMA, considerando, adicionalmente, outros fatores tais como a influência da estimulação ovárica, através da comparação de ciclos considerados completos (ou tradicionais) e ciclos faseados e a influência da idade das pacientes em simultâneo com a utilização de gâmetas provenientes de doação feminina. Adicionalmente, pretende-se, através de uma análise multivariada, verificar a influência do número de embriões transferidos, 1 ou 2, e a aplicação de EA no sucesso das transferências.

Métodos

1. Processamento Laboratorial

O trabalho laboratorial desenvolvido foi realizado no Centro de Estudos de Infertilidade e Esterilidade (CEIE).

Todos os meios de cultura foram preparados no dia anterior de modo a garantir o equilíbrio da temperatura (37°C) e do pH. Tanto os meios quanto as células (gâmetas e embriões) foram mantidos em estufa a 37°C com 6% de CO₂ e 5% de O₂. Os poços de meio de cultura foram cobertos com parafina líquida para evitar evaporação, à exceção do meio usado para a transferência de embriões.

1.1 Processamento dos Gâmetas Femininos

Para a obtenção de ovócitos as pacientes e as dadoras foram submetidas à administração de gonadotrofinas exógenas, nomeadamente FSH e LH recombinantes ou menotropina purificada, e, simultaneamente, agonistas ou antagonistas do GnRH, tendo sido aplicados protocolos longos e curtos, respetivamente. O desenvolvimento folicular foi monitorizado regularmente através de ecografia transvaginal e, quando três ou mais folículos possuíam um mínimo de 17 mm de diâmetro foi administrada hCG para a maturação final dos mesmos. A punção foi realizada cerca de 34 a 36 horas após a injeção de hCG. As pacientes foram sujeitas a sedação e com recurso a uma agulha acoplada a uma sonda ecográfica os folículos foram aspirados a uma pressão negativa de 110 a 150 mmHg para tubos de poliestireno, previamente colocados em suporte aquecido a 37°C.

Após a punção os tubos foram transportados para o laboratório e o líquido folicular foi transferido para placas de Petri onde foram procurados CCO através de um estereomicroscópio e em superfície aquecida a 37°C (**Figura 3**). Os CCO foram lavados em 500 µL de meio tamponado de modo a remover resíduos do líquido folicular e avaliados quanto à sua maturidade. Quando maduros, os CCO possuem uma *corona radiata* dispersa e as células do *cumulus* expandidas, no entanto, quando imaturos, os CCO apresentam um aspeto mais condensado, com as células do *cumulus* mais compactas. Apesar do aspeto do *cumulus* auxiliar na avaliação da maturidade ovocitária, nem sempre traduz a maturidade nuclear (121, 122).

Os CCO foram transferidos para placas contendo meio de cultura e incubados na estufa.



Figura 3. Pesquisa de CCO após a punção ovárica: placa de Petri contendo o líquido folicular, sob estereomicroscópio (seta amarela) e placa de meio tamponado para lavagem dos CCO (seta azul). Fonte: Laboratório de PMA do CEIE.

Desnudação de Ovócitos

Os CCO permaneceram na estufa por um período mínimo de 3 horas antes da desnudação. Foi preparada uma placa de desnudação — 80 μ L de enzima hialuronidase (que desagrega as células do *cumulus oophuros*) e 500 μ L de meio tamponado — e foi mantida numa estufa a 37°C entre 30 e 60 minutos para equilibrar.

Os ovócitos foram, então, colocados na enzima por um período de 15 a 20 segundos e repetidamente aspirados com a pipeta de modo a facilitar a ação enzimática sobre as células. De seguida foi realizada uma remoção mecânica das células através de sucessivas passagens no meio tamponado pelos restantes poços da placa até à remoção total das células e eliminação dos resíduos de enzima.

Após a desnudação os ovócitos foram observados no microscópio ótico invertido de modo a avaliar a sua maturidade nuclear: um ovócito maduro caracteriza-se pela presença do primeiro glóbulo polar (1GP) no espaço perivitelino, indicando que este se encontra em Metáfase II (MII) (**Figura 4a**). Ovócitos imaturos não possuem o 1GP, podendo estar em Metáfase I (MI) (**Figura 4b**), ou, caso apresentem uma vesícula germinativa, em Prófase I (**Figura 4c**) (121, 122).

A avaliação da qualidade ovocitária foi igualmente importante uma vez que, uma baixa qualidade ovocitária está associada a ausência de fecundação e má qualidade embrionária. Idealmente um ovócito deve ser esférico, com uma ZP regular e citoplasma homogéneo (121). Quando o GP se encontra fragmentado, ou o espaço perivitelino aumentado ou a ZP é mais espessa os ovócitos consideram-se de menor qualidade.

Também o citoplasma pode apresentar alterações que indicam baixa qualidade ovocitária, tais como variações da sua textura ou a presença de irregularidades, como vacúolos ou granulosidades de grandes dimensões (121, 123). Após a desnudação os ovócitos foram incubados em meio de cultura.

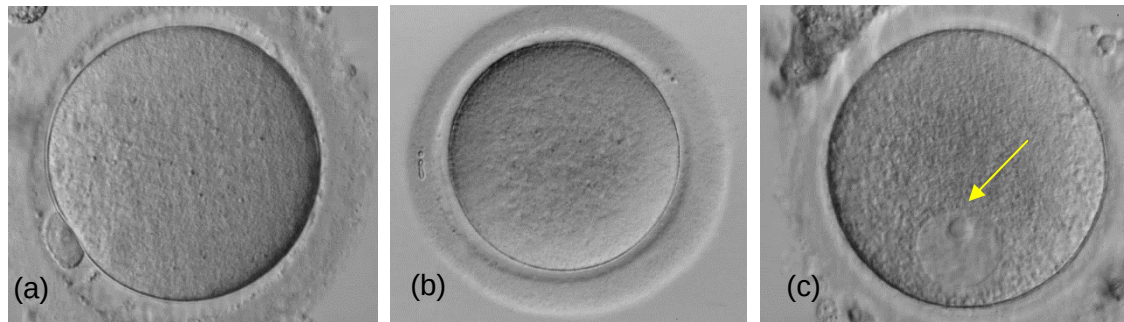


Figura 4. Maturidade nuclear ovocitária (a) Ovócito em MII, com GP posicionado às 8h; (b) Ovócito imaturo em MI, GP ausente; (c) Ovócito imaturo, sem GP e com vesícula germinativa (seta amarela). [Ampliação 400x]. Adaptado de *Atlas of Human Embryology, ESHRE* (124).

Quando utilizados ovócitos vitrificados, nomeadamente em alguns casos de recurso a doação feminina e de preservação da fertilidade, estes foram descongelados utilizando os protocolos do fabricante de meios da KITAZATO® (125). Uma vez que estes ovócitos já se encontram desnudados, após a descongelação foram incubados em meio de cultura até à realização da ICSI.

1.2 Processamento dos Gâmetas Masculinos

O processamento dos gâmetas masculinos foi realizado no laboratório de andrologia e em câmara de fluxo laminar.

As amostras obtidas a fresco permaneceram cerca de 30 minutos numa estufa a 37°C para liquefação após a colheita. As amostras foram tratadas com gradientes de densidade descontínuos de partículas de sílica em tubos de fundo cónico de modo a separar os espermatozoides imóveis e células não espermáticas dos espermatozoides viáveis. Os gradientes foram diluídos em meio de cultura para uma concentração final de 80%(v/v) e 40%(v/v) e volume final de 1 mL. Nos casos de oligozoospermia ou astenozoospermia severas o volume final de cada gradiente foi ajustado para valores inferiores a 1 mL. O gradiente de 80% foi colocado sob o de 40% e as amostras seminais depositadas sobre este último. A centrifugação das amostras foi realizada em centrífuga aquecida a 35°C. Após uma centrifugação de 1000 rotações por minuto (rpm) durante

25 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* resultante, onde se encontram os espermatozoides, foi ressuspendido em 2 mL de meio de cultura num tubo limpo. Após uma nova centrifugação a 1000 rpm durante 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e, sem perturbar o sedimento, foi adicionado meio de cultura, cuja quantidade (200 a 500 µL) variou em função do tamanho do *pellet*. Os tubos contendo as amostras processadas foram mantidos à temperatura ambiente e em posição inclinada a ~45°, permitindo a deslocação dos espermatozoides até à superfície, processo conhecido como *swim-up*.

As amostras congeladas, nomeadamente as de doação masculina e nos casos de preservação da fertilidade masculina, foram tratadas com gradientes previamente à sua congelação, pelo que o seu processamento após a descongelação inclui apenas lavagens. As palhetas contendo as amostras foram retiradas do azoto líquido e imediatamente colocadas em água aquecida e numa estufa a 37°C. Após um período mínimo de 10 minutos as amostras encontravam-se totalmente descongeladas. Antes da sua abertura as palhetas foram limpas com uma compressa para retirar qualquer resíduo de água. As suas extremidades foram cortadas e as amostras seminais foram transferidas para tubos de fundo cónico. Foi adicionado 1 mL de meio de cultura (gota-a-gota e com agitação leve para evitar choque osmótico) e retirou-se uma alíquota de 10 µL para uma lâmina de modo a observar a concentração e recuperação dos espermatozoides. Foi adicionado mais 1 mL de meio de cultura do mesmo modo. Nos casos em que a concentração e/ou a recuperação dos espermatozoides foi muito baixa, foram descongeladas adicionalmente uma ou mais palhetas, se existentes. As amostras foram centrifugadas por 12 minutos a 1000 rpm e o sobrenadante descartado. Sem perturbar o sedimento foram adicionados cerca de 300 µL de meio de cultura para *swim-up*.

Todas as amostras, a fresco ou de congelação, permaneceram em *swim-up* por um período mínimo de 30 minutos antes dos tratamentos.

Nos casos em que foram realizadas biópsias testiculares que revelaram a presença de espermatozoides estes foram congelados e, no dia do tratamento, descongelados. Após a descongelação, as amostras foram lavadas e foi pesquisada a presença de espermatozoides móveis para realizar uma ICSI.

1.3 Protocolo de FIV

As FIV foram realizadas após uma incubação mínima de 3 horas dos CCO, sendo distribuídos, no máximo, 5 ovócitos por poço. Foi colocada uma alíquota de 10 µL de amostra seminal numa câmara de contagem de *Neubauer* e contados os espermatozoides móveis progressivos em 5 quadrados centrais de modo a determinar o volume de amostra seminal a colocar em cada poço para uma concentração final de 100 000 espz/mL. Para tal, foi usada a fórmula simplificada: $V_{\text{amostra}} = \frac{1}{N} \times 1000$ onde V é o volume a inseminar por poço e N o número de espermatozoides móveis progressivos contados. Após a colocação dos espermatozoides em conjunto com os ovócitos, a placa de cultura foi observada ao microscópio ótico invertido e incubada ON na estufa.

Após a FIV foi preparada uma placa com meio de cultura e guardada na estufa de modo a equilibrar, para no dia seguinte se proceder à desnudação e lavagem dos ovócitos fecundados. Foi também preparada uma placa de *time-lapse* com meio de cultura específico para cultura embrionária e guardada no equipamento de *time-lapse* até colocação dos embriões no dia seguinte.

1.4 Protocolo de ICSI

Antes da ICSI foi preparada uma placa de microinjeção: do lado esquerdo da placa foram colocadas duas colunas de 10 µL de meio contendo polivinilpirrolidona (PVP), um meio viscoso que atrasa o movimento dos espermatozoides permitindo que sejam captados para a microinjeção, e do lado direito foram colocadas gotas de 5 µL de meio tamponado de acordo com o número de ovócitos a microinjetar. A placa foi coberta com cerca de 4 mL de parafina líquida e incubada numa estufa a 37°C por um mínimo de 15 minutos e um máximo de 1 hora para equilibrar até à microinjeção.

Nos casos de oligozoospermia ou astenozoospermia severas, e nos casos de espermatozoides obtidos por biópsia testicular, o meio PVP foi substituído por meio de cultura para auxiliar a distinção entre espermatozoides progressivos, móveis *in situ* e imóveis. Quando os espermatozoides não demonstravam motilidade, sobretudo nos de biópsia testicular, foi realizado um teste de hipoosmolaridade. O teste de hipoosmolaridade consiste na incubação dos espermatozoides em solução hipoosmótica, causando a turgescência dos que estão vivos, que se manifesta pelo enrolamento das caudas, enquanto que, os espermatozoides mortos vão permanecer com a cauda alongada (126, 127).

Para a microinjeção foi colocada uma alíquota de 300 a 500 μL de amostra seminal na primeira coluna de PVP e os ovócitos nas gotas de meio tamponado. No microscópio invertido foi selecionado um espermatozoide da primeira gota de PVP com a micropipeta de ICSI e transferido para a segunda gota, onde lhe foi quebrada a cauda de forma a imobilizá-lo para não danificar o ovócito, e foi reaspirado. Na gota de meio tamponado o ovócito foi posicionado de modo que o GP permanecesse numa posição perpendicular à direção de microinjeção (6 ou 12 horas) e foi fixado com a *holding* (**Figura 5a**). A membrana citoplasmática foi focada e, com o espermatozoide já na extremidade da pipeta de ICSI, esta foi introduzida no interior do ovócito. Uma vez no interior do ovócito, foi aspirado um pouco de citoplasma e depois rejeitado juntamente com o espermatozoide (**Figura 5b**). A aspiração de citoplasma do ovócito está comprovada auxiliar a ativação do mesmo e, portanto, promover a fecundação (128, 129). Ao retirar a micropipeta de ICSI, a membrana citoplasmática pode manter uma abertura em forma de cone devido à rotura provocada pela entrada da micropipeta, por onde o espermatozoide pode sair, pelo que se confirmou que este se manteve no interior do ovócito (**Figura 5c**).

Após a ICSI, os ovócitos microinjetados foram colocados, individualmente, em poços de uma placa de *time-lapse*, que foi incubada no equipamento GERI, uma incubadora de embriões com sistema *time-lapse* incorporado.

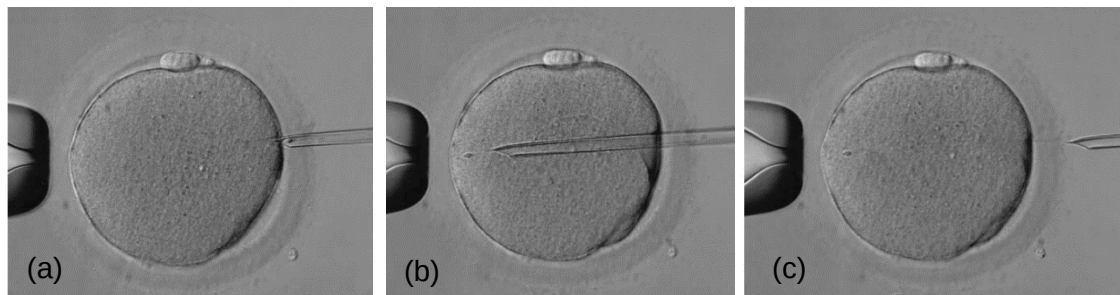


Figura 5. Procedimento de microinjeção: (a) O ovócito é imobilizado com o GP posicionado às 12 horas e o espermatozoide é mantido na extremidade da pipeta; (b) Após a entrada do espermatozoide, é aspirado e rejeitado citoplasma no interior do ovócito, onde o espermatozoide é depositado; (c) Ao retirar a pipeta do ovócito deve ser garantido que o espermatozoide se mantenha no seu interior. [Ampliação 400x] Adaptado de Neri *et al.* (54).

1.5 Desenvolvimento Embrionário

A confirmação de fecundação foi realizada cerca de 16 a 18 horas após a técnica de inseminação. Na FIV foi necessário desnudar os ovócitos para avaliação da fecundação. Para tal os ovócitos foram transferidos da placa de FIV para uma nova

placa de cultura de embriões (preparada no dia anterior) e cuidadosamente aspirados e rejeitados para remoção dos resíduos de espermatozoides e células do *cumulus*. Uma vez desnudados foi possível verificar a ocorrência de fecundação através da visualização de 2PN e/ou 2GP. Os ovócitos fecundados, ou zigotos, foram transferidos para a placa de *time-lapse* e mantidos no equipamento GERI. Na ICSI a confirmação de fecundação foi realizada também pela observação de 2PN e/ou 2GP através do sistema de *time-lapse*.

A avaliação do desenvolvimento embrionário foi realizada com recurso ao sistema *time-lapse* onde foi atribuída uma classificação a cada embrião. Os embriões foram observados e classificados de acordo com os critérios estabelecidos pelo *consensus* de Istambul (Introdução - 2.3).

1.6 Vitrificação e *Warming* de Embriões

Os embriões foram vitrificados sempre ao 5º dia de desenvolvimento e descongelados no dia da TEC. Tanto a vitrificação como o *warming* de embriões foram realizados de acordo com os protocolos do fabricante de meios da KITAZATO® (125).

1.7 Transferência Embrionária

Foram preparadas placas com 500 µL de meio de cultura embrionária, para lavagem do cateter de transferência, e com 350 µL de meio de transferência *EmbryoGlue*®. As placas de transferência foram mantidas na estufa para equilibrar.

Para as TEC, os embriões foram descongelados cerca de 3 horas antes do procedimento e foram colocados em meio de cultura. Imediatamente após a descongelação foi realizada EA com recurso a um laser e em microscópio invertido. Embora a criopreservação seja o fator determinante para a utilização de EA, alguns embriões para TEC não foram submetidos a EA, sobretudo quando a ZP se encontrava mais fragilizada.

Cerca de 15 minutos antes da transferência os embriões foram transferidos do meio de cultura para o meio de transferência e recolocados na estufa. Para embriões a fresco, a EA foi realizada logo após os embriões terem sido colocados no meio de transferência.

Foram transferidos um, dois, e em casos muito particulares, três embriões, quer para TEF quer para TEC. Não foram realizadas transferências com embriões frescos e

criopreservados simultaneamente.

Foram utilizados os cateteres maleáveis da *Cook®* e da *CooperSurgical®*, que possuem marcas nas suas extremidades para que sejam visualizados em ecografia durante a transferência (**Figura 6**) (130). Os cateteres foram mantidos na estufa até ao momento da transferência.

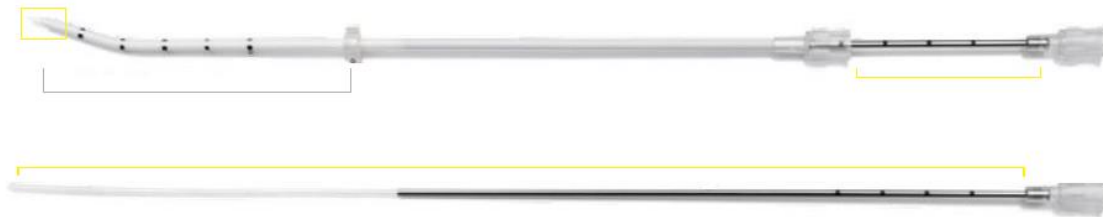


Figura 6. Exemplo de cateter utilizado nas transferências embrionárias. Acima, o cateter externo, no qual está inserido o interno (linha amarela). A extremidade à esquerda (linha cinzenta) corresponde à porção que permanece no interior da cavidade uterina, contendo cinco marcas visíveis em ecografia. Abaixo, o cateter interno, possui um comprimento de 23 cm e uma região suave e flexível (à esquerda). Fonte: *CooperSurgical®* (131).

Inicialmente, foi realizada a remoção do muco cervical visto que, o muco cervical pode obstruir a extremidade do cateter e causar retenção dos embriões, ou, caso seja arrastado para o interior do útero, torna-se fonte de contaminação bacteriana (132). De seguida, foi colocado o cateter externo. Em algumas pacientes, devido à presença de uma estenose cervical ou de um ângulo útero-cervical mais acentuado, foi necessário recorrer ao obturador para um melhor posicionamento do cateter. No laboratório, o cateter interno foi acoplado a uma seringa, lavado com meio de cultura e, carregado com o(s) embrião(iões) a transferir. Existem diversos métodos de carregamento do cateter de transferência (133-136), contudo, o método utilizado para todas as transferências foi semelhante: os embriões foram aspirados numa coluna contínua juntamente com meio de transferência num volume total de cerca de 30 µL. Após a aspiração dos embriões, o cateter interno foi, o mais rapidamente possível, levado para o consultório e inserido na cavidade uterina através do cateter externo. A transferência foi realizada com recurso a ecografia abdominal, que permite visualizar a extremidade do cateter através das suas marcas. Uma vez no interior da cavidade uterina, os embriões foram expulsos e a pressão no êmbolo da seringa foi mantida durante uns instantes para evitar uma re-aspiração dos embriões para o interior do cateter. Após a transferência o cateter foi suavemente retirado e, no laboratório, foi lavado novamente de modo a confirmar se os embriões foram transferidos ou se ficaram retidos no seu

interior. Quando os embriões não foram expulsos, o procedimento foi realizado novamente até ser bem-sucedido.

Em alguns casos, o acesso e/ou passagem pelo colo uterino exigiu o auxílio de um tenáculo ou fórceps, designado de pinça de *Pozzi*, cujas extremidades afiadas em forma de gancho seguram o colo uterino e permitem endireitá-lo de acordo com o canal vaginal e com o útero. A utilização de *Pozzi* foi restringida aos casos mais complicados uma vez que a manipulação do cérvix, além de dolorosa, desencadeia contrações uterinas que podem levar à expulsão dos embriões após a transferência.

As transferências foram classificadas como — Muito Fácil, Fácil, Difícil, Muito Difícil — de acordo com a dificuldade em atravessar o colo uterino. Os casos em que a transferência exigiu a utilização de *Pozzi* foram classificados como Dífíceis ou Muito Dífíceis. As transferências também foram mais dífíceis nos casos em que as pacientes não possuíam a bexiga cheia, tendo sido classificadas como Dífíceis.

1.8 Acompanhamento após Transferência

Ao 12º dia após a transferência embrionária foi realizado o doseamento da β -hCG: valores superiores a 39,1 UI/L foram considerados como positivo para gravidez química. A confirmação de gravidez foi feita através da realização de ecografia abdominal 15 dias após a análise da β -hCG, ou seja, cerca de 3 semanas após a transferência embrionária.

Os casos cuja gravidez química não resultou em gravidez clínica, ou seja, na ecografia não foi observado nenhum embrião, foram registados como positivos para gravidez química e negativos para a clínica. As gravidezes que não culminaram em partos, ou seja, os abortamentos, ocorreram sempre no 1º trimestre da gestação.

O suporte hormonal da fase lútea foi mantido até à realização da primeira ecografia.

2. Processamento Estatístico

2.1 Seleção da Amostra

Todos os dados no presente trabalho foram obtidos do CEIE. Para responder ao objetivo proposto foram recolhidos os dados de pacientes que recorreram aos serviços de PMA do CEIE para os quais a última transferência se realizou no ano de 2019 ou 2020, tendo sido registadas todas as transferências anteriores realizadas por esses mesmos pacientes. Foram incluídos os casos de casais heterossexuais inférteis e de mulheres pelo regime *single*, não tendo sido incluídos os casos de casais de mulheres que realizaram ciclos de maternidade partilhada (ou ROPA do inglês *Reception of Oocytes from the Partner*), nem casos onde foi realizada DGPI.

Os dados foram registados no software Microsoft Excel®. Para cada paciente foi atribuído um número de identificação único e cada transferência foi considerada como uma tentativa para cada ciclo. Cada linha da folha de cálculo de Excel® representou um embrião transferido e, portanto, as transferências foram agrupadas por uma, duas, ou três linhas de acordo com o número de embriões transferidos.

2.2 Estatística das Taxas de Sucesso

O tratamento e análise dos dados obtidos, assim como os gráficos e tabelas apresentados, foi realizado no software R Studio.

Foi considerado como sucesso a ocorrência de gravidez química, gravidez clínica e nascimento. A taxa de sucesso foi dada pela proporção de casos positivos para cada um dos três parâmetros relativamente ao total de transferências do tipo TEF ou TEC realizadas. Foram analisados os tuplos <Paciente, Ciclo, Tentativa> descritos segundo o tipo de transferência, recurso a doação de ovócitos, idade das pacientes, que se subdivide na idade dos ovócitos que originaram os embriões e a idade das pacientes que realizaram a transferência, a transferência de 1 ou 2 embriões, e a utilização ou não de EA.

Uma vez que a amostra contém pacientes que realizaram apenas TEF, apenas TEC ou ambas, a comparação do sucesso entre TEF e TEC foi realizada com recurso a três abordagens distintas: separando os ciclos só de TEF e só de TEC, sendo uma amostra independente, cuja análise foi efetuada pelo teste de independência do

qui-quadrado de *Pearson* χ^2_1 ; os ciclos onde foi realizada uma TEF seguida de uma ou mais TEC, sendo a amostra dependente e para a qual se realizou o teste de *McNemar*; e, por fim, para minimizar a perda de informação, foi analisado o conjunto total de dados, ou seja, foram analisadas todas as transferências, combinando os dois tipos de amostras, sendo uma amostra parcialmente sobreposta. Uma amostra parcialmente sobreposta é mais inclusiva, tendo em conta que mantém as relações dos pacientes que realizaram ambos os tipos de transferência, assim como os pacientes que realizaram apenas um tipo. Para a comparação das taxas de sucesso da última abordagem, que combina os valores-p de amostras independentes e dependentes, foram usados dois testes distintos: o de *Stouffer*, que, apesar de ser o mais utilizado, a sua interpretação é complexa, e um teste proposto por *Digby*, que utiliza o coeficiente de associação ϕ , equivalente ao coeficiente de correlação de *Pearson* χ^2_1 , quando aplicado a uma variável binária (137). Este último, devido à sua simplicidade e propriedades matemáticas, é mais facilmente interpretado e permite, ainda, a construção de intervalos de confiança (138).

As análises estatísticas foram realizadas através de contagens pelo que, todas as variáveis analisadas são consideradas categóricas. Para testar a influência da idade das pacientes foi analisada a “Idade Uterina”, ou seja, a idade da paciente que realiza a transferência embrionária. Para comparar a taxa de sucesso nos casos de doação de ovócitos, foi comparada a variável “Idade Ovocitária”. Foram considerados como doação de ovócitos os casos que recorreram à doação feminina e à dupla doação. A comparação das taxas de sucesso para amostras independentes foi realizada através do teste χ^2_1 e para amostras dependentes através do teste de *McNemar*. Para todas as análises considerou-se como hipótese nula a probabilidade de sucesso da TEF ser igual ou superior à da TEC, $H_0: p_{TEF} \geq p_{TEC}$, com um intervalo de confiança de 95%, ou seja, foram considerados estatisticamente significativos valores-p inferiores a 0.05.

2.3 Frequent Pattern Mining

De modo a perceber a influência de vários fatores em simultâneo no sucesso de uma transferência, foi realizado um *Frequent Pattern Mining*.

Em Ciência de Dados, este processo permite descobrir padrões a partir de um vasto conjunto de dados e encontrar relações entre os diversos atributos. As regras de associação são apresentadas sob a forma da regra Se->Então, onde os antecedentes e consequentes são determinados e ordenados segundo o suporte e confiança no

conjunto de dados. Estas estatísticas são calculadas através da frequência e probabilidade condicionada do antecedente e consequente das regras (139).

Nas equações apresentadas, $S(X)$ representa o suporte de X , D representa o número de transferências, $S(X \rightarrow Y)$ e $C(X \rightarrow Y)$ representam o suporte e confiança da regra com antecedente X e consequente Y , respetivamente. Desta forma, percebe-se que o suporte está ligado à percentagem da regra, ou conjunto, nos dados; que a confiança reflete a ocorrência do antecedente quando o consequente também ocorre nas transferências.

$$S(X) = \frac{Freq(X)}{D} \qquad S(X \rightarrow Y) = \frac{S(X \cup Y)}{D} \qquad C(X \rightarrow Y) = P(X|Y) = \frac{S(X \cap Y)}{S(Y)}$$

Para esta análise, foi aplicado o algoritmo FP-Growth, cujas regras foram ordenadas segundo a sua importância, usando uma confiança mínima de 60%. Este algoritmo interpreta cada transferência como uma transação, onde os atributos estão representados por valores booleanos, Verdadeiro e Falso, segundo as características envolvidas no tratamento. Assim, considerando os ciclos independentes, cada coluna será expandida nos seus possíveis valores e cada transação ficará representada por um valor booleano consoante a ocorrência dessa característica na transferência.

Para esta análise o parâmetro de sucesso considerado foi apenas o nascimento, e as variáveis consideradas: o tipo de transferência (TEF *versus* TEC), aplicação de EA, a dificuldade de transferência, as idades uterinas e ovocitárias, o número de embriões transferidos e doação feminina.

Resultados e Discussão

1. Descrição da Amostra

Foram registadas 737 transferências embrionárias, as quais 406 correspondem a TEF e 331 correspondem a TEC, pertencentes a 319 pacientes. O número (n) de TEF e de TEC de acordo com as suas características encontra-se discriminado na **Tabela 2**.

Tabela 2. Descrição da amostra: frequência absoluta de TEF e de TEC de acordo com a idade das pacientes (uterina e ovocitária), recurso a doação de ovócitos, número de embriões transferidos, utilização de EA e dificuldade de transferência.

		TEF	TEC
Idade Uterina	-35	77	63
	[35-39]	123	82
	[40-44]	160	125
	+45	46	61
Idade Ovocitária	-35	206	227
Doação Feminina	Não	276	157
	Sim	130	174
Número de Embriões Transferidos	1	95	111
	2	309	219
	3	2	1
EA	Sim	112	233
	Não	295	97
Dificuldade de Transferência	Muito Fácil	259	201
	Fácil	97	81
	Difícil	33	31
	Muito Difícil	17	18

Tendo em conta a semelhança da idade ovocitária com a uterina em casos de não-doação, apenas estão registadas as idades ovocitárias abaixo dos 35 anos para distinguir os casos de doação feminina.

Apesar de haver 3 transferências em que foram transferidos 3 embriões, para o *Frequent Pattern Mining* estes casos foram retirados uma vez que, nesta análise foi incluído o número de embriões como variável. Devido ao elevado número de casos de transferências consideradas Muito Fácil, este parâmetro também não foi avaliado.

2. Análise das Taxas de Sucesso

2.1 Taxas de Sucesso Globais

Foi calculado o sucesso global da amostra, sendo que, do total de transferências, 36% foram positivas para gravidez química, e, do total de gravidezes químicas obtidas, 86,5% confirmaram-se positivas para gravidez clínica e destas, 74% resultaram em nascimento. Considerando, portanto, o total da amostra (**Gráfico 1**), a percentagem de sucesso para os três parâmetros, gravidez química, clínica e nascimento, foi de 36%, 31% e 23%, respetivamente.

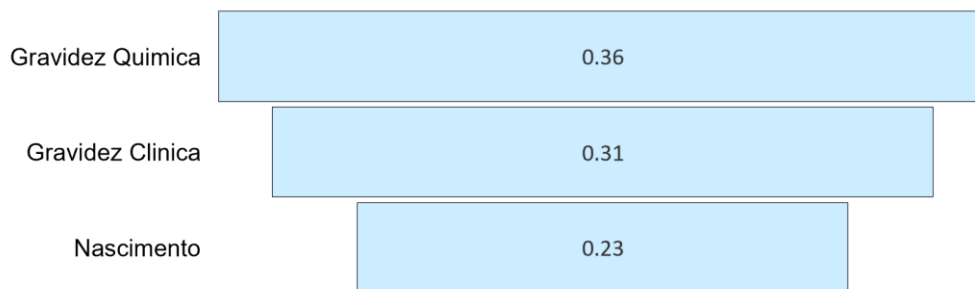


Gráfico 1. Taxas de sucesso globais, do total da amostra, para gravidez química, gravidez clínica e nascimento.

2.2 TEF *versus* TEC

Foi calculada e comparada a taxa de sucesso de todas as TEF e todas as TEC (**Gráfico 2**). Verifica-se, pela observação do gráfico, que as TEC possuem uma taxa de sucesso mais elevada que as TEF para os três parâmetros de sucesso. Para determinar se as diferenças observadas são consideradas estatisticamente significativas foram comparadas as taxas de sucesso para amostras independentes, dependentes e ambas.

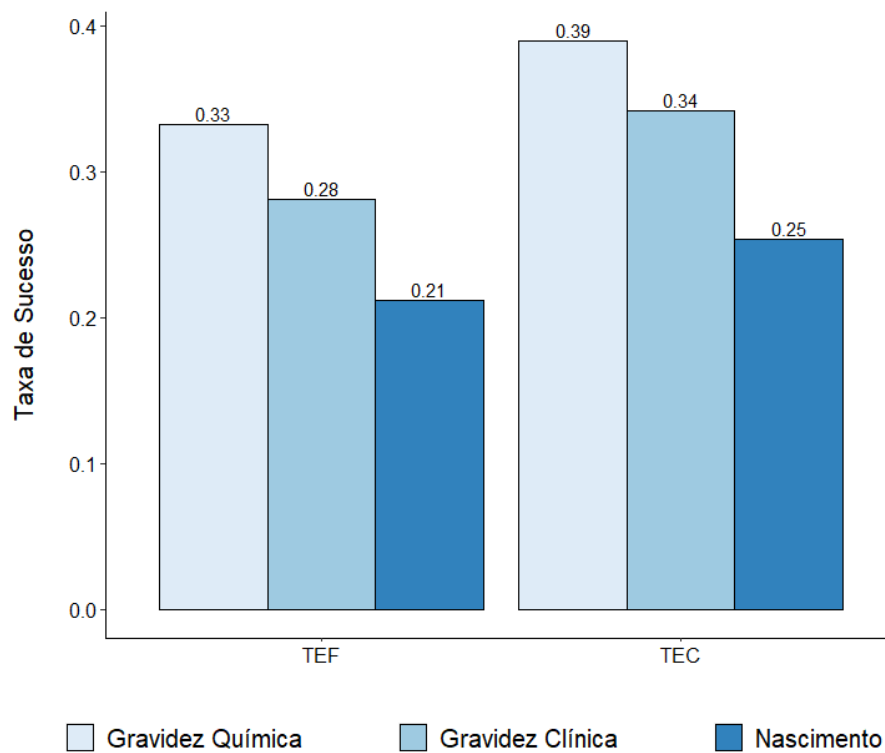


Gráfico 2. Taxas de sucesso para gravidez química, gravidez clínica e nascimento entre TEF e TEC.

Amostra Independente

Na **Tabela 3** encontram-se esquematizados o número de casos positivos e negativos de gravidez química, clínica e nascimento após realização de transferências TEF e TEC.

Tabela 3. Tabela de contingência dos casos positivos e negativos para os três parâmetros de sucesso após TEF e TEC enquanto amostras independentes. Valores-p estatisticamente significativos estão destacados.

		+	-	z	p
Gravidiz Química	TEF	91	199	-3.3093	0.000468
	TEC	88	102		
Gravidiz Clínica	TEF	86	204	-2.4595	0.00696
	TEC	77	113		
Nascimento	TEF	58	132	-1.5478	0.0608
	TEC	70	220		

Foi calculado o valor da distribuição correspondente à distribuição representada por χ^2_1 . Assim, supondo a hipótese nula, esta distribuição segue, assintoticamente, uma normal, $N(0,1)$. Considerando $H_0: p_{TEF} \geq p_{TEC}$, para uma significância de 5%, tanto na gravidez química como na clínica, mas não o nascimento, apresentam um valor-p inferior a 0.05 e, desta forma, existem evidências que permitem rejeitar a hipótese nula de que a taxa de sucesso das transferências TEF é superior às TEC.

Amostra Dependente

Para avaliar a influência de uma TEC após TEF, consideraram-se os ciclos em que foi realizada uma TEF seguida de uma, ou mais, TEC. Tendo em conta a dependência das observações na amostra, realizou-se o teste de *McNemar*, cujos valores estão representados **Tabela 4**, em que a hipótese nula testa a existência de alterações significativas na ocorrência de gravidez recorrendo a transferências TEC após TEF.

Tabela 4. Tabela de contingência com os valores utilizados para o teste de *McNemar* para amostras dependentes. Para cada parâmetro de sucesso a célula do canto superior esquerdo indica o número de casos cujo resultado foi positivo tanto na TEF como na TEC (++); na célula do canto superior direito encontra-se o número de casos positivos na transferência TEF, mas não na TEC (+-); na célula do canto inferior esquerdo encontram-se os casos negativos de TEF e positivos após TEC (-+); a célula do canto inferior direito corresponde aos casos negativos para ambas TEF e TEC.

		TEC		<i>McNemar</i>	<i>p</i>
		+	-		
Gravidez Química	TEF	+	17	0.73469	0.3914
		-	21		
Gravidez Clínica	TEF	+	9	0.56818	0.451
		-	25		
Nascimento	TEF	+	3	1.8286	0.1763
		-	22		

Verifica-se que nenhum dos valores-p é inferior ao valor de significância de 5% e, portanto, a hipótese nula não pode ser rejeitada, não existindo diferenças significativas entre TEF e TEC. No entanto, uma vez que os valores da tabela mostram uma redução significativa no tamanho da amostra face ao cenário anterior (amostras independentes) este teste poderá apresentar um poder estatístico baixo devido ao reduzido número de casos (138).

Amostras Independentes e Dependentes

A junção das amostras independentes e dependentes é mais inclusiva uma vez que, mantém as relações dos pacientes que realizaram TEC após TEF, assim como os pacientes que apenas realizaram um dos tipos de transferências.

A **Tabela 5** contém os pesos, ω , e valores de teste, r , usados na combinação dos tipos de amostras, aplicando uma correção à continuidade, também aplicada no teste de *McNemar*, quando o número de pares discordantes é baixo. Nesta amostra, que contempla todos os casos disponíveis, z_1 e z_2 representam as estatísticas dos testes, *Stouffer* e o proposto por *Digby*, respetivamente. Os cálculos intermédios utilizados para ambos os testes encontram-se discriminados na **Tabela Anexo 1**.

Tabela 5. Valores utilizados na aplicação dos testes de *Stouffer* (Z_1) e proposto por *Digby* (Z_2) e respetivos valores-p, p_1 e p_2 . ω representa os pesos e r os valores de teste usados para a combinação das amostras para ambos os testes. Valores-p estatisticamente significativos estão destacados.

	ω	r	z_1	p_1	z_2	p_2
Gravidez Química	0.7960	0.1132	-1.7975	0.0361	-2.5530	0.0053
Gravidez Clínica	0.7987	0.0494	-1.3908	0.0821	-4.2174	1.24×10^{-5}
Nascimento	0.8013	-0.0219	-0.7763	0.2187	-8.3204	4.38×10^{-17}

No primeiro teste (z_1) apenas a gravidez química apresenta um valor-p inferior a 0.05 e, por isso, é o único caso onde foi possível observar diferenças significativas entre TEF e TEC. No entanto, para a mesma significância, o segundo teste (z_2) aponta diferenças significativas entre as duas transferências para qualquer resultado. Considerando a hipótese nula $H_0: p_{TEF} \geq p_{TEC}$, a estatística de teste (z_2) negativa apresenta uma probabilidade bastante inferior a 5% e, por isso, existem evidências de que as transferências TEC apresentam taxas de sucesso superior às transferências TEF, rejeitando a hipótese nula.

2.3 Ciclo Completo *versus* Faseado

Uma das principais diferenças entre as TEF e as TEC reside no tipo de protocolo aplicado, na medida em que, as TEC não necessitam de estimulação ovárica, sendo o ciclo faseado. O mesmo ocorre para os casos em que são utilizados ovócitos de dadora e ovócitos criopreservados. Considerando o total de transferências, observou-se que, para ciclos completos, a taxa de sucesso é mais baixa para os três parâmetros de sucesso (**Gráfico 3**).

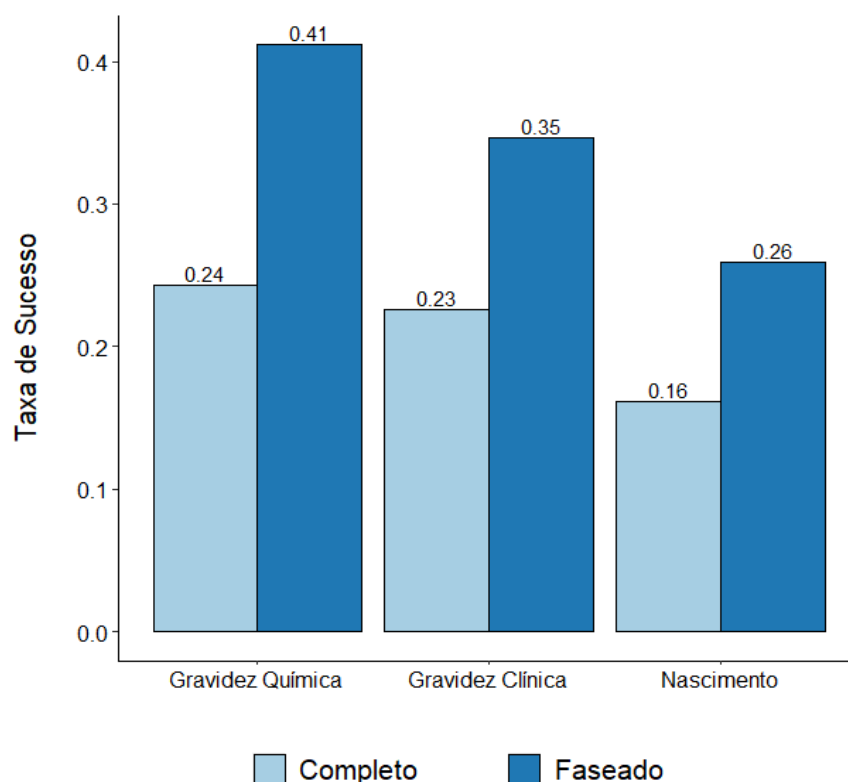


Gráfico 3. Taxas de Sucesso para gravidez química, gravidez clínica e nascimento entre ciclos completos (TEF) e ciclos faseados (TEC, TEF proveniente de ovócitos criopreservados, TEF proveniente de doação de ovócitos).

Para determinar se as diferenças observadas são estatisticamente significativas, foram comparadas as taxas de sucesso entre TEF com e sem doação de ovócitos, e cada uma das situações com as TEC. Devido ao reduzido número de casos em que se utilizaram ovócitos criopreservados, não foi possível realizar um teste de hipóteses para comparar os casos em que foram utilizados.

TEF sem Doação de Ovócitos *versus* TEF com Doação de Ovócitos

Como os ciclos das TEF com e sem doação provêm de observações distintas, a amostra é do tipo independente, pelo que se recorreu ao teste usado nas amostras independentes da primeira análise (χ^2_1).

Tendo em conta $H_0: p_{sem\ doação} \geq p_{com\ doação}$, os valores-p apresentados na **Tabela 6** são todos muito inferiores a 0.05, ou seja, encontramos evidências significativas que nos permitem rejeitar a hipótese nula de que as transferências TEF sem doação apresentam, para os três parâmetros, uma taxa de sucesso superior ou igual ao mesmo tipo de transferência com doação feminina.

Tabela 6. Tabela de contingência utilizada para a comparação das taxas de sucesso entre TEF sem recurso a doação de ovócitos e TEF com recurso a doação de ovócitos. Valores-p estatisticamente significativos estão destacados.

		+	-	z	p
Gravidez Química	S/Doação	50	162	-4.7158	1.2×10^{-6}
	C/Doação	41	37		
Gravidez Clínica	S/Doação	48	164	-4.3112	8.1×10^{-6}
	C/Doação	38	40		
Nascimento	S/Doação	36	176	-4.6954	1.3×10^{-6}
	C/Doação	34	44		

TEF com e sem Doação de Ovócitos *versus* TEC

Dado o número insuficiente de casos para ciclos de TEC após TEF, ou seja, amostras dependentes, neste caso focou-se apenas nos ciclos onde foi realizada apenas um tipo de transferência, ou seja, amostras independentes, estando representados os valores usados no teste (χ^2_1) na **Tabela 7**. Verifica-se que, entre TEF sem doação e TEC, os valores-p são bastante abaixo de 0.05, não encontrando diferenças significativas que nos permitem rejeitar a hipótese nula em detrimento da alternativa que supõe que a taxa de sucesso das TEC apresenta valores superiores às das TEF sem doação feminina. Quando comparada a taxa de sucesso entre TEF com doação e TEC, verificou-se que, os valores-p apresentam probabilidades bastante superiores a 5% e, portanto, não encontramos evidências estatísticas significativas de que as taxas de sucesso entre TEF com doação de ovócitos sejam diferentes das TEC.

Tabela 7. Tabela de contingência utilizada para a comparação das taxas de sucesso entre TEF sem e com recurso a doação de ovócitos e as TEC. Valores-p estatisticamente significativos estão destacados.

		+	-	z	p
Gravidez Química	S/Doação	50	162	-4.7922	8.2×10^{-7}
	TEC	88	102		
Gravidez Clínica	S/Doação	48	164	-3.8676	5.4×10^{-5}
	TEC	77	113		
Nascimento	S/Doação	36	176	-3.2033	6.8×10^{-4}
	TEC	58	132		
Gravidez Química	C/Doação	41	37	0.9299	0.8238
	TEC	88	102		
Gravidez Clínica	C/Doação	38	40	1.2307	0.8908
	TEC	77	113		
Nascimento	C/Doação	34	44	2.0460	0.9796
	TEC	58	132		

2.4 Ciclos de Criopreservação Total de Embriões

Tal como referido, em alguns ciclos é realizada a criopreservação total dos embriões. De modo a compreender se há diferenças significativas entre realizar uma TEF ou criopreservar os embriões e realizar uma TEC foram comparadas as taxas de sucesso das primeiras transferências de cada ciclo, assim, a amostra usada nesta comparação contém apenas a primeira tentativa para um ciclo, sendo TEF ou TEC, garantindo a independência entre as observações.

A **Tabela 8** representa a tabela de contingência utilizada bem como o valor da estatística de teste (χ_1^2) e os respetivos valores-p. Tendo em conta que foram comparadas apenas as primeiras tentativas de cada ciclo, o número de TEF é significativamente superior ao de TEC devido ao menor número de ciclos de crio total.

Tabela 8. Tabela de contingência utilizada para a comparação das TEC de ciclos de crio total com as TEF dos ciclos completos. Valores-p estatisticamente significativos estão destacados.

		+	-	z	p
Gravidez Química	TEF	135	270	-3.4549	2.8×10^{-4}
	TEC	67	67		
Gravidez Clínica	TEF	114	291	-3.5686	1.8×10^{-4}
	TEC	60	74		
Nascimento	TEF	86	319	-2.8886	1.9×10^{-3}
	TEC	45	89		

2.5 Influência das Idades

De forma a estudar a influência das idades das pacientes, analisaram-se os efeitos das idades uterina e ovocitária na taxa de sucesso entre TEF e TEC.

2.5.1 Idade Uterina

Primeiramente, fez-se a comparação das taxas de sucesso para o total das transferências de acordo com a idade uterina (**Gráfico Anexo 1**) não se tendo observado diferenças acentuadas entre as diferentes faixas etárias. Ao fazer a comparação entre TEF e TEC, foram separados, adicionalmente, os casos sem e com recurso a doação de ovócitos de maneira a entender em que faixa etária o tipo de ciclo (completo ou faseado) possui maior influência (**Gráfico 4**). Verifica-se que, para pacientes com idades superiores a 45 anos, só se registam gravidezes e nascimentos com recurso a doação.

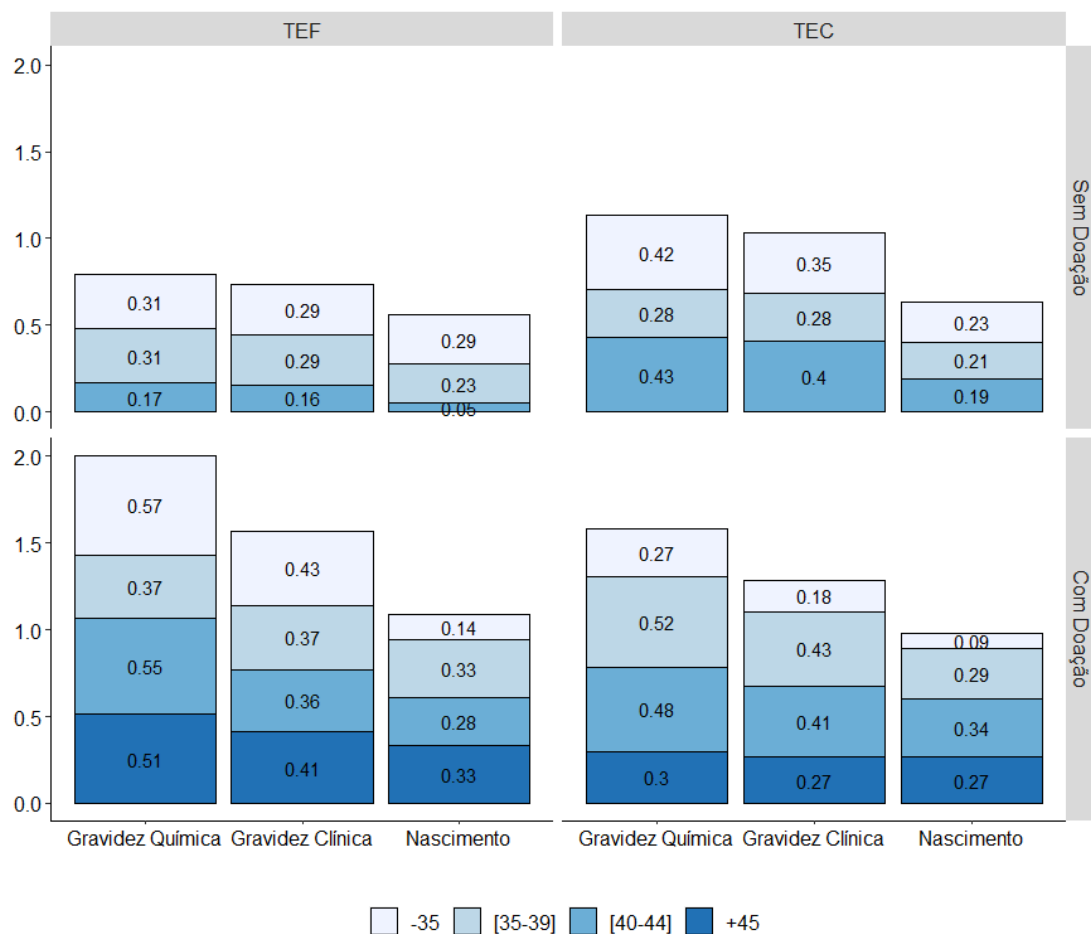


Gráfico 4. Taxas de sucesso entre TEF e TEC de acordo com as idades uterinas e recurso ou não a doação de ovócitos.

TEF *versus* TEC

Considerando a amostra independente (**Tabela Anexo 2**), verificou-se que, apenas nas idades entre os 40 e os 44 anos [40-44] os valores-p são inferiores a 0.05 para os três parâmetros de sucesso. Nas idades inferiores a 35 anos [-35] verificou-se o mesmo, mas apenas para a gravidez química. Assim, considerando a hipótese nula de que $p_{TEF} \geq p_{TEC}$, apenas encontramos evidências estatísticas significativas de que a taxa de sucesso das TEC é superior às TEF em pacientes com idades entre os 40 e os 44 anos.

Para amostras dependentes (**Tabela Anexo 3**), apesar dos casos serem bastante reduzidos relativamente aos independentes, as estatísticas calculadas mostram valores-p inferiores a 0.05 para pacientes na faixa etária dos 40 aos 44 anos. Não foram relatados casos de nascimentos em ciclos de TEF seguidas de TEC em pacientes com mais de 45 anos [+45], pelo que o valor da estatística e, conseqüentemente, o valor-p não foi calculado. Assim, tal como nas amostras independentes, apenas encontramos evidências estatísticas de que a taxa de sucesso das TEC é superior às TEF em pacientes com idades entre os 40 e os 44 anos.

TEF sem Doação de Ovócitos *versus* TEF com Doação de Ovócitos

Uma vez que, quando considerando as transferências totais, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as TEF com e sem doação, foi realizada a mesma análise considerando cada faixa etária (**Tabela Anexo 4**). Observou-se uma taxa de sucesso das TEF com doação superior apenas nas senhoras pertencentes a faixas etárias mais avançadas ([40-44] e [+45]), contudo, ressalva-se que no caso de pacientes com idades superiores a 45 anos não existem casos positivos de gravidez química, clínica e nascimentos para esta faixa etária na ausência de doação. Existem, portanto, evidências estatísticas que permitam rejeitar a hipótese nula de que TEF sem doação apresentam taxas de sucesso iguais ou superiores às TEF com doação feminina.

Crio Total

Semelhante ao que ocorre para a amostra total, verifica-se que, para os três parâmetros de sucesso, apenas a faixa etária dos 40 aos 44 anos [40-44] apresenta valores-p inferiores à significância de 5% (**Tabela Anexo 5**).

Existem, portanto, evidências de que a taxa de sucesso na primeira transferência de um ciclo de crio total é superior a uma TEF para esta faixa etária. Para as restantes, exceto para a gravidez química em pacientes com idades inferiores a 35 anos, a hipótese nula não pode ser rejeitada.

Em suma, na **Tabela 9** encontram-se os resultados obtidos, apresentando a hipótese nula considerada para cada teste, bem como as faixas etárias, segundo cada resultado, onde foram encontradas evidências estatísticas suficientes que rejeitem H_0 .

Tabela 9. Resumo dos resultados obtidos para as diferenças entre TEF e TEC, considerando o ciclo de origem como completo ou faseado e os ciclos de crio total, para as diferentes faixas etárias (-35, [35-39], [40-44], +45).

		$H_0: p_{TEF} \geq p_{TEC}$	
		Independente	Dependente
TEF versus TEC	Gravidez Química	-35, [40-44]	[40-44]
	Gravidez Clínica	[40-44]	[40-44]
	Nascimento	[40-44]	[40-44]
		$H_0: p_{S/Doação} \geq p_{C/Doação}$	
TEF S/Doação versus C/Doação	Gravidez Química	[40-44], +45	
	Gravidez Clínica	[40-44], +45	
	Nascimento	[40-44], +45	
		$H_0: p_{TEF} \geq p_{TEC}$	
Crio total	Gravidez Química	-35, [40-44]	
	Gravidez Clínica	[40-44]	
	Nascimento	[40-44]	

2.5.2 Idade Ovocitária

Uma vez que, na ausência de doação de ovócitos as idades uterinas são as mesmas que as dos ovócitos, ou muito próximas no caso de TEC realizadas após vários meses (que representam uma porção muito pequena dos casos), a comparação das idades ovocitárias foi realizada somente entre os casos de TEF com e sem doação de ovócitos. (**Gráfico 5**).

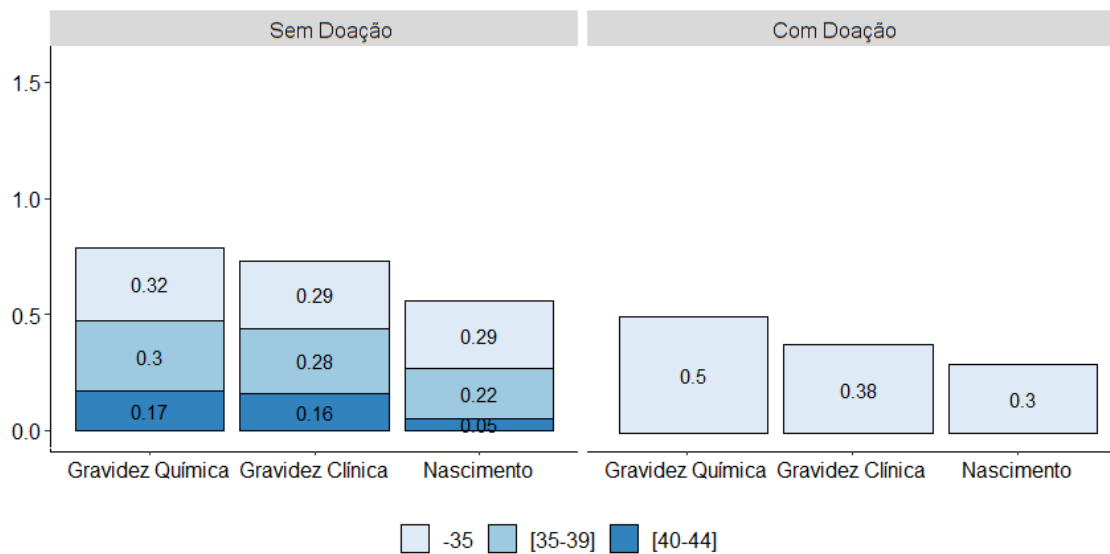


Gráfico 5. Comparação das taxas de sucesso de TEF sem e com recurso a doação de ovócitos para cada faixa etária.

TEF sem Doação de Ovócitos *versus* TEF com Doação de Ovócitos

A **Tabela Anexo 6** resume os valores dos ciclos independentes das pacientes que se submeteram a TEF com e sem doação feminina para a faixa etária abaixo dos 35 anos. Nestes casos, os valores-p são inferiores a 5% para a gravidez química e clínica, mas não para o nascimento, rejeitando a hipótese nula que considera a percentagem de sucesso das TEF sem doação superior ou igual às TEF com doação.

3. Frequent Pattern Mining

Após a aplicação do algoritmo FP-Growth, ficou-se com a transformação das variáveis a analisar tal como representado na **Tabela 10**.

Tabela 10. Representação das transferências como uma transação, onde os atributos estão representados por *True* ou *False*, segundo as características envolvidas no tratamento.

	1	2	D	DoacaoF	Eclosao	F	MD	MF	Nasc+	Nasc-	...
0	True	False	False	False	True	False	False	True	False	True	...
...	O: [35- 39]	O: [40- 44]	S/Doacao	S/Eclosao	TEC	TEF	U:+45	U:-35	U: [35- 39]	U: [40- 44]	
...	True	False	True	False	True	False	False	False	True	False	

Após a ordenação segundo o suporte, apontaram-se como mais frequentes as transferências de um único embrião, com cerca de 87%; as transferências que não resultaram em nascimento (69%); grau de dificuldade MF com, praticamente, 62%; sem doação feminina com cerca de 60% e, ambas com 58%, idades ovocitárias inferiores a 35 anos e transferências TEF. Nos conjuntos com dois atributos, encontramos em primeiro lugar, com cerca de 58%, os resultados que não resultaram em nascimento associados a transferências com apenas um embrião. Com cerca de 53% e 52%, surgem os pares, conjugando as transferências MF com apenas um embrião, bem como as transferências de um embrião com idades ovocitárias inferiores a 35 anos. Com exatamente 50%, aparecem as transferências com apenas um embrião e sem doação feminina.

De seguida, apresentam-se as tabelas (**Tabela 11** e **Tabela 12**) com as métricas de confiança, suporte, *lift*, *leverage* e convicção usadas para determinar a importância das regras apresentadas. A estatística de *lift* mede a força da associação dos componentes da regra comparando a frequência observada do antecedente e consequente em conjunto com a probabilidade da independência estatística. Assim, se os componentes forem independentes, o valor do *lift* deverá ser 1. A métrica de *leverage* mede a diferença entre o suporte da regra e o produto das frequências individuais. Se o valor for 0, os componentes estão próximos da independência. No caso da convicção, quanto maior o valor, maior a dependência entre o consequente e o antecedente.

Na implementação do algoritmo, foram usadas as métricas de suporte e confiança como parâmetros para filtrar o número de casos, considerando apenas relevantes os itens com frequência superior a 12 e confiança superior a 60%.

3.1 Nascimento no consequente: $X \rightarrow Nasc +$

Para facilitar a interpretação dos resultados, começou-se por filtrar as linhas que têm como consequente o nascimento. Assim, pretende-se encontrar as condições ideais para se obter um resultado positivo (**Tabela 11**).

De um modo geral, o valor médio de suporte das regras apresentadas aproxima-se de 0.04, os valores médios de confiança rondam os 86%, o *lift* aproxima os 2.32, sendo este valor próximo do terceiro quartil (75% das observações), a *leverage* obtém uma média de 0.02, sendo próximo do terceiro quartil e estando bastante próximo da independência. Tendo em conta apenas as regras relativas ao nascimento, os valores médios são todos próximos do panorama geral.

Tabela 11. Resultados da análise de *Frequent Pattern Mining* para Nascimento no consequente: $X \rightarrow Nasc +$.

antecedents	consequents	antecedent support	consequent support	support	confidence	lift	leverage	conviction
(U:+45, TEF, 1, S/Eclosao, O:-35)	(DoacaoF, Nasc+)	0.036765	0.167279	0.022059	0.600000	3.586813	0.015909	2.081801
(U:+45, TEF, 1, DoacaoF, S/Eclosao)	(Nasc+, O:-35)	0.036765	0.227941	0.022059	0.600000	2.632258	0.013679	1.930147
(MF, U:[40-44], TEC, 1, O:-35)	(Nasc+)	0.049632	0.312500	0.031250	0.629630	2.014815	0.015740	1.856250
(MF, U:[40-44], TEC, 1, DoacaoF)	(Nasc+)	0.049632	0.312500	0.031250	0.629630	2.014815	0.015740	1.856250
(MF, O:-35, TEC, U:[40-44])	(Nasc+)	0.053309	0.312500	0.033088	0.620690	1.986207	0.016429	1.812500
(DoacaoF, MF, TEC, U:[40-44])	(Nasc+)	0.053309	0.312500	0.033088	0.620690	1.986207	0.016429	1.812500
(MF, U:[40-44], TEC, 1, DoacaoF, O:-35)	(Nasc+)	0.047794	0.312500	0.029412	0.615385	1.969231	0.014476	1.787500
(MF, U:[40-44], TEC, DoacaoF, O:-35)	(Nasc+)	0.051471	0.312500	0.031250	0.607143	1.942857	0.015165	1.750000
(U:+45, TEF, 1, DoacaoF, S/Eclosao)	(Nasc+)	0.036765	0.312500	0.022059	0.600000	1.920000	0.010570	1.718750
(U:+45, TEF, 1, S/Eclosao, O:-35)	(Nasc+)	0.036765	0.312500	0.022059	0.600000	1.920000	0.010570	1.718750
(U:+45, TEF, 1, DoacaoF, S/Eclosao, O:-35)	(Nasc+)	0.036765	0.312500	0.022059	0.600000	1.920000	0.010570	1.718750

Analisando as regras obtidas, ordenadas pelo *lift*, as primeiras quatro regras são as que apresentam valores mais afastados de 1 e, por isso, mais afastados da independência. Surgem casos maioritariamente associados a dificuldade de transferência MF (no entanto este parâmetro foi desconsiderado) nas transferências TEC, aparecendo em destacado os casos com doação feminina, ou seja, idades ovocitárias abaixo dos 35 anos, em mulheres com mais de 45 anos para as TEF, e entre os 40 e os 44 para as TEC. A utilização de EA é sempre negativa.

3.2 Nascimento no antecedente: $Nasc+ \rightarrow Y$

Considerando as regras com nascimento positivo no antecedente, a **Tabela 12** descreve as regras que determinam os consequentes se o nascimento tiver sido positivo. As primeiras entradas apresentam valores de confiança e *lift* superior aos observados anteriormente. Comparativamente aos resultados anteriores, estas regras apresentam valores das idades uterinas e ovocitárias iguais e nunca do mesmo lado da regra. Além disso, é possível constatar-se que para TEF os valores das idades pertencem às faixas etárias dos 35 aos 39 anos sem recurso a doação, sem recurso a EA, e na transferência de apenas 1 embrião.

Tabela 12. Resultados da análise de *Frequent Pattern Mining* para Nascimento no antecedente: $Nasc+ \rightarrow Y$.

antecedents	consequents	antecedent support	consequent support	support	confidence	lift	leverage	conviction
(O:[35-39], TEF, Nasc+)	(U:[35-39], 1, S/Eclosao, S/Doacao)	0.036765	0.095588	0.027574	0.750000	7.846154	0.024059	3.617647
(O:[35-39], TEF, Nasc+)	(U:[35-39], S/Eclosao, S/Doacao)	0.036765	0.108456	0.031250	0.850000	7.837288	0.027263	5.943627
(O:[35-39], TEF, Nasc+, 1)	(U:[35-39], S/Eclosao, S/Doacao)	0.033088	0.108456	0.027574	0.833333	7.683616	0.023985	5.349265
(U:[35-39], TEF, Nasc+, S/Doacao)	(S/Eclosao, O:[35-39], 1)	0.038603	0.095588	0.027574	0.714286	7.472527	0.023884	3.165441
(U:[35-39], TEF, Nasc+, S/Doacao)	(S/Eclosao, O:[35-39])	0.038603	0.108456	0.031250	0.809524	7.464084	0.027063	4.680607
(Nasc+, S/Doacao, TEF, 1, U:[35-39])	(S/Eclosao, O:[35-39])	0.034926	0.108456	0.027574	0.789474	7.279215	0.023786	4.234835
(TEF, Nasc+, U:-35)	(S/Eclosao, O:-35, S/Doacao)	0.038603	0.121324	0.031250	0.809524	6.672439	0.026567	4.613051
(S/Eclosao, Nasc+, O:-35, S/Doacao)	(TEF, U:-35)	0.040441	0.117647	0.031250	0.772727	6.568182	0.026492	3.882353
(S/Eclosao, Nasc+, U:-35)	(1, TEF, O:-35, S/Doacao)	0.042279	0.093750	0.025735	0.608696	6.492754	0.021772	2.315972
(S/Eclosao, Nasc+, U:-35)	(TEF, O:-35, S/Doacao)	0.042279	0.113971	0.031250	0.739130	6.485273	0.026431	3.396446

4. Discussão dos Resultados

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram, claramente, uma diferença nas taxas de sucesso entre TEF e TEC, tanto quando considerando amostras independentes como o total das amostras. Considerando apenas amostras independentes não se verifica o mesmo para o nascimento, estando relacionado, possivelmente, com as taxas de abortamento, cujos fatores envolvidos podem não estar relacionados com o tipo de transferência. No caso das amostras dependentes não se observaram diferenças que sustentem a mesma hipótese, provavelmente, devido ao reduzido número de observações na amostra.

Além do processo de criopreservação, a maior diferença entre uma TEF e uma TEC consiste na necessidade de estimulação ovárica numa TEF, provocando um aumento dos níveis hormonais suprafisiológicos que, por sua vez, alteram a receptividade do endométrio ao embrião. Para testar a influência do processo de estimulação ovárica no sucesso das transferências foram comparadas três situações distintas: TEF com e sem doação, TEF sem doação *versus* TEC, TEF com doação *versus* TEC (secção 2.3) em que, numa TEF com doação de ovócitos a preparação endometrial é semelhante a uma TEC, através de um ciclo natural, artificial, ou natural modificado, em que, embora possa haver estimulação da ovulação (no caso do artificial ou natural modificado), os níveis de gonadotrofinas utilizadas não atingem os valores que são usados para a estimulação ovárica. Verifica-se que, tanto as TEF com doação como as TEC, não possuem diferenças nas taxas de sucesso, mas quando comparamos a taxa de sucesso entre TEF com doação e TEF sem doação, e TEF sem doação com a TEC, verifica-se que, a maior probabilidade de sucesso ocorre nos casos em que os ciclos são faseados. A mesma conclusão pode ser dada ao comparar os ciclos de crio total com os ciclos ditos “tradicionais” (secção 2.4).

Para verificar a influência da idade nas taxas de sucesso, estas foram comparadas para diferentes faixas etárias das pacientes, correspondentes às idades uterinas. Ao comparar o total das amostras para cada faixa etária verificou-se que, apenas nos casos entre os 40 e 44 anos é que se observam diferenças que permitem apoiar que uma TEC possui maior probabilidade de sucesso que uma TEF (secção 2.5.1). Considerando que esta é a faixa etária mais representativa da amostra, as diferenças observadas para a amostra total podem ser explicadas pelo mesmo facto, ou seja, uma TEC só será mais vantajosa precisamente para as pacientes acima dos 40 anos. Seria de esperar que, para pacientes com mais de 45 anos se verificasse o mesmo, no entanto, devido ao

elevado número de transferências provenientes de ciclos com doação de ovócitos, as TEF para estas faixas etárias possuem um tipo de preparação endometrial semelhante a uma TEC, reforçando a importância de um ciclo completo ou faseado e a sua influência no sucesso da transferência embrionária. Para pacientes mais novas, ou seja, abaixo dos 40 anos, também não se observaram diferenças, apoiando a hipótese de que, a realização de uma TEC mostra-se mais vantajosa para pacientes acima dos 40 anos.

Ao comparar a diferença entre uma TEF com doação e sem doação, observa-se que, os casos de doação possuem uma taxa de sucesso mais elevada para pacientes acima dos 40 anos, incluindo as com mais de 45 anos. Apesar de poder ser explicado pelo facto de que, o ciclo é faseado, este resultado pode dever-se à idade ovocitária, que, quanto mais avançada mais a célula perde a sua capacidade reprodutiva, sendo que, nos casos de doação a idade dos ovócitos é abaixo de 35 anos e, adicionalmente, as dadoras passam por um processo de seleção para anomalias genéticas. Para confirmar esta hipótese, realizou-se a mesma comparação, mas para as idades ovocitárias abaixo dos 35 anos (secção 2.5.2). Apesar de, a amostra possuir poucos casos de não doação com menos de 35 anos, os resultados obtidos permitem inferir que, o impacto da carga hormonal fornecida, ou seja, o tipo de ciclo, tem um papel crucial na ocorrência de gravidez. Por outro lado, a maioria das pacientes com menos de 35 anos presentes na amostra possuem um fator grave de infertilidade, ou infertilidade multifatorial, pelo que, poderá explicar a dificuldade em engravidar destas pacientes comparativamente com as mais velhas, que, nesta amostra, devido ao elevado número de casos, possuem fatores de infertilidade distintos, mantendo uma heterogeneidade. Curiosamente, não se verificaram diferenças ao nível da taxa de nascimento, podendo ser explicado pela taxa de abortamento, que nas senhoras mais velhas é mais elevada, mesmo quando utilizados ovócitos de dadoras (140). Apesar de haver poucos estudos que expliquem este resultado, é comum as pacientes com mais idade possuírem mais dificuldades com a receptividade endometrial, além de possuírem mais anomalias uterinas inerentes ao envelhecimento, nomeadamente pólipos e fibromiomas, que condicionam o decurso da gravidez. Simultaneamente, a capacidade do organismo em suportar a carga hormonal envolvida na gravidez pode ser mais debilitada devido aos altos níveis de estrogénio e progesterona que caracterizam a gestação. Ao realizar a comparação dos ciclos de crio total com os “tradicionais” verifica-se o mesmo, ou seja, os ciclos de crio total possuem maior taxa de sucesso para pacientes entre os 40 e os 44 anos.

A significância da gravidez química para pacientes abaixo dos 35 anos em TEF *versus* TEC e nos ciclos de crio total (**Tabela 9**) não foi considerada relevante, uma vez

que, a deteção de β -hCG no sangue pode ocorrer devido à elevada produção pelo trofoblasto, e não por uma implantação bem sucedida (141), caso contrário, as diferenças estatísticas verificar-se-iam também para a gravidez clínica.

Através da análise por *Frequent Pattern Mining* confirma-se que, mulheres com mais de 45 anos sujeitas a TEF, recorrendo a doação feminina, aumentam as suas probabilidades de ter um filho, indo ao encontro dos valores apresentados nos testes estatísticos. Igualmente, para senhoras entre os 40 e os 44 anos, estão associadas TEC também com doação feminina. Curiosamente, a probabilidade de nascimento ser mais alta em TEC para as pacientes entre os 40 e os 44 anos em vez de TEF, mesmo com doação feminina, pode ser explicada pelo maior número de casos nesta amostra, comparativamente com as pacientes com mais de 45 anos, ou, adicionalmente, com o facto de que, para esta análise se usou o nascimento como medida do sucesso da transferência, podendo as TEF para pacientes dos 40 aos 44 anos estar associadas a maiores taxas de abortamento do que nas pacientes com 45 anos. Ao conjugar os diferentes fatores, verificou-se que, para todos os casos, independentemente da faixa etária e da existência de doação, as transferências de apenas 1 embrião ao invés de 2 levaram a um maior número de nascimentos. Apesar de, ser comum a transferência de 2 embriões de modo a aumentar a probabilidade de um deles implantar e originar uma gravidez, o presente trabalho demonstra o oposto, podendo ser explicado pelo facto de se realizar uma avaliação da qualidade embrionária minuciosa e, a maioria das transferências serem realizadas ao 5º dia de desenvolvimento, fatores que estão, ambos, associados a maiores taxas de sucesso, tal como demonstrado noutros trabalhos (142, 143). A utilização de EA não demonstrou benefício, nem para TEF nem para TEC, para nenhuma faixa etária. O estudo mais recente acerca das taxas de sucesso de transferências embrionárias com e sem a utilização de EA, aponta para a sua ineficácia quando usada em TEF, não tendo nenhuma conclusão em relação à TEC, apoiando, em certa medida, os resultados aqui apresentados referentes à EA (144).

Conclusão

Durante o ano letivo, o meu estágio curricular decorreu nas instalações do CEIE, que frequentei quase diariamente. O estágio permitiu-me estar em contacto com um laboratório de PMA, interagir com os pacientes e compreender a dinâmica do quotidiano de um embriologista. Foi-me possível acompanhar todas as técnicas relativas à área e, ainda, realizar autonomamente alguns espermogramas, processamento de espermatozoides para IIU, FIV e ICSI, bem como congelação e descongelação de palhetas de doação. Foi-me, também, possível, acompanhar dezenas de punções ováricas, treinar a procura por ovócitos e a desnudação dos mesmos e de embriões, e treinar os protocolos de criopreservação. Assisti também ao processo laboratorial de amostras obtidas por TESE e alguns casos de DGPI. Acompanhei os protocolos de FIV, ICSI e transferências embrionárias, tendo sido permitido treinar com material excedentário, e visualizei dezenas de embriões durante o seu desenvolvimento embrionário e a sua classificação. Outros aspetos, como a gestão de stock do laboratório, a preparação de meios e segurança no manuseamento de azoto líquido também foram bastante relevantes. Foi, sem dúvida, um estágio altamente enriquecedor.

Relativamente ao trabalho escrito, permitiu adquirir imensos conhecimentos acerca da área, nomeadamente questões médicas inerentes à infertilidade e aspetos moleculares do processo de implantação e gravidez. Considerando os resultados aqui obtidos, confirma-se que, o tipo de ciclo (completo *versus* faseado) tem influência no sucesso dos tratamentos de PMA, sobretudo para pacientes acima dos 40 anos. A realização de uma TEC em detrimento de uma TEF poderá ter vantagens para estas pacientes devido às condições hormonais a que ficam sujeitas numa estimulação e punção ováricas. Os ciclos *freeze-all* poderão, assim, justificar-se mais vantajosos para pacientes nestas idades. A transferência de dois embriões e a utilização de EA não demonstraram aumento das taxas de sucesso, evidenciando a importância do protocolo hormonal e da idade da paciente, comparativamente com outros fatores, no contexto da PMA.

Referências Bibliográficas

1. World Health Organization. Infertility: WHO; 2010 [cited 2021 November 15]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility>.
2. Inhorn MC, Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. Hum Reprod Update. 2015;21(4):411-26.
3. Mascarenhas MN, Flaxman Sr Fau - Boerma T, Boerma T Fau - Vanderpoel S, Vanderpoel S Fau - Stevens GA, Stevens GA. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. 2012(1549-1676 (Electronic)).
4. Shea Rutstein, ORC Macro, Calverton M, Iqbal Shah, World Health Organization. Infecundity, infertility, and childlessness in developing countries. DHS Comparative Reports No. 9. Geneva, Switzerland WHO; 2004.
5. Hassan MAM, Killick SR. Negative lifestyle is associated with a significant reduction in fecundity. Fertility and Sterility. 2004;81(2):384-92.
6. Pasquali R, Patton L, Gambineri A. Obesity and infertility. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2007;14(6):482-7.
7. Skoracka K, Eder P, Łykowska-Szuber L, Dobrowolska A, Krela-Kaźmierczak I. Diet and Nutritional Factors in Male (In)fertility-Underestimated Factors. J Clin Med. 2020;9(5):1400.
8. Sauer MV. Reproduction at an advanced maternal age and maternal health. Fertil Steril. 2015;103(5):1136-43.
9. Silva-Carvalho JL, Santos A. Estudo Afrodite - caracterização da infertilidade em Portugal, I – Estudo na comunidade. Universidade do Porto; 2009.
10. Associação Portuguesa de Fertilidade. Infertilidade: APF; 2020 [cited 2022 January 22]. Available from: <https://apfertilidade.org/infertilidade/>.
11. National Institute for Health and Care Excellence. Fertility problems: assessment and treatment: Clinical Guideline. United Kingdom: NICE; 2021.
12. Direção Geral da Saúde. Norma sobre Conduta em Infertilidade para os Cuidados de Saúde Primários. Lisboa: DGS; 2011.

13. Frey KA, Patel KS. Initial Evaluation and Management of Infertility by the Primary Care Physician. *Mayo Clinic Proceedings*. 2004;79(11):1439-43.
14. Rooney KL, Domar AD. The impact of stress on fertility treatment. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2016;28(3):198-201.
15. Llavona Uribe Larrea LM. El impacto psicológico de la infertilidad. *Papeles del Psicólogo*. 2008;29(2):158-66.
16. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 6th ed. Geneva: WHO; 2021.
17. Luís Ferraz. Avaliação do casal infértil - Factor masculino. In: Fortunato Barros, Rute Figueiredo, editors. *Manual de Medicina Sexual*. Lisboa: HSJ Consultores; 2014. p. 461-8.
18. Ferraz L. A Importância do Andrologista no Estudo e Tratamento do Homem Infértil. *Acta Urológica*. 2006;23(2):13-6.
19. Leung A, Mira J, Hsiao W. Updates on sperm retrieval techniques. *Transl Androl Urol*. 2014;3(1):94-101.
20. Le MT, Nguyen TAT, Nguyen HTT, Nguyen TTT, Nguyen VT, Le DD, et al. Does sperm DNA fragmentation correlate with semen parameters? *Reprod Med Biol*. 2019;18(4):390-6.
21. Radwan M, Jurewicz J, Merecz-Kot D, Sobala W, Radwan P, Bochenek M, et al. Sperm DNA damage—the effect of stress and everyday life factors. *International Journal of Impotence Research*. 2016;28(4):148-54.
22. López G, Lafuente R, Checa MA, Carreras R, Brassesco M. Diagnostic value of sperm DNA fragmentation and sperm high-magnification for predicting outcome of assisted reproduction treatment. *Asian J Androl*. 2013;15(6):790-4.
23. Pandey S, Pandey S, Maheshwari A, Bhattacharya S. The impact of female obesity on the outcome of fertility treatment. *J Hum Reprod Sci*. 2010;3(2):62-7.
24. João Luís Silva Carvalho. Infertilidade. In: Oliveira CFd, editor. *Manual de Ginecologia*. II. Lisboa: Permanyer Portugal; 2011. p. 3-73.

25. Tomás C, Metello JL. Endometriose e infertilidade – onde estamos? Acta Obstet Ginecol Port. 2019;13(4):235-41.
26. António Pereira Coelho. Endometriose. In: Carlos Freire de Oliveira, editor. Manual de Ginecologia. I. Lisboa: Permanyer Portugal; 2009. p. 277-93.
27. Ana Gaspar, Maria José Carvalho. Avaliação do casal infértil - Factor feminino. In: Fortunato Barros, Rute Figueiredo, editors. Manual de Medicina Sexual. Lisboa: HSJ Consultores; 2014. p. 469 - 74.
28. Pavletic AJ, Wölner-Hanssen P, Paavonen J, Hawes SE, Eschenbach DA. Infertility following pelvic inflammatory disease. Infect Dis Obstet Gynecol. 1999;7(3):145-52.
29. Centers for Disease Control and Prevention, Division of STD Prevention, National Center for HIV Viral Hepatitis STD and TB Prevention. STDs & Infertility: CDC; 2021 [cited 2022 February 21]. Available from: <https://www.cdc.gov/std/infertility/default.htm>.
30. The Thessaloniki ESHRE/ASRM Sponsored Pcos Consensus Workshop Group. Consensus on infertility treatment related to polycystic ovary syndrome. Human Reproduction. 2008;23(3):462-77.
31. Almeida C, Reginatto F, Cunha J, Facin A, Freitas F, Lavic Y, et al. Histerossonossalpingografia e histerossalpingografia no diagnóstico de permeabilidade tubária em pacientes inférteis. Revista da Associação Médica Brasileira. 2000;46.
32. Graça Pinto. Tratamento médico-cirúrgico do factor feminino. In: Fortunato Barros, Rute Figueiredo, editors. Manual de Medicina Sexual. Lisboa: HSJ Consultores; 2014. p. 485-94.
33. Hur C, Rehmer J, Flyckt R, Falcone T. Uterine Factor Infertility: A Clinical Review. Clinical Obstetrics and Gynecology. 2019;62(2).
34. Xavier PAF. Amenorreias. In: Carlos Freire de Oliveira, editor. Manual de Ginecologia. I. Lisboa: Permanyer Portugal; 2009. p. 245-55.
35. Morgan T. Turner syndrome: diagnosis and management. Am Fam Physician. 2007;76(3):405-10.

36. Gelbaya TA, Potdar N, Jeve YB, Nardo LG. Definition and epidemiology of unexplained infertility. *Obstet Gynecol Surv.* 2014;69(2):109-15.
37. Sadeghi MR. Unexplained infertility, the controversial matter in management of infertile couples. *J Reprod Infertil.* 2015;16(1):1-2.
38. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. *Hum Reprod.* 2009;24(11):2683-7.
39. Conselho Nacional de Procriação Medicamente Assistida. Relatório - Atividade Desenvolvida pelos Centros de PMA em 2018. Lisboa: cnpma Julho 2021.
40. Direção Geral da Saúde. Norma sobre Conduta em Infertilidade para os Cuidados de Saúde Hospitalares. Lisboa: DGS; 2011.
41. Steptoe PC, Edwards RG. BIRTH AFTER THE REIMPLANTATION OF A HUMAN EMBRYO. *The Lancet.* 1978;312(8085):366.
42. Zeev Shoham, Colin M. Howles. Drugs used for ovarian stimulation: Clomiphene citrate, aromatase inhibitors, metformin, gonadotropins, gonadotropinreleasing hormone analogs, and recombinant gonadotropins. In: David K. Gardner, Ariel Weissman, Colin M. Howles, Zeev Shoham, editors. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques. Volume 2: Clinical Perspectives.* Fifth ed. New York, USA: CRC Press; 2018.
43. Tarlatzis BC, Kolibianakis EM. GnRH agonists vs antagonists. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology.* 2007;21(1):57-65.
44. Jack Yu Jen Huang, Zev Rosenwaks. Assisted Reproductive Techniques. In: Zev Rosenwaks, Paul Wassarman, editors. *Human Fertility.* United Kingdom: Humana Press; 2014.
45. Kumar P, Sait SF, Sharma A, Kumar M. Ovarian hyperstimulation syndrome. *J Hum Reprod Sci.* 2011;4(2):70-5.
46. Gab Kovacs. Oocyte Collection. In: David K. Gardner, Ariel Weissman, Colin M. Howles, Zeev Shoham, editors. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques. Volume 2: Clinical Perspectives.* Fifth ed. New York, USA: CRC Press; 2018.

47. Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. *Adv Urol.* 2012;2012:854837.
48. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *The Lancet.* 1992;340(8810):17-8.
49. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Recommendations for reducing the risk of viral transmission during fertility treatment with the use of autologous gametes: a committee opinion. *Fertil Steril.* 2013;99(2):340-6.
50. Palermo GD, Cohen J, Alikani M, Adler A, Rosenwaks Z. Intracytoplasmic sperm injection: a novel treatment for all forms of male factor infertility. *Fertil Steril.* 1995;63(6):1231-40.
51. Silber SJ, Nagy Z, Liu J, Tournaye H, Lissens W, Ferec C, et al. The use of epididymal and testicular spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection: the genetic implications for male infertility. *Hum Reprod.* 1995;10(8):2031-43.
52. Mansour R. Intracytoplasmic sperm injection: a state of the art technique. *Human Reproduction Update.* 1998;4(1):43-56.
53. Kay Elder, Brian Dale. *Micromanipulation Techniques. In-Vitro Fertilization.* Fourth ed. United Kingdom: Cambridge University Press; 2020.
54. Queenie Neri, Nigel Pereira, Tyler Cozzubbo, Zev Rosenwaks, Gianpiero Palermo. Intracytoplasmic sperm injection In: David K. Gardner, Ariel Weissman, Colin M. Howles, Zeev Shoham, editors. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques. Volume 1: Laboratory Perspectives.* Fifth ed. New York, USA: CRC Press; 2018.
55. Baczkowski T, Kurzawa R, Głabowski W. Methods of embryo scoring in in vitro fertilization. *Reprod Biol.* 2004;4(1):5-22.
56. Puissant F, Van Rysselberge M, Barlow P, Deweze J, Leroy F. Embryo scoring as a prognostic tool in IVF treatment. *Hum Reprod.* 1987;2(8):705-8.
57. Montag M, Liebenthron J, Köster M. Which morphological scoring system is relevant in human embryo development? *Placenta.* 2011;32:S252-S6.

58. Takenaka M, Horiuchi T Fau - Yanagimachi R, Yanagimachi R. Effects of light on development of mammalian zygotes. (0027-8424 (Print)).
59. Payne D, Flaherty Sp Fau - Barry MF, Barry Mf Fau - Matthews CD, Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. (0268-1161 (Print)).
60. Mio Y, Maeda K. Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos. American Journal of Obstetrics & Gynecology. 2008;199(6):660.e1-.e5.
61. Nakahara T, Iwase A, Goto M, Harata T, Suzuki M, Ienaga M, et al. Evaluation of the safety of time-lapse observations for human embryos. J Assist Reprod Genet. 2010;27(2-3):93-6.
62. Alpha Scientists in Reproductive Medicine, European Society of Human Reproduction and Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. 2011(1460-2350 (Electronic)).
63. Konc J, Kanyó K, Kriston R, Somosköi B, Cseh S. Cryopreservation of Embryos and Oocytes in Human Assisted Reproduction. BioMed Research International. 2014;2014:307268.
64. Wong KM, Mastenbroek S, Repping S. Cryopreservation of human embryos and its contribution to in vitro fertilization success rates. Fertil Steril. 2014;102(1):19-26.
65. Edgar DH, Gook DA. A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. Hum Reprod Update. 2012;18(5):536-54.
66. Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Pados G, Bontis I, et al. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. Fertil Steril. 2008;90(1):186-93.
67. Liebermann J, Dietl J, Vanderzwalmen P, Tucker MJ. Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now? Reprod Biomed Online. 2003;7(6):623-33.
68. Kasai M, Mukaida T. Cryopreservation of animal and human embryos by

vitrification. *Reprod Biomed Online*. 2004;9(2):164-70.

69. Seki S, Jin B, Mazur P. Extreme rapid warming yields high functional survivals of vitrified 8-cell mouse embryos even when suspended in a half-strength vitrification solution and cooled at moderate rates to -196°C . *Cryobiology*. 2014;68(1):71-8.

70. Seki S, Mazur P. Effect of Warming Rate on the Survival of Vitrified Mouse Oocytes and on the Recrystallization of Intracellular Ice1. *Biology of Reproduction*. 2008;79(4):727-37.

71. Van Voorhis B, Mejia RB. Single-embryo transfer. *Fertility and Sterility*. 2017;108(5):757.

72. Pandian Z, Marjoribanks J, Ozturk O, Serour G, Bhattacharya S. Number of embryos for transfer following in vitro fertilisation or intra-cytoplasmic sperm injection. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;2013(7):Cd003416.

73. Conselho Nacional de Procriação Medicamente Assistida. Requisitos e Parâmetros de funcionamento dos centros de PMA: cnpma; 2021 [Available from: <https://www.cnpma.org.pt/profissionais/Paginas/requisitos-e-parametros.aspx>].

74. Sallam HN, Agameya AF, Rahman AF, Ezzeldin F, Sallam AN. Ultrasound measurement of the uterocervical angle before embryo transfer: a prospective controlled study. *Hum Reprod*. 2002;17(7):1767-72.

75. Choe JK, Nazari A, Check JH, Summers-Chase D, Swenson K. Marked improvement in clinical pregnancy rates following in vitro fertilization-embryo transfer seen when transfer technique and catheter were changed. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2001;28(4):223-4.

76. Wood EG, Batzer FR, Go KJ, Gutmann JN, Corson SL. Ultrasound-guided soft catheter embryo transfers will improve pregnancy rates in in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. 2000;15(1):107-12.

77. Buckett WM. A review and meta-analysis of prospective trials comparing different catheters used for embryo transfer. *Fertility and Sterility*. 2006;85(3):728-34.

78. Abdelmassih VG, Neme RM, Dozortsev D, Abdelmassih S, Diamond MP, Abdelmassih R. Location of the embryo-transfer catheter guide before the internal

uterine os improves the outcome of in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. 2007;88(2):499-503.

79. Nielsen IK, Lindhard A, Loft A, Ziebe S, Andersen AN. A Wallace malleable stylet for difficult embryo transfer in an in vitro fertilization program: a case-control study. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2002;81(2):133-7.

80. Lesny P, Killick SR, Robinson J, Raven G, Maguiness SD. Junctional zone contractions and embryo transfer: is it safe to use a tenaculum? *Hum Reprod*. 1999;14(9):2367-70.

81. Fanchin R, Righini C, Olivennes F, Taylor S, de Ziegler D, Frydman R. Uterine contractions at the time of embryo transfer alter pregnancy rates after in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. 1998;13(7):1968-74.

82. Azem F, Yaron Y, Botchan A, Amit A, Yovel I, David MP, et al. Ectopic pregnancy after in vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET): the possible role of the ET technique. *J Assist Reprod Genet*. 1993;10(4):302-4.

83. Lauralee Sherwood. The Reproductive System. In: Brooks/Cole, editor. *Human Physiology – from cells to systems*. USA 2010.

84. Martin H. Johnson. Women. In: Wiley Blackwell, editor. *Essential Reproduction. Essentials*. Eighth ed. New York 2018.

85. Franasiak JM, Ruiz-Alonso M, Scott RT, Simón C. Both slowly developing embryos and a variable pace of luteal endometrial progression may conspire to prevent normal birth in spite of a capable embryo. *Fertility and Sterility*. 2016;105(4):861-6.

86. Valdes CT, Schutt A, Simon C. Implantation failure of endometrial origin: it is not pathology, but our failure to synchronize the developing embryo with a receptive endometrium. *Fertility and Sterility*. 2017;108(1):15-8.

87. Gellersen B, Brosens JJ. Cyclic Decidualization of the Human Endometrium in Reproductive Health and Failure. *Endocrine Reviews*. 2014;35(6):851-905.

88. Murray MJ, Meyer WR, Zaino RJ, Lessey BA, Novotny DB, Ireland K, et al. A critical analysis of the accuracy, reproducibility, and clinical utility of histologic endometrial dating in fertile women. *Fertil Steril*. 2004;81(5):1333-43.

89. Duggan MA, Brasher P, Ostor A, Scurry J, Billson V, Kneafsey P, et al. The accuracy and interobserver reproducibility of endometrial dating. *Pathology*. 2001;33(3):292-7.
90. Altmäe S, Esteban F, Stavreus-Evers A, Simón C, Giudice L, Lessey B, et al. Guidelines for the design, analysis and interpretation of 'omics' data: Focus on human endometrium. *Human reproduction update*. 2013;20.
91. Flores VA, Kelk DA, Kodaman PH. Trilaminar endometrial pattern correlates with higher clinical pregnancy rates in frozen embryo transfer cycles. *Fertility and Sterility*. 2017;108(3):e358.
92. Zhang T, Li Z, Ren X, Huang B, Zhu G, Yang W, et al. Endometrial thickness as a predictor of the reproductive outcomes in fresh and frozen embryo transfer cycles: A retrospective cohort study of 1512 IVF cycles with morphologically good-quality blastocyst. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(4):e9689.
93. Wang L, Qiao J, Li R, Zhen X, Liu Z. Role of endometrial blood flow assessment with color Doppler energy in predicting pregnancy outcome of IVF-ET cycles. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010;8:122.
94. Sardana D, Upadhyay AJ, Deepika K, Pranesh GT, Rao KA. Correlation of subendometrial-endometrial blood flow assessment by two-dimensional power Doppler with pregnancy outcome in frozen-thawed embryo transfer cycles. *J Hum Reprod Sci*. 2014;7(2):130-5.
95. Ng EHY, Chan CCW, Tang OS, Yeung WSB, Ho PC. Changes in endometrial and subendometrial blood flow in IVF. *Reproductive BioMedicine Online*. 2009;18(2):269-75.
96. Seshagiri PB, Sen Roy S, Sireesha G, Rao RP. Cellular and molecular regulation of mammalian blastocyst hatching. *J Reprod Immunol*. 2009;83(1-2):79-84.
97. Fujiwara H. Immune cells contribute to systemic cross-talk between the embryo and mother during early pregnancy in cooperation with the endocrine system. *Reprod Med Biol*. 2006;5(1):19-29.
98. Su-Mi K, Jong-Soo K. A Review of Mechanisms of Implantation. *Development & Reproduction*. 2017;21(4):351-9.

99. James JL, Carter AM, Chamley LW. Human placentation from nidation to 5 weeks of gestation. Part I: What do we know about formative placental development following implantation? *Placenta*. 2012;33(5):327-34.
100. Gellersen B, Reimann K, Samalecos A, Aupers S, Bamberger AM. Invasiveness of human endometrial stromal cells is promoted by decidualization and by trophoblast-derived signals. *Hum Reprod*. 2010;25(4):862-73.
101. Bruce M. Carlson. Cleavage and Implantation. In: Elsevier, editor. *Human Embryology and Developmental Biology*. Sixth ed. USA: Elsevier; 2019.
102. Guibourdenche J, Handschuh K, Tsatsaris V, Gerbaud P, Leguy MC, Muller F, et al. Hyperglycosylated hCG Is a Marker of Early Human Trophoblast Invasion. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2010;95(10):E240-E4.
103. Bruce M. Carlson. Formation of Germ Layers and Early Derivatives. In: Elsevier, editor. *Human Embryology and Developmental Biology*. Sixth ed. USA: Elsevier; 2019.
104. Ludwig M, Al-Hasani S, Felberbaum R, Diedrich K. New aspects of cryopreservation of oocytes and embryos in assisted reproduction and future perspectives. *Hum Reprod*. 1999;14 Suppl 1:162-85.
105. Cohen J. Assisted hatching of human embryos. *J In Vitro Fert Embryo Transf*. 1991;8(4):179-90.
106. Antinori S, Panci C, Selman HA, Caffa B, Dani G, Versaci C. Zona thinning with the use of laser: a new approach to assisted hatching in humans. *Hum Reprod*. 1996;11(3):590-4.
107. Simón C, Cano F, Valbuena D, Remohí J, Pellicer A. Clinical evidence for a detrimental effect on uterine receptivity of high serum oestradiol concentrations in high and normal responder patients. *Hum Reprod*. 1995;10(9):2432-7.
108. Valbuena D, Jasper M, Remohí J, Pellicer A, Simón C. Ovarian stimulation and endometrial receptivity. *Human Reproduction*. 1999;14(suppl_2):107-11.
109. van der Gaast MH, Beckers NGM, Beier-Hellwig K, Beier HM, Macklon NS, Fauser B. Ovarian stimulation for IVF and endometrial receptivity – the missing link. *Reproductive BioMedicine Online*. 2002;5:36-43.

110. Rackow BW, Kliman HJ, Taylor HS. GnRH antagonists may affect endometrial receptivity. *Fertil Steril*. 2008;89(5):1234-9.
111. Vanessa Gayet, Ioannis Vasilopoulos, Dominique de Ziegler. Luteal-phase support in assisted reproduction technology. In: David K. Gardner, Ariel Weissman, Colin M. Howles, Zeev Shoham, editors. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques. Volume 2: Clinical Perspectives*. Fifth ed. New York, USA: CRC Press; 2018.
112. Pabuçcu E, Pabuçcu R, Gürkan T, Tavmergen E. Luteal phase support in fresh and frozen embryo transfer cycles. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2020:101838.
113. Jane Reavy, Ingrid Granne, Tim Child. Cycle regimes for frozen–thawed embryo transfer. In: David K. Gardner, Ariel Weissman, Colin M. Howles, Zeev Shoham, editors. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques. Volume 2: Clinical Perspectives*. Fifth ed. New York, USA: CRC Press; 2018.
114. Agha-Hosseini M, Hashemi L, Aleyasin A, Ghasemi M, Sarvi F, Shabani Nashtaei M, et al. Natural cycle versus artificial cycle in frozen-thawed embryo transfer: A randomized prospective trial. *Turk J Obstet Gynecol*. 2018;15(1):12-7.
115. Sathanandan M, Macnamee MC, Rainsbury P, Wick K, Brinsden P, Edwards RG. Replacement of frozen - thawed embryos in artificial and natural cycles: A prospective semi-randomized study. *Human Reproduction*. 1991;6(5):685-7.
116. Zbořilová B, Březinová J, Tkadlec E, Procházka M, Oborná I, Sobek A, Jr., et al. HCG level after embryo transfer as a prognostic indicator of pregnancy finished with delivery. *Ceska Gynekol*. 2018;83(5):329-36.
117. Hotamisligil S, Carson R, Glatstein I, Pang S, McShane P. Serum hCG levels 12 days after embryo transfer is predictive of pregnancy outcome. *Fertility and Sterility*. 2003;80:172.
118. Murugan VA, Murphy BOS, Dupuis C, Goldstein A, Kim YH. Role of ultrasound in the evaluation of first-trimester pregnancies in the acute setting. *Ultrasonography*. 2020;39(2):178-89.
119. Chaudhry K, Tafti D, Siccardi MA. Anembryonic Pregnancy. In: Island T, editor.: *StatPearls Publishing*; 2022.
120. Cheng L-Y, Lin P-Y, Huang F-J, Kung F-T, Chiang H-J, Lin Y-J, et al.

Ectopic pregnancy following in vitro fertilization with embryo transfer: A single-center experience during 15 years. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2015;54(5):541-5.

121. Laura Rienzi, Filippo Ubaldi. Oocyte retrieval and selection. In: David K. Gardner, Ariel Weissman, Colin M. Howles, Zeev Shoham, editors. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques. Volume 1: Laboratory Perspectives*. Fifth ed. New York, USA: CRC Press; 2018.

122. Yokoo M, Sato E. Cumulus-oocyte complex interactions during oocyte maturation. *Int Rev Cytol*. 2004;235:251-91.

123. Irit Granot, Nava Dekel. Preparation and evaluation of oocytes for intracytoplasmic sperm injection. In: David K. Gardner, Ariel Weissman, Colin M. Howles, Zeev Shoham, editors. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques. Volume 1: Laboratory Perspectives*. Fifth ed. New York, USA: CRC Press; 2018.

124. ESHRE. ATLAS OF HUMAN EMBRYOLOGY: from Oocytes to Preimplantation Embryos 2015 [cited 2022 June 7]. Available from: <https://atlas.eshre.eu/es/14546584881546780>.

125. CRYOTOP SAKETY KIT Vitrication Protocol for Cryotop Method: KITAZATO(C); 2019 [cited 2022 May 22]. Available from: https://www.kitazato-ivf.com/wp-content/uploads/2021/05/Brochure_Vitrication_Protocol_v_2019-1.pdf.

126. Mladenović I, Mičić S, Genbačev O, Papić N. Hypoosmotic swelling test for quality control of sperm prepared for assisted reproduction. *Arch Androl*. 1995;34(3):163-9.

127. Takahashi K, Uchida A, Kitao M. Hypoosmotic Swelling Test of Sperm. *Archives of Andrology*. 1990;25(3):225-42.

128. Tesarik J, Sousa M. Key elements of a highly efficient intracytoplasmic sperm injection technique: Ca²⁺ fluxes and oocyte cytoplasmic dislocation. *Fertil Steril*. 1995;64(4):770-6.

129. Perreault SD, Zirkin BR. Sperm nuclear decondensation in mammals: role of sperm-associated proteinase in vivo. *J Exp Zool*. 1982;224(2):253-7.

130. Karande V, Hazlett D, Vietzke M, Gleicher N. A prospective randomized

comparison of the Wallace catheter and the Cook Echo-Tip catheter for ultrasound-guided embryo transfer. *Fertil Steril*. 2002;77(4):826-30.

131. CooperSurgical®. Wallace® Sure-Pro® Ultra 2022 [cited 2022 May 24]. Available from: https://fertility.coopersurgical.com/needles_and_catheter/wallace-sure-pro-ultra/.

132. Schoolcraft WB, Surrey ES, Gardner DK. Embryo transfer: techniques and variables affecting success. *Fertility and Sterility*. 2001;76(5):863-70.

133. Omid M, Halvaei I, Mangoli E, Khalili MA, Razi MH. The effect of embryo catheter loading technique on the live birth rate. *Clin Exp Reprod Med*. 2015;42(4):175-80.

134. Christianson MS, Zhao Y, Shoham G, Granot I, Safran A, Khafagy A, et al. Embryo catheter loading and embryo culture techniques: results of a worldwide Web-based survey. *J Assist Reprod Genet*. 2014;31(8):1029-36.

135. Matitashvili T, Sadek S, Ramadan H, Celia G, Jr. THE EFFECT OF EMBRYO CATHETER-LOADING TECHNIQUE ON PREGNANCY AND IMPLANTATION RATES IN FROZEN EMBRYO TRANSFER CYCLES. *Fertility and Sterility*. 2020;114(3):e127.

136. Moreno V, Balasch J, Vidal E, Calafell JM, Cívico S, Vanrell JA. Air in the transfer catheter does not affect the success of embryo transfer. *Fertility and Sterility*. 2004;81(5):1366-70.

137. Digby PGN. Approximating the Tetrachoric Correlation Coefficient. *Biometrics*. 1983;39(3):753-7.

138. Derrick B, Dobson-Mckittrick A, Toher D, White P. Test statistics for comparing two proportions with partially overlapping samples. *Journal of Applied Quantitative Methods*. 2015;10.

139. Narvekar M, Syed SF. An Optimized Algorithm for Association Rule Mining Using FP Tree. *Procedia Computer Science*. 2015;45:101-10.

140. Aflatoonian A, Eftekhari M, Mohammadian F, Yousefnejad F. Outcome of assisted reproductive technology in women aged 40 years and older. *Iran J Reprod Med*. 2011;9(4):281-4.

141. Makrigiannakis A, Vrekoussis T, Zoumakis E, Kalantaridou SN, Jeschke U. The Role of HCG in Implantation: A Mini-Review of Molecular and Clinical Evidence. *Int J Mol Sci.* 2017;18(6):1305.
142. Martikainen H, Tiitinen A, Tomás C, Tapanainen J, Orava M, Tuomivaara L, et al. One versus two embryo transfer after IVF and ICSI: a randomized study. *Human Reproduction.* 2001;16(9):1900-3.
143. Thurin A, Hausken J, Hillensjö T, Jablonowska B, Pinborg A, Strandell A, et al. Elective single-embryo transfer versus double-embryo transfer in in vitro fertilization. *N Engl J Med.* 2004;351(23):2392-402.
144. The role of assisted hatching in in vitro fertilization: a guideline. *Fertil Steril.* 2022;117(6):1177-82.

Anexos

Anexo 1

Tabela Anexo 1. Tabela de contingência utilizada nos cálculos do teste *Stouffer* e do teste proposto por *Digby*.

		+	-
Gravidez Química	TEF	91	199
	TEC	88	102
Gravidez Clínica	TEF	86	204
	TEC	77	113
Nascimento	TEF	70	220
	TEC	58	132

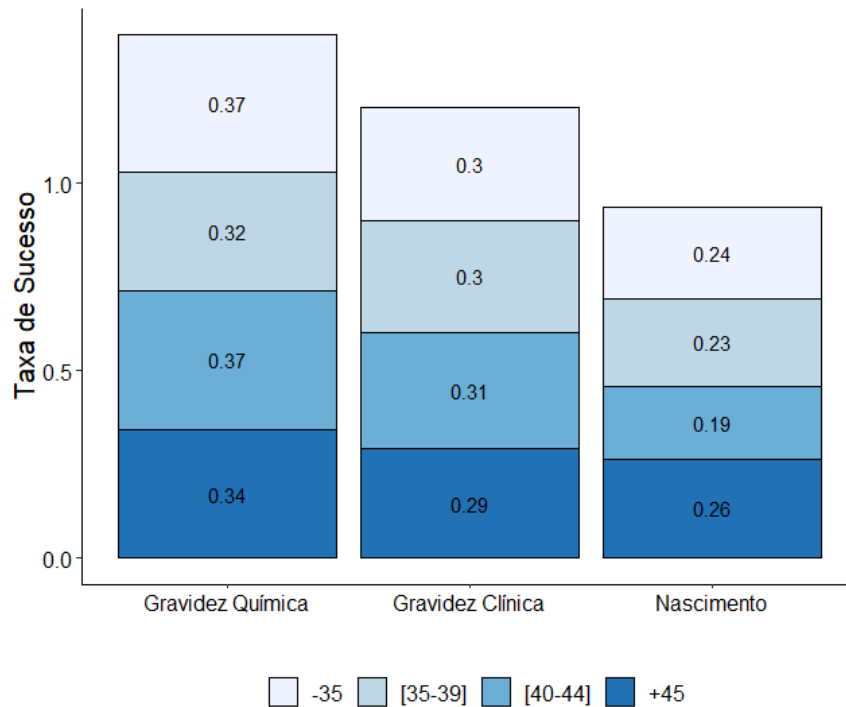


Gráfico Anexo 1. Comparação das taxas de sucesso da amostra total de acordo com as idades uterinas.

Anexo 2

Tabela Anexo 2. Tabela de contingência utilizada nos cálculos do teste χ^2 para cada faixa etária das idades uterinas, entre TEF e TEC. Valores-p estatisticamente significativos estão destacados.

			+	-	z	p
-35	Gravidez Química	TEF	23	41	-1.8056	0.035
		TEC	24	21		
	Gravidez Clínica	TEF	23	41	-0.8947	0.1855
		TEC	20	25		
	Nascimento	TEF	21	43	0.4353	0.6683
		TEC	13	32		
[35-39]	Gravidez Química	TEF	39	58	-1.2663	0.1027
		TEC	27	26		
	Gravidez Clínica	TEF	38	59	-1.1696	0.1211
		TEC	26	27		
	Nascimento	TEF	31	66	-0.4831	0.3145
		TEC	19	34		
[40-44]	Gravidez Química	TEF	41	86	-4.5579	2.6×10^{-6}
		TEC	55	31		
	Gravidez Clínica	TEF	37	90	-4.3873	5.7×10^{-6}
		TEC	51	35		
	Nascimento	TEF	21	106	-4.0963	2.1×10^{-5}
		TEC	36	50		
+45	Gravidez Química	TEF	16	14	0.8779	0.8099
		TEC	18	24		
	Gravidez Clínica	TEF	16	14	1.2828	0.9002
		TEC	16	26		
	Nascimento	TEF	13	17	0.4468	0.6725
		TEC	16	26		

Anexo 3

Tabela Anexo 3. Tabela de contingência utilizada nos cálculos do teste de *McNemar* para cada faixa etária das idades uterinas, entre TEF e TEC. Valores-p estatisticamente significativos estão destacados.

			TEC		<i>z</i>	<i>p</i>
-35	Gravidez Química	TEF	2	5	-0.7919	0.2142
			1	10		
	Gravidez Clínica	TEF	0	3	-0.4165	0.3385
			2	12		
	Nascimento	TEF	0	3	0.7092	0.7609
			2	12		
[35-39]	Gravidez Química	TEF	0	6	-0.7788	0.2180
			7	17		
	Gravidez Clínica	TEF	0	5	-0.6966	0.2430
			6	18		
	Nascimento	TEF	0	3	-0.3515	0.3626
			5	21		
[40-44]	Gravidez Química	TEF	7	8	-3.8145	6.8×10^{-5}
			8	19		
	Gravidez Clínica	TEF	3	5	-4.1793	1.5×10^{-5}
			10	24		
	Nascimento	TEF	1	2	-4.0417	2.7×10^{-5}
			6	32		
+45	Gravidez Química	TEF	3	4	0.8272	0.7959
			3	9		
	Gravidez Clínica	TEF	2	1	0.3102	0.6218
			4	12		
	Nascimento	TEF	0	0	-	-
			6	13		

Anexo 4

Tabela Anexo 4. Tabela de contingência utilizada nos cálculos do teste χ^2 para cada faixa etária das idades uterinas, entre TEF sem e com doação de ovócitos. Valores-p estatisticamente significativos estão destacados.

			+	-	z	p
-35	Gravidez Química	S/Doação	20	39	-1.1679	0.1214
		C/Doação	3	2		
	Gravidez Clínica	S/Doação	20	39	-1.5771	0.1214
		C/Doação	3	2		
	Nascimento	S/Doação	20	39	0.6355	0.7375
		C/Doação	1	4		
[35-39]	Gravidez Química	S/Doação	28	45	-0.6481	0.2585
		C/Doação	11	13		
	Gravidez Clínica	S/Doação	27	46	-0.7703	0.2206
		C/Doação	11	13		
	Nascimento	S/Doação	21	52	-1.1756	0.1199
		C/Doação	10	14		
[40-44]	Gravidez Química	S/Doação	17	72	-4.8625	5.8×10^{-7}
		C/Doação	24	14		
	Gravidez Clínica	S/Doação	16	73	-4.2346	1.4×10^{-5}
		C/Doação	21	17		
	Nascimento	S/Doação	5	84	-5.0684	2×10^{-7}
		C/Doação	16	22		
+45	Gravidez Química	S/Doação	0	6	-2.9277	0.0017
		C/Doação	16	8		
	Gravidez Clínica	S/Doação	0	6	-2.9277	0.0017
		C/Doação	16	8		
	Nascimento	S/Doação	0	6	-2.3948	0.0083
		C/Doação	13	11		

Anexo 5

Tabela Anexo 5. Tabela de contingência utilizada nos cálculos do teste χ^2 para cada faixa etária das idades uterinas, entre TEF de ciclos completos e TEC de ciclos de crio total. Valores-p estatisticamente significativos estão destacados.

			+	-	z	p
-35	Gravidez Química	TEF	26	50	-1.7921	0.0366
		TEC	15	13		
	Gravidez Clínica	TEF	23	53	-1.5370	0.0621
		TEC	13	15		
	Nascimento	TEF	21	55	-0.0948	0.4622
		TEC	8	20		
[35-39]	Gravidez Química	TEF	40	83	-0.9861	0.1620
		TEC	13	18		
	Gravidez Clínica	TEF	38	85	-1.1674	0.1215
		TEC	13	18		
	Nascimento	TEF	31	92	-0.0690	0.4725
		TEC	8	23		
[40-44]	Gravidez Química	TEF	49	111	-3.7467	9×10^{-5}
		TEC	31	21		
	Gravidez Clínica	TEF	37	123	-3.9298	4.3×10^{-5}
		TEC	27	25		
	Nascimento	TEF	21	139	-4.5465	2.7×10^{-6}
		TEC	22	30		
+45	Gravidez Química	TEF	20	26	0.6934	0.7560
		TEC	8	15		
	Gravidez Clínica	TEF	16	30	0.3612	0.6410
		TEC	7	16		
	Nascimento	TEF	13	33	-0.1876	0.4256
		TEC	7	16		

Anexo 6

Tabela Anexo 6. Tabela de contingência utilizada nos cálculos do teste χ^2_1 para os casos de doação e não-doação para a idade ovocitária abaixo dos 35 anos. Valores-p estatisticamente significativos estão destacados.

			+	-	z	p
-35	Gravidez Química	S/Doação	21	41	-3.0939	0.00099
		C/Doação	54	37		
	Gravidez Clínica	S/Doação	21	41	-2.6576	0.00365
		C/Doação	51	40		
	Nascimento	S/Doação	21	51	-1.2508	0.1055
		C/Doação	40	41		
		C/Doação	0	0		